



Analyse structurale :
petites molécules
macromolécules
polymères

Caractérisation par spectrométrie de masse Maldi-Tof d'un polymère biodégradable : le polylactide (PLA)

C. Absalon(1) • C. Vitry(1) • C. Mouche(1) • D. Pavlovic(2) • J. Kadota(2) • A. Deffieux(2) • E. Peruch(2)

(1)ISM-CESAMO, Université Bordeaux I, Talence • (2)CPO, Université Bordeaux I, Pessac

Le polylactide (PLA) est un polymère biodégradable et bio-assimilable par l'organisme, ce qui en fait un polymère de choix depuis plus de vingt ans dans le secteur biomédical pour produire du fil de suture, des broches ou des enrobages de médicaments. Par ailleurs, il est envisagé d'étendre son utilisation à d'autres domaines (fibres textiles, gobelets jetables, emballages alimentaires, ...) et de concurrencer ainsi certains polymères de commodité. De plus, le PLA a l'avantage d'être produit à partir d'un monomère bio-sourcé (l'acide lactique transformé en lactide issue de la fermentation de sucres) et non à partir de matières premières issues de ressources fossiles.

En outre, jusqu'à très récemment, la polymérisation du lactide nécessitait l'utilisation de catalyseurs organométalliques qui pouvaient laisser des résidus métalliques dans le polymère s'avérant gênants pour certaines applications. Depuis quelques années, une catalyse organique de polymérisation se développe et permet de réaliser la polymérisation contrôlée du lactide, conduisant à des PLA débarrassés de tout résidu métallique.

La spectrométrie de masse Maldi est l'outil de choix pour la caractérisation de polymères, l'objet de cette étude est de proposer une méthode optimisée pour la caractérisation de ces polylactides.

En premier lieu, le choix de la matrice et des sels d'ionisation s'avèrent particulièrement primordial pour l'obtention de spectres homogènes et reproductibles (1). Les conditions optimales ayant été déterminées, différents polylactides ont été caractérisés, nous étudierons plus particulièrement un bout de chaîne de type phényléthanol engendrant une fragmentation métastable.

Et enfin, le suivi quantitatif du rapport nombre impair/ nombre pair des unités lactides nous a permis d'étudier l'influence des conditions de polymérisation sur les réactions de transestérification pouvant avoir lieu lors de la polymérisation par ouverture de cycle du lactide (2).

1. *Solid-State NMR Spectroscopy as a Tool Supporting Optimization of MALDI-TOF MS Analysis of Polylactides*. Sroka-Bartnicka, A., Olejniczak, S., Sochacki, M., Biela, T., Potrzebowski, M.J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20 (1), 67-72.

2. *Living polymerization of cyclic esters - a route to (bio)degradable polymers. Influence of chain transfer to polymer on livingness*, Penczek, S., Szymanski, R., Duda, A., Baran, J. *Macromolecular Symposia* 201, 261-269.

P2-002

Comparative analysis of triacylglycerols from *Olea europaea* L. fruits using HPLC and MALDI-ToF

Christelle Absalon(2) • Faouzi Sakoubi(1) • Christiane Vitry(2) • Habib Kallel(1) • Sadok Boukhchina(1)

(1) Laboratoire de Biochimie des Lipides, Faculté des Sciences de Tunis, Département de Biologie, El Manar, Tunisie • (2) ISM-CESAMO, Université Bordeaux 1, Talence

TAG (Triacylglycerols) are the main components in vegetable oils. These biomolecules determine the physical, chemical and nutritional properties of the oils. The nutritional benefits of TAG are related to DAG (moderate plasma lipid level) and esterified FA (fatty acid), which are intermediate biosynthetic molecules of TAG. TAG analysis is necessary to discriminate between oils of different origin, since some oils have similar FA profiles. Olive products oils and table olives are the main diet sources of TAG in the Mediterranean countries. In this work, chromatographic and spectrometric methods were used for TAG analysis and characterization of Tunisian olive varieties.

MALDI-TOFMS and HPLC are two analytical methods that were used to characterize triacylglycerols of the Meski, Sayali, and Picholine Tunisian olive varieties.

The HPLC chromatograms of the oils showed the presence of 15 TAG species, among which triolein (OOO) was the most abundant (21-48%). The results from both HPLC and MALDI techniques predict the fatty acid composition and their percentages for each olive variety.

Competition between alpha-helical and globular conformations of transmembrane peptide variants in the gas phase

Florian Albrieux^(1,2) • Hisham Ben Hamidane⁽³⁾ • Fabien Chiroi⁽²⁾ • Florent Calvo⁽¹⁾ • Rodolphe Antoine⁽¹⁾
 Jérôme Lemoine⁽²⁾ • Yury O. Tsybin⁽³⁾ • Philippe Dugourd⁽¹⁾

⁽¹⁾ASIM, Univ. Lyon1, Villeurbanne • ⁽²⁾SA, Univ. Lyon1, Villeurbanne, France • ⁽³⁾LSMB, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse

Structural characterization of biomolecules using tandem mass-spectrometry (MS/MS) has recently known important developments, leading to an increase of its potential beyond primary structure determination. These developments essentially rely on the use of new fragmentation techniques believed to be non ergodic, and therefore more sensitive to the molecular environment, which includes higher-order structural features. Electron capture/transfer dissociation (ECD/ETD), electron detachment dissociation and electron photodetachment dissociation are examples of such techniques. They generate more specific and more reproducible fragmentation patterns than the previously developed slow heating methods, such as collision-induced dissociation, and presumably could be used to probe the conformation of biomolecular ions in the gas phase. In this purpose, the conformational sensitivity of each technique has to be tested against a method which allows reliable determination of peptide structures in vacuo. One of the few available ways to do so is based on ion mobility coupled to mass spectrometry (IM-MS). This technique provides diffusion cross sections of charged molecules in a buffer gas, from which structural assignment can eventually be achieved through comparison to cross sections obtained from calculated structures [1].

The general aim of the present work is to correlate ECD fragmentation patterns to the gas phase conformations of biomolecular ions obtained from IM-MS. The computational approach used for structural assignment is based on replica-exchange molecular dynamics using the AMBER99 force field [2], which provides representative samples of the conformational spaces explored at finite temperature, further amenable to comparison with experimental data.

Experiments were performed on a model system, which is helical in solution: M2TMP, a 25 amino acids amphipathic peptide from the transmembrane domain of the M2 protein from influenza virus A. Its wild type form and 6 structurally relevant single point variants have been analyzed using both IM-MS performed on a custom built ESI-IMS-qTOF MS (Lyon) and ECD tandem mass spectrometry performed on a 12 T ESI LTQ FT-ICR MS (Lausanne).

From our IM-MS/REMD results, two main structural families have been identified for the triply charged M2TMP variants: the first is α -helical with a less-ordered domain at the N-terminal region (cross-section of about 520 Å²) and the second is essentially globular-like (cross section of around 470 Å²). The corresponding ECD product ion abundance (PIA) demonstrates stable periodic distributions whose modulations can be related to the physical properties of the substituted amino acid [3] (hydrophilic, hydrophobic, charged site) and further correlated with one of the two structural families depending on the extent of structural perturbation induced by the substitution.

1. Joly, L., et al., *Optical and Structural Properties of Copper-Oxytocin Dications in the Gas Phase*, *Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113(32): p. 11293-11300.

2. Athènes, M. and F. Calvo, *Multiple-Replica Exchange with Information Retrieval*, *Chemphyschem*, 2008, 9(16): p. 2332-2339.

3. Ben Hamidane, H., et al., *Periodic Sequence Distribution of Product Ion Abundances in Electron Capture Dissociation of Amphipathic Peptides and Proteins*, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20(6): p. 1192-1192.

P2-004

Mass Spectrometry (ESI-IT-MS) Screening of Non-Competitive, Acetylcholinesterases Inhibitors-Type Huprines

A. Ziemianin(1,2) • C. Ronco(1,3) • L. Jean(1,3) • P.-Y. Renard(1,3) • C. Lange(1,2)

(1)CNRS UMR 6014 & FR 3038 (COBRA), Université de Rouen, Mont St Aignan • (2)Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique

(3)Laboratoire de Chimie Bio-Organique

The new group of drugs, tacrine and (\pm) huperzine A hybrids, known as Huprines, have previously been described as highly potent acetylcholinesterases inhibitors [1]. Cholinesterase inhibitors works by delaying the break down of acetylcholine in the brain by inhibiting the action of acetylcholinesterase. Huprines have been tested in order to potentially find a new drug [2-4]. They are the most promising drugs to date demonstrating highly efficient activity in the treatment of Alzheimer's Disease (AD).

The aim of this study is to test novel Huprine derivatives for pharmaceutical evaluation. New Huprine derivatives have been analysed by electrospray ionization ion trap mass spectrometry (ESI-IT-MS) and their inhibition activities towards recombinant human and *Electrophorus Electricus* Acetylcholinesterases are reported. The advantage of the monitoring using MS is the use of natural substrate. The inhibition effect of Huprine X and its derivatives have been measured and they were classified by order of potency for pharmaceutical use. Analyses were performed by automated injection, by monitoring the conversion ratio of acetylcholine to choline. AChE kinetic parameters (KM and Vmax) were derived as well as inhibitory constants (Ki) of the selected compounds. The obtained values were found to be in agreement with those reported in literature, which were obtained via the classical Ellman - UV spectrometric method. Our results demonstrate that some of these drugs are very potent AChE inhibitors. Pikomolar activities (Ki and IC50) have been obtained for the most active huprines which are of potential interest in the treatment of Alzheimer's disease.

1. Camps, P., Cusak, B., Mallender, W.D., Achab, R. E., Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Rosenberry, T.L., *Mol. Pharmacol.* (2000) 57: 409-417

2. Camps, P.; El Achab, R.; Görbig, D. M.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Badia, A.; Bano, J. E.; Vivas, N. M.; Barril, X.; Orriero, M.; Luque, F. J. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 1227

3. Camps, P., Achab, R. E., Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Badia, A., Bano, J.E., Vivas, N.M., Barril, X., Orriero, M., Luque, F. J. *J. Med. Chem.* (2000) 43: 4657-4666

4. Ronco, C., Sorin, G., Naehon, J., Foucault, R., Jean, L., Romieu, A., Renard, P.-Y. (2009) 17: 4323-4336

Etude de polysaccharides et de polysaccharides greffes par FTICRMS et FTICRMS/MS

Maxence Houzelle • Vincent Carré • Frédéric Aubriet

Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Institut Jean Barriol Fédération de Recherche 2843, Université P. Verlaine - Metz, France

L'étude structurale des saccharides et polysaccharides notamment par spectrométrie de masse trouve à l'heure actuelle un nouvel essor. En effet, aux côtés des champs d'applications classiques de ce type composé, leur utilisation comme vecteur de médicaments (cyclodextrine) ou leur emploi en science des matériaux ouvrent de nouveaux horizons. Bien souvent, pour augmenter leurs propriétés de biocompatibilité ou améliorer leurs propriétés d'usage, il est nécessaire de greffer sur la structure poly-osidique de nouvelles fonctions ou groupements chimiques.

Par exemple dans le domaine des polymères, l'emploi de la biomasse (amidon, cellulose) apparaît une bonne alternative à l'emploi de polymères de synthèse dérivés du pétrole. Cependant, les propriétés mécaniques de ceux-ci ne sont pas suffisantes, il convient donc soit de les modifier soit de les associer à des polymères synthétiques tels que le polystyrène ou le polyéthylène par exemple au sein d'un matériau composite. Dans ce cadre, les différences de propriétés physico-chimique ne permettent pas d'obtenir un produit final homogène, il s'agit plutôt d'un matériau mésostructuré. Afin d'améliorer la dispersion de polystyrène dans la cellulose (et inversement), il est nécessaire d'avoir recours à un compatibiliseur présentant des propriétés intermédiaires entre polymère synthétique et naturel. La synthèse d'un copolymère « polysaccharide - polystyrène » semble une approche intéressante. Il s'agit en fait de polysaccharides de taille de chaîne plus ou moins importante sur laquelle des greffons sont insérés de manière à permettre ensuite l'induction de la polymérisation radicalaire de chaînes polystyrène ou polyéthylène.

A ce titre, il est particulièrement important de définir le nombre et la position des différents greffons sur la chaîne poly-oside. L'emploi de la spectrométrie de masse et de la spectrométrie de masse en tandem apparaît dans ce contexte être une technique de choix. Afin, d'évaluer les performances de ce type d'approche, nous avons étudié de petits polysaccharides modèles présentant de 3 à 7 oses, qu'ils soient cycliques ou linéaires, natifs ou greffés. L'ionisation est réalisée par ESI et/ou MALDI associée à un analyseur de type FTICRMS. L'analyse structurale en mode MS/MS a été réalisée en mode SORI-CID en employant l'azote comme

gaz de collision.

Après avoir défini les conditions optimales d'analyse de tels composés en mode MS pour les modes d'ionisation ESI et MALDI en mode de détection positif et/ou négatif pour l'ensemble des composés retenus dans cette étude, nous avons examiné le comportement de ces composés en mode MS/MS. Les ions observés correspondent à ceux reportés dans la littérature pour ce type de composés, il s'agit d'espèces protonées ou cationisées par des ions sodium ou potassium en mode de détection positif et à des espèces déprotonées ou anionisées par un chlorure en mode de détection négatif. Le comportement en mode MS/MS est dépendant du type d'ion parent retenu. Si les espèces potassées ne conduisent qu'à des détachements de charge, les espèces sodées, protonées ou déprotonées assurent l'obtention d'informations structurales par l'observation de ruptures intracycliques et exocycliques. Ainsi, il est possible d'observer si on se réfère à la nomenclature de Domon et Costello les fragments A_i, C_i, X_i et Z_i.

Rôle des cations divalents dans la fragmentation de Poly(Oxyde d'éthylène) terminés SG1

Caroline Barrère(1) • Stéphane Humbel(2) • Laurence Charles(1)

(1) Laboratoire Chimie Provence, UMR 6264, Equipe Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale • (2) Institut des Sciences Moléculaires de Marseille, UMR 6263, Equipe Chimie Théorique et Mécanismes, Aix-Marseille Univ. I, II et III – CNRS, Campus de St Jérôme, Marseille (France).

Les techniques de Polymérisation Radicalaire Contrôlée (PRC) sont très largement utilisées car elles permettent de maîtriser précisément la taille du polymère synthétisé et d'obtenir des composés de faibles indices de polydispersité. Parmi ces techniques, la Polymérisation assistée par Nitroxyde (NMP) repose sur le piégeage réversible de radicaux polymères par l'espèce radicalaire stable qu'est le nitroxyde. Parmi les radicaux les plus utilisés, le nitroxyde SG1 permet la synthèse de copolymères à blocs amphiphiles poly(oxyde d'éthylène)/polystyrène (POE-b-PS), utilisés notamment dans les batteries au lithium. (1)

Cependant, l'homolyse réversible de la liaison C-ON (entre la dernière unité du bloc en croissance et le groupement terminal nitroxyde) qui est la base du processus NMP devient un inconvénient majeur lorsqu'il s'agit de caractériser ces macromolécules par spectrométrie de masse après ionisation MALDI. Ces polymères à groupement terminal fragile ne sont pas désorbés sous la forme d'adduits cationiques intacts en phase gazeuse. Une précédente étude a montré que lorsque le processus d'ionisation favorisait la protonation spécifique de l'azote du nitroxyde, (2) la liaison C-ON liant SG1 au polymère était renforcée et l'analyse MALDI-MS permettait une analyse fiable des groupements terminaux. (3) Toutefois, les polymères synthétiques présentant une affinité protonique d'autant plus faible que leur taille augmente, cette méthode reste limitée à l'étude de petits oligomères.

Dans le but de promouvoir une ionisation douce de ces polymères par MALDI, l'utilisation de cations divalents a été explorée. La méthodologie mise en œuvre consiste à étudier la rupture de la liaison C-ON en soumettant à dissociation induite par collision les adduits cationiques (alcalino-terreux et métaux de transition) du polymère formés par ionisation electrospray. Cette approche permet de distinguer l'étape d'ionisation de l'étape de dissociation, deux étapes indissociables dans la source MALDI, et d'étudier l'occurrence de la rupture homolytique qui libère le radical nitroxyde en fonction du métal adduit. Des mécanismes de fragmentations ont pu être proposés pour rendre compte des différents comportements MS/MS observés et sont étayés par des calculs théoriques.

1 Singh M., Odianya O., Wilmes G.M., Etoumi H.B., Gomez E.D., Patel A.J., Chen Y.L., Park M.J., Fragmi P., Iatrou H., Hadjichristidis N., Cookson D. and Balsara N.P. *Macromolecules* 2007 ; 40 : 4578.

2 Mazarin M., Phan T.N.T. and Charles L. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2008 ; 22 : 3776.

3 Mazarin M., Girod M., Viel S., Phan T.N.T., Marque S.R.A., Humbel S. and Charles L. *Macromolecules* 2009 ; 42 : 1849.

P2-007

Etude du peptide transmembranaire SNARE Vamp2TM22 au sein de vésicules lipidiques par échange Hydrogène/Deutérium analysé par spectrométrie de masse (HXMS)

K. Bathany(1) • Z. Fezouia(2) • R. Oda(2) • J. Lang(2) • J.-M. Schmitter(1)

UMR 5248 CBMN CNRS-Université Bordeaux-ENITAB • (1)Centre de Génomique Fonctionnelle, Bordeaux, France • (2)Institut Européen de Chimie et Biologie, Pessac, France

Les protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Protein Receptor) jouent un rôle prépondérant lors de la fusion membranaire intracellulaire chez les eukaryotes en formant des complexes reliant les deux membranes. Toutefois, le rôle du domaine transmembranaire des protéines durant ce processus reste encore mal déterminé.

Afin de caractériser à l'échelle moléculaire les interactions protéine-lipide impliquées dans le processus de fusion membranaire, nous avons utilisé l'échange isotopique Hydrogène/Deutérium analysé par spectrométrie de masse (HXMS) pour étudier le comportement d'un peptide de synthèse de 22 acides aminés correspondant au domaine transmembranaire de la protéine SNARE Vamp2. L'échange H/D a été suivi d'une part lorsque le peptide est seul en solution isotrope et d'autre part lorsqu'il est placé en présence de lipides mimant une bicouche lipidique membranaire. L'objectif est de prouver l'insertion du peptide au sein des vésicules lipidiques. Cette insertion peut être mise en évidence par une diminution du taux d'incorporation de deutérium qui traduirait une réduction de l'accessibilité au solvant deutéré des atomes d'hydrogène échangeables. Des études préalables par ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared) ont montré que la composition lipidique (nature des lipides, ratio peptide/lipide) influence de façon importante la structure secondaire du domaine transmembranaire de la protéine SNARE Vamp2 dans les membranes lipidiques modèles. Nous avons donc choisi d'évaluer différentes conditions (notamment la nature des lipides et le ratio peptide/lipides) dans des expériences de cinétique d'échange H/D.

Cependant, le caractère très hydrophobe et la très faible solubilité du peptide membranaire Vamp2TM22 ainsi que le phénomène de compétition à l'ionisation entre lipides et peptide ont été des points clés à résoudre pour le succès de l'approche HXMS.

Plusieurs populations d'atomes d'hydrogène, échangées avec des constantes de vitesse différentes, ont pu être mises en évidence. Cependant, le phénomène de migration intramoléculaire des atomes de deutérium (scrambling) observé lors de la fragmentation du peptide deutéré par dissociation induite par collision

(CID) a rendu difficile voire impossible la localisation, avec une résolution à l'acide aminé près, des sites d'incorporation de deutérium. Nous avons donc envisagé une expérience de type électrospray combinée à une dissociation par transfert d'électron (ETD), car ce procédé est réputé limiter le phénomène de scrambling. Les résultats seront présentés pour le peptide possédant la séquence native Vamp2TM22, et des variants ciblés susceptibles d'affecter la sécrétion de la protéine Vamp2 et l'exocytose.

Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very long chain polyunsaturated fatty acid (VLC-PUFA) in bovine and human retina by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

O. Berdeaux • L. Martine • S. Cabaret • N. Acar

Lipid-Aroma Platform, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR6265 CNRS, UMR1324 INRA, Univ. de Bourgogne, Agrisud Dijon

The retina is one of the vertebrate tissues with the highest content of polyunsaturated fatty acids (PUFA). A large proportion of the retinal glycerophospholipids, especially those found in photoreceptor membranes, are dipolyunsaturated molecular species. Among them, dipolyunsaturated phosphatidylcholine molecular species are known to contain very long chain polyunsaturated fatty acids (VLC-PUFA) from the n-3 and n-6 series and having 24 to 36 carbon atoms (C24 to C36) and four to six double bonds. Recent interest in the role of VLC-PUFA came with the finding of the involvement of a protein named ELONGATION OF VERY LONG CHAIN FATTY ACIDS 4 (ELOVL4) in their biosynthesis and the known mutations in the ELOVL4 gene in Stargardt-like macular dystrophy (STD3), a dominantly inherited juvenile macular degeneration leading to vision loss.

Using a triple quadrupole MS instrument, we developed an HPLC-ESI-MS/MS method for the structural characterization and the quantification of intact dipolyunsaturated phosphatidylcholine (PC) molecular species containing VLC-PUFA and validated this methodology on retinas from bovines and human donors. Successful separation of phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), lyso-phosphatidylcholine (LPC) and sphingomyelin (SM) was achieved by using a silica gel column and a gradient of hexane/isopropanol/water containing ammonium formate as a mobile phase. A complete structural characterization of intact phosphatidylcholines species was obtained by collision-induced dissociation (CID) in the negative mode. Fatty acid composition and distribution can be clearly assigned based on the intensity of sn-2/sn-1 fragment ions. The characterization of PC species was done on bovine retina. Among them, 28 were dipolyunsaturated PC species containing one VLC-PUFA (C24 to C36) with three to six double bonds. VLC-PUFA was always in the sn-1 position whilst PUFA at the sn-2 position was exclusively docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3). Most of these VLC-PUFA-containing dipolyunsaturated PC were detected and quantified in human retinas. The quantitative analysis of the different PC molecular species was performed in the positive mode using

precursor ion scanning of m/z 184 and 14:0/14:0-PC and 24:0/24:0-PC as internal standards. The relationship between the MS peak intensities of different PC species and their carbon chain length was included for calibration. The main represented compounds were those having VLC-PUFA of 32 carbon atoms (C32:3, C32:4, C32:5 and C32:6) and 34 carbon atoms (C34:3, C34:4, C34:5 and C34:6). Dipolyunsaturated PC with 36:5 and 36:6 were detected but at lower quantities. In conclusion, this new HPLC-ESI-MS/MS method is sensitive and specific enough to structurally characterize and quantify all molecular species of PC, including those esterified with VLC-PUFA. This technique is valuable for a precise characterization of PC molecular species containing VLC-PUFA in retina and may be useful for better understanding the pathogenesis of STD3.

Isolation de sphingophosphonolipides issus de mollusques par SPE et CCM-2D et caractérisation par spectrométrie de masse ESI/MS et ESI/MS/MS

A. Athamena(1,2) • S. Trajkovic Bodenne(1,2) • M. Albert(1) • R. Dey(1,2) • V. Kozul(3) • J. Bodenne(1,2)
N. Henriques(4) • C. Duchamp(4) • D. Bouchu(4)

(1)Univ. de Lyon, Fr • (2)CNRS, UMR 5123, labo, de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Univ. C. Bernard Lyon 1 • (3)Oceanography and Fisheries Institute, Univ. of Dubrovnik, Croatia • (4)Centre Commun de Spectrométrie de Masse, UMR CNRS 5246, Univ. Lyon 1, Villeurbanne

Les phosphonolipides sont particulièrement exprimés chez les protozoaires, les cnidaires, les mollusques et les éponges. Peu d'études font mention de leur présence dans les tissus de mammifères. Les phosphonolipides diffèrent des phospholipides par la présence d'une liaison directe C-P à la place d'un lien ester phosphorique, les rendant particulièrement résistants à la coupure par la phospholipase D. Chez les mollusques, les phosphonolipides principaux sont habituellement des céramides aminoéthylphosphonates (CAEP). Leur métabolisme et fonction physiologique sont très peu comprises. Dans le but d'en savoir plus sur ces aspects, il a été nécessaire de mettre au point des procédures qui permettent l'isolation et la séparation des CAEP des autres phospholipides. Dans le cas des phospholipides issus de mollusques comestibles (*Mytilus galloprovincialis* and *Pinna nobilis*) que nous étudions, il ne nous a pas été possible d'utiliser les méthodes déjà décrites. Nous avons donc développé une méthode par extraction en phase solide ainsi qu'une séparation par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle qui permet de séparer les sphingophosphonolipides des autres phospholipides. La complexité des mélanges obtenus n'a pas rendu possible une caractérisation de leur structure par RMN. Nous avons donc étudié les fractions chromatographiques par spectrométrie de masse ESI/MS et ESI/MS/MS. Cette dernière technique nous a permis de caractériser sans ambiguïté la nature phosphonolipidique de certains composants des fractions isolées. Nous avons ainsi pu établir des schémas de fragmentation en relation avec la structure des ions étudiés par MS/MS (mode positif et négatif). Les ions fils observés sont caractéristiques de ces phosphonolipides.

Analyse de polymères et de copolymères synthétiques par spectrométrie de masse DESI-Orbitrap

Manel Mcharek-Friaa • Véronique Legros • Jeanine Tortajada • William Buchmann

Laboratoire Analyse et Modélisation pour La Biologie l'Environnement (UMR 8587, CNRS/CEA/UEVE), Université d'Evry Val d'Essonne.

Une des évolutions récentes de la spectrométrie de masse consiste à réallier à pression atmosphérique, des analyses rapides avec un minimum de préparation d'échantillon voire plus du tout. Ces dernières années, de nouvelles méthodes d'ionisation ont ainsi été décrites sous le terme d'« ionisation ambiante ». Dans ce travail, nous nous proposons d'évaluer les performances de l'une de ces nouvelles méthodes d'ionisation: la technique DESI (Desorption Electrospray Ionization) pour l'étude de polymères synthétiques. La méthode DESI a été introduite en 2004 par le groupe de R.G. Cooks (Purdue University). Sa mise en œuvre consiste à diriger des gouttelettes électronébulisées avec assistance pneumatique vers une surface à analyser à pression atmosphérique. Des ions sont produits à partir de l'échantillon déposé (ou initialement présent) sur la surface. Les spectres de masse qui en résultent sont très similaires des spectres electrospray classiques. Potentiellement, les avantages de la technique DESI sont importants: il s'agit d'une méthode d'ionisation directe (peu ou pas de préparation d'échantillon nécessaire), le gain de temps est considérable, de plus, la technique DESI opère à l'air libre, la manipulation des échantillons est plus aisée, la surface peut être de diverse nature : verre, plastique, métal, papier... Les limites de cette nouvelle méthode d'ionisation DESI pour l'analyse des polymères, en termes de sensibilité, de gamme de masse, ou encore simplement de gamme de polymères accessible à l'analyse, ne sont pas encore bien connues puisque seul un petit nombre d'articles rapporte l'emploi de la technique DESI pour l'analyse de polymères.

Le but de ce travail a été dans un premier temps, d'évaluer les performances de cette nouvelle méthode d'ionisation, en termes de sensibilité et de gamme de masse en fonction du type de polymères et des conditions opératoires. Les polymères interrogés avec ce nouveau mode d'ionisation ont été de natures diverses : des polymères ou des copolymères industriels qui présentent une grande variété d'application, polyéthylène glycol de masses moyennes 620, 1080, 1470, 4120, 7100 g/mol ; polyméthylmethacrylates 855, 1970, 2710, 3790 g/mol ; polydiméthylsiloxanes 770, 1200, 2000, 3780 g/mol et copolymères d'éthylène et de propylène de séquences variables 2000

g/mol. Les polymères ont été d'abord étudiés seuls, puis directement au sein de matrices complexes (détergents, cosmétiques, médicaments...). Au cours de ce travail, la source DESI a été associée à un analyseur Orbitrap qui permet d'atteindre une résolution de 100000. La caractérisation de ces polymères synthétiques s'est malgré tout révélée délicate en raison du grand nombre d'états de charges produits en DESI. A titre d'exemple, un polyéthylène glycol de masse moyenne 4120 présente 8 distributions d'états de charge allant de 2+ à 9+. Les ions sont essentiellement des adduits de type $(M+nNa)^+$. Pour le calcul des masses molaires moyennes (en nombre M_n , en poids M_p), et des indices de polymolécularité (I_p) traduisant l'étroitesse de la distribution des masses moléculaires, il a été nécessaire dans un premier temps, d'utiliser un logiciel approprié pour déconvoluer les spectres DESI, puis d'utiliser un programme complémentaire permettant d'identifier de manière automatique chaque oligomère. Pour les homopolymères, les résultats obtenus en DESI sont en bon accord avec les données MALDI-TOF et SEC. Dans le cas des copolymères synthétiques, le nombre d'ions devient considérable parce que le polymère contient plusieurs motifs de répétition différents. L'interprétation des spectres DESI devient alors très délicate et constitue un réel défi.

Identification de déviations structurales dans des dendrimères biodégradables par électrospray-MS/MS

C. Chendo(1) • A. Tintaru(2) • V. Monnier(1) • R. Giordanengo(2) • C. Bouillon(3) • G. Quélever(3) • L. Peng(3) • L. Charles(2)

(1)Fédération des Sciences Chimiques – CNRS, Spectropôle, Campus de St Jérôme, Marseille • (2)Labo. Chimie Provence, Univ. Aix-Marseille I, II, III – CNRS, UMR 6264, Equipe Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale, Campus de St Jérôme, Marseille • (3)Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille, Univ. de la Méditerranée, Fac. des Sciences de Luminy, UPR-CNRS 3118, Marseille

Les dendrimères de type poly(amido)amine (PAMAM) s'avèrent particulièrement efficaces dans la vectorisation de l'ADN ou de l'ARN. Toutefois, les poly(amino)esters présentent l'avantage supplémentaire d'être biodégradables, via le clivage enzymatique de leurs nombreuses liaisons esters. L'approche divergente usuellement mise en œuvre lors de leur synthèse permet la production de dendrimères de haute génération mais peut également occasionner des réactions secondaires qui donnent lieu à des molécules défectueuses. La caractérisation des défauts présents dans un échantillon de dendrimères permet d'identifier la nature de ces réactions parasites et, de là, modifier les conditions expérimentales pour les minimiser.

Les stratégies analytiques basées sur la spectrométrie de masse impliquent dans un premier temps l'établissement du comportement dissociatif des molécules parfaites, qui sert ensuite de référence dans l'étude MS/MS des molécules défectueuses. Cette étude décrit les règles de dissociation d'une nouvelle famille de dendrimères biodégradables, des poly(amino)esters portant des groupements terminaux tert-butyl esters.

Après activation par collision, les molécules protonées produites après ionisation électrospray subissent une réaction de fragmentation principale qui consiste à éliminer une molécule de 2-méthyl-1-propène, générant ainsi une terminaison acide carboxylique. Cette réaction se produit à partir de terminaisons de branche du dendrimère et permettra donc de caractériser le nombre de terminaisons intactes dans une molécule défectueuse. A partir des terminaisons acides, l'élimination d'une molécule d'éthène et d'une molécule de dioxyde de carbone (72 Da) au cours du même mécanisme est parfois observée. Alternativement, des éliminations successives d'un bras entier du dendrimère (301 Da) sont également observées. Combinées aux pertes de neutres de 56 Da, ces pertes de 301 Da permettront de focaliser les déviations structurales. Sur la base de ces règles simples de fragmentation, la structure de défauts présents dans un échantillon de dendrimère poly(amino) ester a pu être facilement caractérisée.

P2-012

Development of an HXMS Workflow and its Application to Epitope Mapping

Laetitia Cravello(1) • Keith Fadgen(2) • Michael Eggertson(2) • Martha D. Stapels(2) • Joomi Abu(2)

(1)Waters corporation, Manchester, UK • (2)Waters corporation, Milford, US

Introduction:

Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HXMS) is a useful analytical method for the study of protein conformational changes. To increase the adoption of HXMS in the biopharmaceutical industry, standard practices need to be developed to ensure system performance is consistent. In this study, we describe a comprehensive HXMS workflow which is capable of chromatographic separations ranging from 300 μ m to 1.0 mm i.d columns. Cytochrome c was chosen to assess system reproducibility as well as validate all aspects of system performance. Once system performance is validated, the system can be utilized to determine epitopes of protein and antibody interactions.

Method:

Protein samples were exposed to deuterium for various amounts of time and subjected to online pepsin digestion coupled to separation at low temperature in a newly developed chiller module. The eluent was directed into a Q-ToF with standard ESI interface for mass analysis. Peptides were fragmented by a simple scheme of alternating scans with low and high collision energy. Chromatographic time-alignment was used to associate precursors and fragments prior to a database search. Accurate mass precursors and fragment ions, physicochemical properties, and peptide replication were used to minimize false positives.

Preliminary Data:

All aspects of system performance were assessed with the standardized workflow. This covered aspects of protein digestion, peptide recovery post digestion, peptide separation, and peptide detection/identification. In general, up to 100% linear sequence coverage was consistently observed for the Cytochrome c protein sample. In addition, there was a high degree of peptide overlap, enhancing the localization of deuterium incorporation. The unique nature of alternating scans of low and high collision energy allows both precursor and fragment ions to be defined by a minimum of 10 points across each peak. This permits the determination of peak parameters (area, intensity, and width) for all observed ions. In addition to reproducible identification, these metrics were used to assess system variability.

Typical responses were less than 10%RSD during the validation study.

Combining both peptide identification and observed peak parameters all aspects of the workflow were validated. The HXMS workflow will be applied to mapping epitopes of proteins and their corresponding antibodies.

Novel Aspect:

HXMS workflow using alternating scans of low and high collision energy applied to epitope mapping.

Changement de conformation spectaculaire lors de la désolvatation du complexe non covalent sBBI/trypsine

E. Darii(1,2) • C. Afonso(1) • S. Alves(1) • G. Saravanamuthu(2) • I. G. Gut(2) • J.-C. Tabet (1)

(1)Université Paris 6/UMR7201, Paris, France • (2)CEA/DVVIG - CNG, Evry, France

L'ESI-MS est devenu un outil important pour l'étude de systèmes non-covalents protéine-protéine ou encore protéine-ligand. Dans des conditions douces de désolvatation ces complexes amenés intacts en phase gazeuse donnent ainsi accès facilement à leur stœchiométrie. Des cations métalliques sont souvent impliqués dans la stabilisation de la structure de la protéine ainsi que dans son activité biologique. La localisation de ces métaux par spectrométrie de masse est néanmoins rarement étudiée. Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés au complexe trypsine/sBBI (soybean Bowman-Birk inhibitor) et en particulier au changement de conformation de ce complexe en phase gazeuse mise en évidence par la position de l'ion Ca^{2+} .

Dans des conditions non dénaturantes, le spectre de masse de la trypsine présente des ions multichargés de trypsine conservant l'ion Ca^{2+} de façon analogue à ce qui est connu en solution. Inversement, pour l'inhibiteur sBBI, même en présence de CaCl_2 principalement les espèces multi-protonées sont détectées. Dans le cas du mélange 1:1 trypsine/inhibiteur, en mode ESI positif et négatif, les spectres enregistrés sous désolvatation douce affichent principalement le complexe trypsine/inhibiteur ([T/I]) cationisé avec un ion Ca^{2+} . La dissociation "in-source" du complexe solvaté a été effectuée afin d'obtenir des informations sur l'emplacement du Ca^{2+} relativement au site de liaison inhibiteur/trypsine. Ainsi avec une tension de l'orifice-skimmer relativement élevé, les spectres de masse présente la disparition des ions du complexe. La dissociation du complexe ternaire [(T/I+nH)+Ca] $^{(n+2)+}$ conduit spécifiquement aux ions trypsine cationisés (T/ Ca^{2+}) ainsi qu'à ceux de l'inhibiteur protonés (I) (avec une très faible abondance des espèces cationisées par le calcium). Ce comportement est cohérent avec les données connues de cristallographie. Probablement que dans ces conditions, les partenaires se séparent avant la désolvatation totale. Inversement, les spectres d'ions produits (mode MS/MS) du complexe [(T/I+9H)+Ca] $^{11+}$ conduit à T protoné et à I/ Ca^{2+} . On peut supposer qu'une migration formelle de l'ion Ca^{2+} de la trypsine vers l'inhibiteur se produit au sein du complexe. Compte tenu de la structure aux rayons X, ceci implique un

important changement conformationnel du complexe en phase gazeuse pour permettre le transfert Ca^{2+} observé.

Enfin, à partir de complexes cationisés (partiellement) solvatés, il peut être considéré que le calcium est toujours conservée par la trypsine loin de l'inhibiteur. Un changement important de la conformation doit avoir lieu au cours de la désolvatation, permettant à l'inhibiteur d'atteindre une géométrie particulièrement favorable à la fixation du calcium.

Identification des métabolites générés in vitro d'analogues chlorés du bisphénol A

Emilien Jamin • Anne Riu • Vathy Ty • Daniel Zalko • Laurent Debrauwer

INRA, UMR1089 Xenobiotiques, Toulouse, France

Le bisphénol-A (BPA) est produit industriellement à plus de 3 millions tonnes/an essentiellement pour entrer dans la composition de nombreux matériaux plastiques. On le retrouve également dans le revêtement interne des canettes ou des boîtes de conserve, dans les ciments dentaires ou encore les papiers à impression thermique. Les analogues chlorés du BPA (mono-, di-, tri- et tétrachloro-BPA) représentent un groupe émergent de contaminants environnementaux qui sont étroitement liés au BPA. Leur présence a été détectée dans l'environnement et notamment dans les rejets des stations d'épuration (1), et des résultats récents ont mis en évidence une exposition humaine en démontrant leur présence dans des tissus humains (2). Étant donnée la faible production industrielle du tétrachloro-BPA (TCBPA) en tant que retardateur de flamme (< 10000 tonnes/an), il semble que l'origine des analogues chlorés du BPA dans l'environnement soit majoritairement causée par la chloration in situ du BPA, plutôt que par la dégradation du TCBPA industriel. En effet, le BPA peut facilement être chloré par réaction avec l'hypochlorite de sodium (3) qui est communément utilisé pour le blanchiment du papier ou le retraitement des eaux usées, deux matrices contenant du BPA. Contrairement au BPA ou au tétrabromo-BPA (TBBPA), le métabolisme in vitro ou in vivo des analogues chlorés du BPA n'est pas connu.

Les processus de bioactivation du monochloro-BPA (MCBPA), du dichloro-BPA (DCPBA), du trichloro-BPA (TCBPA) et du TCBPA ont donc été étudiés in vitro sur des fractions subcellulaires de foie de rat et de foie humain, en utilisant des analogues chlorés du BPA radio-marqués au carbone 14. Les métabolites ainsi générés ont ensuite été séparés par chromatographie liquide (Thermo Spectra P1500, Thermo Scientific) en utilisant une colonne Nucleodur C8 gravity (Macherey-Nagel) et un gradient de phases mobiles composées d'acétonitrile, d'eau et d'acide acétique. Les métabolites ont été sélectivement détectés avec un détecteur de radioactivité en ligne et identifiés par spectrométrie de masse avec un analyseur de type piège à ions (LCO, Thermo Scientific) équipé d'une source d'ionisation par Electrospray opérant en mode négatif. La caractérisation structurale des métabolites s'est appuyée sur les voies

de fragmentation connues des analogues bromés du BPA (4), les massifs isotopiques des ions observés sur les spectres full MS, les spectres MS/MS obtenus à partir d'ions précurseurs de composition isotopique différente, des spectres MS3 et d'analyses RMN lorsque les quantités de métabolite le permettaient.

L'étude par Radio-HPLC des analogues chlorés du BPA a montré la formation de plusieurs métabolites par les microsomes de foie, identiques chez l'homme et le rat. De manière originale, plusieurs métabolites moins polaires que la molécule mère ont été observés dans les incubations impliquant le tCBPA et le TCBPA. L'analyse structurale par spectrométrie de masse a quant à elle permis d'identifier les métabolites polaires qui correspondent soit à des métabolites issus du clivage de la molécule mère, soit à des métabolites hydroxylés. Concernant les métabolites apolaires, des composés possédant jusqu'à 7 atomes de chlore ont pu être identifiés par spectrométrie de masse et confirmés par RMN.

1. Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT, J. *Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3511–3518

2. Fernandez ME, Arrebola JP, Tauxefski J, Navalon A, Ballesteros O, Pulgar R, Vilchez JL, Oliva N, *Reprod Toxicol*, 24 (2007) 259-264

3. Liu H, Zhao H, Quan X, Zhang Y, & Chen S, *Environ Sci Technol*, 43 (2009) 7712-7717

4. Zalko D, Prouillac C, Riu A, Perdu E, Dolé L, Jomarin I, Carlet C, Debrauwer L, Cravedi JP, *Chemosphere*, 64 (2006) 318-327

P2-015

Etude métabolique par CPL-SM2 d'un nouvel agent anticancéreux, le WS 27, associant le chlorambucil au fluorodésoxyglucose

Galmier MJ • Weber V • Borel M • Debiton E • Miot-Noirault E • Chezal JM

UMR 990 Inserm - Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand (France)

Dans l'objectif d'une chimiothérapie ciblée des tumeurs solides via le fluorodésoxyglucose (FDG), de nouvelles molécules anticancéreuses ont été synthétisées associant un agent cytotoxique, le chlorambucil, au FDG, les deux entités étant reliées par divers espaceurs (1). Des études in vivo sur deux de ces molécules ont montré une inhibition de la croissance tumorale de l'ordre de 75-90%, inhibition hautement significative. Celle-ci se maintient au-delà de 10 jours après l'arrêt du traitement administré par voie intra-péritonéale.

Le profil métabolique de la molécule la plus active, le WS 27, est évalué par CPL-ESI-SM-SM et par RMN du 19F. Une méthode analytique CPL-ESI-SM-SM a été développée afin de mettre en évidence les métabolites du WS 27. La phase stationnaire utilisée est une colonne chromatographique Phenomenex Synergi polar-RP, (150 x 3,00 mm ; 4 microns). La phase mobile, composée d'un mélange de solution A (formiate d'ammonium 10 mM, pH3) et de solution B (acétonitrile) est délivrée avec un débit de 0,5mL/min en mode gradient. La détection est réalisée par ESI en mode MRM.

La recherche des métabolites a été effectuée sur divers prélèvements biologiques (tumeur, foie, cerveau, rein, poumon, plasma, urine) de souris C57B16 porteuses de tumeurs B16F0 traitées en IP à la dose de 0,05mmol/kg de WS 27 et qui ont été sacrifiées aux temps 2h, 6h et 24h. La détection par SM-SM en mode MRM a permis de mettre en évidence 14 métabolites ainsi que le produit inchangé au niveau biologique. Les différentes réactions de métabolisation retrouvées sont l'hydroxylation du noyau phényle, la désacétylation, la N-déchloroéthylolation, l'hydrolyse au niveau de l'espaceur en libérant le chlorambucil qui subit une beta-oxydation pour donner l'acide acétyle phényle moutardé.

(1)Reux B., Weber V., Galmier M.J., Borel M., Madesclaire M., Madélimont J.C., Debiton E., and Coudert P. Synthesis and cytotoxic properties of new fluorodeoxyglucose-coupled chlorambucil derivatives. 2008. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 5004-5020.

Détermination des paramètres de distribution de copolymères acryliques statistiques par MALDI-MS

Rémi Giordanengo(1) • Stéphane Viel(1) • Béatrice Allard-Breton(2) • André Tbevand(1) • Laurence Charles(1)

(1) Laboratoire Chimie Provence, Unité Aix-Marseille 1, II et III – CNRS, UMR 6264, Equipe Spectrométrie Appliquées à la Chimie Structurale, Marseille, France • (2) ARKEMA, Centre de Recherche Rhône Alpes, Service Analyse, Pierre-Bénite, France

Les copolymères amphiphiles, à blocs ou statistiques, présentent des propriétés macroscopiques exploitées dans de nombreux domaines industriels. Les performances de tels matériaux sont étroitement associées aux paramètres structuraux des macromolécules et leur caractérisation, notamment en termes de taille, est primordiale. Traditionnellement, la taille des polymères synthétiques est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique mais la mise en œuvre de cette technique pour les copolymères est assez fastidieuse. La RMN à gradients de champ pulsés (RMN PGSE) permet d'atteindre le paramètre M_w avec une bonne précision mais la validité des modèles de diffusion permettant de relier le coefficient d'auto-diffusion des macromolécules à la masse moyenne en masse est limitée aux homopolymères. La spectrométrie de masse après ionisation MALDI est une technique analytique de choix pour la détermination des paramètres de distribution, au moins dans le cas de polymères de faible polydispersité. Pourtant, dans le cas particulier de l'étude de copolymères amphiphiles, la recherche des conditions expérimentales MALDI est extrêmement complexe.

Une stratégie consiste à transformer les molécules de copolymères en molécules d'homopolymères pour lesquelles les conditions MALDI sont validées. Dans le cas de copolymères statistiques constitués d'unités acide méthacrylique (AMA) et d'unités méthyl méthacrylate (MMA), deux méthodologies ont été envisagées : métyler chaque unité AMA du copolymère AMA-MAM pour produire un homopolymère PMAM, ou hydrolyser les fonctions esters des unités MAM pour produire un homopolymère PMAA. Les paramètres de distribution de ces homopolymères, mesurés par MALDI-MS et validés par RMN-PGSE, ont permis de remonter aux valeurs M_n et M_w des copolymères de départ, la composition co-monomérique des molécules étant fournie par une analyse RMN quantitative.

Caractérisation de la spécificité de l'enzyme TrmI de *Pyrococcus abyssi* par spectrométrie de masse MALDI-TOF et MALDI-TOF/TOF

V. Guérineau(1) • A. Guélorget(2) • B. Golmelli(2) • O. Laprèvote(1,3)

(1)Centre de recherche de Gif, Inst. de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette • (2)Centre de recherche de Gif, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS, Gif-sur-Yvette • (3)Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA4463, Fac. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Univ. Paris Descartes, Paris.

L'enzyme TrmI est une ARNt méthyltransférase (MTase) S-adenosyl-L-méthionine(SAM) -dépendante. Elle catalyse la méthylation de l'adénine en position 58 de l'ARN de transfert. Cette méthylation mIA58 est essentielle chez plusieurs organismes. Par exemple, chez la bactérie thermophile *Thermus thermophilus*, mIA58 est nécessaire à la croissance de la bactérie à haute température. Contrairement aux enzymes TrmI bactériennes et eucaryotes qui sont mono-sites spécifiques (elles ne méthylent que A58), TrmI de *Pyrococcus abyssi* possède deux sites spécifiques permettant aussi la méthylation de A57. La caractérisation de la régiospécificité de cette enzyme sur son substrat naturel s'est malheureusement avérée impossible par les méthodes usuelles de radioactivité en raison de l'enchaînement de 3 adénines en position 57, 58 et 59. Nous avons alors appliqué une méthode alternative basée sur la digestion de l'ARNt suivie d'une caractérisation des oligonucléotides modifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et MALDI-TOF/TOF. L'ARNt a dans un premier temps été incubé avec l'enzyme TrmI en présence du co-facteur SAM. Après arrêt de la réaction (précipitation de la protéine par ajout d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique) l'ARNt a été extrait par centrifugation et précipitation éthanolique, puis dessalé sur colonne MicroSpin G-25. La digestion a alors été effectuée par la RNase A. Les oligonucléotides résultants ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflectron positif. La matrice DHB a été choisie et le mode de dépôt « dried droplet » utilisé pour la préparation des échantillons. Enfin, les oligonucléotides modifiés d'intérêt (incrément de masse dû aux méthylations supposées) ont été étudiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF en mode MS et MS/MS. Dans ce dernier cas, l'argon a été considéré comme gaz de collision ($P=4,6 \times 10^{-6}$ hPa) et l'énergie de collision a été fixée à 2 keV.

Cette étude a permis de démontrer la spécificité des positions de méthylation de l'enzyme TrmI de *Pyrococcus abyssi* sur l'ARNt. Rapidité, sensibilité, robustesse et spécificité font de la spectrométrie de masse MALDI, en mode simple ou tandem, la technique de choix pour la caractérisation d'oligonucléotides modifiés.

P2-018

Characterization of fragmentation pathways of new bisphosphonates by electrospray tandem mass spectrometry

E. Guénin(1) • T. Jouenne(2) • J. Hardouin(2)

(1)Labo. de Chimie, Structure, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques, Equipe Chimie Bioorganique et Biomatomatériaux, Univ. Paris 13, FRE 3043 CNRS, Bobigny, Fr. • (2)Labo. Polymères, Biopolymères, Surfaces, Equipe BRICS, Univ. de Rouen, UMR CNRS 6270, France

Bisphosphonates are important drugs for the treatment of a variety of bone diseases. Since some of these compounds have no chromophore, their detection is challenging and mass spectrometry (MS) appears to be an appropriate sensitive tool. Previous studies were done by ESI-MS(n) in positive and negative modes for studying bisphosphonates. The compounds were analyzed by ESI-MS(n) (1,2). Following the side chain and the esterification functions, different fragmentation pathways were deduced. Nevertheless, unesterified bisphosphonates gave few fragmentations and were difficult to analyze. Our work deals with the analysis by ESI-MS(n) of unesterified bisphosphonates.

Bisphosphonates were analyzed by ESI-MS(n) on both an ion trap (to carry out MS(n) experiments (until n=5)) and a Q-TOF mass spectrometer (to have better mass accuracy) in positive and negative modes.

We describe the dissociation mechanisms of these prodrugs both in positive and in negative ion modes. We presented complete fragmentation fingerprints of the bisphosphonates both in positive and negative modes by ESI-MS(n). These fingerprints will be of great value for differentiating these potential prodrugs in complex biological mixtures.

(1) Hardouin J., Guénin E., Montel M., Caron M., Lecouvey M., *Journal of Mass Spectrometry* 2008, 43: 1037-1044.

(2) Hardouin J., Guénin E., Malosse C., Caron M., Lecouvey M., *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008, 22: 2287-2300.

Stratégie d'analyse rapide par MALDI/TOF/TOF

Anne-Lise Serre • Marie Hubert-Roux • Catherine Lange

CNRS UMR6014, COBRA, Univ. de Rouen, Mont-St-Aignan

L'étude de la localisation des ponts disulfure, modification post-traductionnelle associée à la structure tertiaire, a été menée sur des peptides modèles, le Mast Cell Degranulating (MCD) peptide [1] et l'D-conotoxine MVIIA [2]. Ces deux peptides, hautement basiques, contiennent une vingtaine d'acides aminés, et deux et trois ponts disulfure respectivement.

Une stratégie d'analyse rapide par spectrométrie de masse MS/MS sous ionisation désorption laser assistée par matrice (MALDI) a été appliquée au MCD peptide, puis à la conotoxine MVIIA. Le peptide est tout d'abord réduit par le dithiothreitol (DTT), afin de dénombrer les ponts disulfure. En parallèle, il est digéré par la trypsine, puis les ions tryptiques sont analysés par MALDI-LID (Laser Induced Dissociation). Les spectres LID font apparaître, outre les ions séquentiels de séries b et y, des combinaisons d'ions sous forme de triplets et de quintuplets, diagnostiques de la présence de liaisons disulfure. L'ensemble de ces résultats a permis de vérifier la position des ponts disulfure dans chaque peptide.

Néanmoins, des phénomènes de scrambling peuvent avoir lieu en phase gazeuse [3]. Le recours à d'autres enzymes non spécifiques telles que la chymotrypsine ou la pronase s'avère nécessaire pour un assignement univoque des ponts disulfure.

[1] Buku A., Price J.A., *Peptides*, 2001, 22, 1987-91.

[2] Basu V.J., Nadasdi L., Ramachandran J., Mlyanich G.P., *FEBS Letters*, 1995, 370, 163-69.

[3] Zhao L., Almaraz R.T., Xiang F., Hedrick J.L., Franz A.H., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, 20, 1603-16.

P2-020

Complémentarité des techniques CPG-SM et CPL-SM-SM pour caractériser les composés issus d'une exposition à l'éthanol des cathéters de dialyse en polyuréthane

N. Msakni(1) • S. Guenu(1) • M.J. Galmier(1) • B. Souweine(2) • C. Lartigue(1)

(1)Labo. de Chimie analytique et spectro. de masse, UMR 990 Inserm-UdA, Univ. de Clermont • (2)Service de Néphrologie Réanimation Médicale, CHU Clermont-Fd, Hôpital G. Monpiéd

L'utilisation du verrou éthanol à 60% (V/V) pour prévenir et/ou contrôler les infections liées à l'utilisation des cathéters tunnellisés est une option thérapeutique émergente. Or, les fabricants de cathéters ne garantissent pas l'absence de dégradation de la structure lors d'une exposition prolongée à l'éthanol. Une première étude¹, réalisée sur des cathéters en silicone, a montré l'existence d'un relargage de polydiméthylsiloxanes cyclisés dès 4 heures de contact, majeur avec l'éthanol à 95%, très faible avec l'éthanol à 60% et non significativement différent de celui observé avec le NaCl à 0,9% (témoin), autorisant l'emploi de l'éthanol à 60% dans les cathéters en silicone.

Une étude analogue, mais plus complexe en raison de l'hétérogénéité du matériau, est en cours sur les cathéters en polyuréthanes (PUR). Divers lots de cathéters en Carbothane[®] et en Triniflex[®] ont été immergés (1 cathéter entier dans 30 mL de solution) à 37°C, dans trois solvants différents: chlorure de sodium à 0,9%, éthanol à 60% et éthanol à 95% pendant 5 min, 30 min, 4 heures, 15 jours et, 4h puis 15 jours, à raison de n = 6 échantillons par essai.

L'analyse en CPG-SM et en CPL-SM-SM des solutions de stockage a révélé la présence de divers polyols (1,6 hexanediol et dérivés hexyl, éthyl carbonate diols) dans l'éthanol à 95%. La présence de nonylphénols a également été observée sur un lot de cathéters. Ces composés présentant une toxicité reconnue, une étude quantitative par CPG-SM en SIM (ions à m/z 121, 135 et 149) a été entreprise et les concentrations retrouvées après 2 semaines d'immersion sont de $19,21 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$ dans l'éthanol à 95%, contre $0,60 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ dans l'éthanol à 60%, versus $< 0,01 \mu\text{g/mL}$ dans le NaCl à 0,9%. La concentration en nonylphénols dans l'éthanol à 60% reste $< 0,11 \mu\text{g/mL}$ jusqu'à 4h d'immersion.

Cependant, les nonylphénols n'ont pas été retrouvés dans les solutions d'immersion pour les autres lots de cathéters testés, même après contact dans l'éthanol à 95%. Ces résultats confirment la variété des matériaux polyuréthanes et des additifs de synthèse utilisés pour la fabrication des cathéters, ainsi que l'évolution constante des procédés et, en corollaire, l'intérêt, parallèlement aux tests mécaniques classiques, de procéder à un contrôle chimique systématique des lots avant mise sur le marché.

J.S. Guenu, A.E. Heng, E. Charbonnel, M.J. Galmier, E. Charlot, P. Deteix, B. Souweine and C. Lartigue.

Rapid Commun. Mass Spectrom., 2007, 21, 229-236

P2-021

Analyses MALDI-TOF de dérivés d'holosides à la 2-amino-pyridine et la procaine

H. Lavanant • C. Loutelier-Bourhis

Université de Rouen, IRCOF, Mont St Aignan & CNRS UMR 6014, COBRA,FR3038, Mont St Aignan

La dérivation des osides (maltotetraose et maltoheptaose) est réalisée avec le triacétoxyborohydrure de sodium comme agent réducteur, réactif présentant l'avantage d'être non toxique contrairement au cyanoborohydrure de sodium. L'amination réductrice peut se faire en une seule étape. La purification a été réalisée sur Sep-Pak ou ZipTip C18.

Des analyses MALDI ont été réalisées en mode réflectron et LIFT sur un spectromètre AutoFlex III Smartbeam (Bruker) avec l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique comme matrices. Dans les deux cas, la molécule protonée MH^+ a pu être observée. Pour les osides dérivés à la procaine, une meilleure sensibilité a observée avec l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque.

Les fragmentations post-sources induites par laser (LID) des ions MH^+ des dérivés à la 2-aminopyridine conduisent à des ions de type y car la charge est piégée sur l'extrémité dérivée des holosides, de manière similaire dans les deux matrices. L'obtention de la séquence en ose peut alors se faire directement. Les ions MNa^+ présentent à la fois des fragmentations post source de type b et y (d'après la nomenclature de Domon et Costello).

Les ions issus des fragmentations post-sources induites par laser (LID) des ions MH^+ des dérivés à la procaine sont majoritairement des ions de type y et z présentant une perte de diéthylamino ethanol (117 u).

Détection d'agents complexants sur supports solides par Désorption-Ionisation par Electrospray (DESI)

Diane Lebeau • Christine Lucas-Lamouroux

CEA-Saclay, DEN/DANS/DPC/SEC/LSRM, Gif-sur-Yvette, France

De nombreux agents complexants inorganiques et organiques présents dans l'environnement influent fortement sur la migration des radionucléides. Parmi ces agents chélatants, des ligands organiques de type acides polyaminocarboxyliques (NTA, EDTA, DTPA, etc.) peuvent créer de fortes réactions de complexation avec certains radionucléides et/ou des métaux lourds. Ils influencent ainsi la mobilité de ces derniers dans les eaux naturelles, ou au contraire, les mobilisent dans les sols et les sédiments. Il est donc aujourd'hui important de disposer d'une méthode analytique permettant de détecter en parallèle ces agents chélatants dans des matrices complexes, et en particulier, sur des supports solides sur lequel ceux-ci sont accumulés (ex, déchets nucléaires).

Parmi les récentes méthodes d'analyse de surface, le domaine de la désorption ionisation par spectrométrie de masse à pression atmosphérique s'est largement développé avec l'introduction du DESI [1]. Grâce à cette technique, il est alors possible de détecter des molécules organiques présentes à la surface d'un échantillon sans préparation préalable.

Nous avons donc développé une méthode d'analyse capable de détecter en parallèle l'EDTA, le NTA et le DTPA sur différents types de supports solides utilisés dans l'industrie nucléaire, tels que du bitume et du béton.

Afin de mettre notre méthode au point, différents supports ont été dopés avec chacune des molécules d'intérêts avant d'être analysés par DESI. Les expériences ont été réalisées sur un appareil LCT Premier (Waters) équipée d'une source DESI Omnispray™ (Prosolia, Inc.). Pour chaque espèce, divers paramètres ont été étudiés, comme l'influence du solvant et la géométrie de la source. Les expériences ont tout d'abord été réalisées et optimisées sur des supports conventionnels (hydrophobes, verre...) avant d'étudier la robustesse de la technique sur des matrices technologiques plus complexes telles que le béton et le bitume.

En mode d'ionisation négatif, ces trois analytes ont ainsi pu être détectés simultanément (respectivement m/z 191, m/z 292 et m/z 393 pour le NTA, l'EDTA et le DTPA) et ce, sur les deux types de surface d'intérêt, le bitume et le béton. A concentration égale, il a été observé

que les rapports signal/bruit obtenus pour une même molécule sont significativement différents d'un support à l'autre. L'influence du support est donc un paramètre essentiel pour la détection de molécules par DESI.

Différentes gammes de concentrations ont ensuite été étudiées, afin de vérifier la linéarité de la réponse observée. Pour une gamme de concentration entre $10\mu\text{g/L}$ à $300\mu\text{g/L}$ pour chacune des molécules, il a été observé une réponse linéaire entre la quantité déposée et l'intensité des pics observés (R^2 0,9890). Les limites de détection ont ensuite pu être évaluées pour être de l'ordre du $\mu\text{g/L}$, limites de détection similaires à celles obtenues par couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse pour la détection de ces mêmes molécules [2].

Parce que la technique DESI crée des ions à l'extérieur de l'instrument, il a été montré que des réactions ions/molécules pouvaient avoir lieu à l'interface entre les microgouttelettes chargées et le support solide [3]. Ainsi, afin d'améliorer les limites de détection précédemment décrites, la méthode dite 'reactive DESI' et le pouvoir complexant de ces molécules avec les métaux comme le fer ont été associés. Une solution de FeIII a ainsi été introduite dans le solvant de désolvatation, permettant ainsi la formation et la détection de complexe non covalent du type [(EDTA-4H)-FeIII]- (m/z 344). La formation de ce complexe a ainsi permis d'augmenter la sélectivité du ligand, et d'ainsi, diviser d'un facteur 1000 les limites de détection de ces molécules.

La détection simultanée de trois acides polyaminocarboxyliques, composés chélatants ayant un impact important sur l'environnement, directement sur support solide et sans préparation d'échantillons par DESI a ainsi été démontrée. Il a, de plus, été observé que la formation d'un complexe non covalent a été rendu possible et permettait d'augmenter spécifiquement la sélectivité de ces agents complexants pour leur détection.

[1] Takats Z, Wiseman JM, Gologan R, Cooks RG, *Science* 306 (2004) 471-3.

[2] Quidant JB, Resmitama T, *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 110-117.

[3] Che H, Cotte-Rodrigue I, Cooks RG, *Chem. Commun.* (2006) 597-599.

P2-023

Quantitative analysis of unique lipids by UPLC-ESI-QTOF: the mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*

S. Fournier(1,2) • F. Laval Vizcaino(3) • L. Spina(3) • V. Puech-Pages(1) • M. Daffé(3) • A. Lemassu(3)

(1)Surfaces cellulaires et signalisation chez les végétaux SCSV UMR 5546-CNRS/Université Paul Sabatier Pôle de Biotechnologies végétales, Castanet-Tolosan • (2)ITAV- Cancéropôle Toulouse • (3)Molecular Mechanisms of Mycobacterial Infections - IPBS-CNRS Toulouse

Mycolic acids are major and specific long chain (C70-C90) α -branched β -hydroxylated fatty acid components of the cell envelope of mycobacteria that include *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis. Subtle structural variations occurring in mycolic acids are known to be crucial for both the virulence of the tubercle bacillus and the permeability of the mycobacterial cell envelope. Although mycolic acid structures are well characterised, it is necessary to understand their role in the pathogenicity of the bacillus. This aim requires the quantitative analysis of the different mycolic acid families in various conditions. In the present study, we addressed the question using ultra-performance-liquid-chromatography coupled to electrospray-ionisation mass spectrometry to perform quantitative analysis of different structures of mycolic acids. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was grown on Sauton's medium. Bacterial residues obtained after lipid extraction with organic solvents were saponified by a mixture of 40% KOH and methoxyethanol (1/7, v/v) at 110°C for 3h in a screw-capped tube. Mycolic acids were analysed on a C18 column (UPLC® BEH 1.7 μ m Waters) on an UPLC system coupled to QTOF Premier (Waters) mass spectrometer with an electrospray ionisation source by elution with an isopropanol/methanol/formic acid gradient.

In order to improve chromatographic resolution, derivatization of mycolic acids by methylation and trimethylsilylation was performed. Quantification in positive mode was found to be efficient for mixture containing 0.2 ng to 2 μ g of total derivatized mycolic acids by ion trace. However, MS/MS could not be used since no significant fragments could be obtained.

The analysis of non-derivatized mycolic acids (free form) was also possible in positive and negative modes, although chromatographic resolution was less than for the derivatized form. Furthermore, significant fragments could be obtained and MS/MS optimal conditions were defined.

Caractérisation structurale de PAMAM et PAMAM modifiés par ESI-MSⁿ et MALDI MS/MS

Emma-Dune Leriche • Corinne Loutelier-Bourbis • Cathrine Lange

UMR CNRS 6014 COBRA, FR CNRS 3830, Equipe de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, UFR des Sciences, Université de Rouen

Depuis les années 2000, un intérêt grandissant est porté aux PAMAM en raison de leur capacité à transporter des molécules d'intérêt thérapeutique et de leur potentialité à être utilisés en tant qu'agents de transfection non viraux. Cependant, ces composés, bien que prometteurs présentent une cytotoxicité liée au caractère cationique de leur surface.

Tout récemment, des modifications chimiques de la surface de ces macromolécules ont été envisagées pour augmenter leur efficacité et minimiser leur cytotoxicité. Certaines modifications ont ainsi été décrites dans des articles publiés dans des revues internationales mais essentiellement axés sur l'aspect biologie - cytotoxicité. Dans cette perspective, nous avons envisagé de synthétiser des demi-génération G-0.5 et des générations G0 avec les cœurs amine et EDA (éthylène diamine) 1, puis de les modifier par des acides aminés aromatiques². Leur caractérisation structurale incluant l'identification des processus de fragmentation a été réalisée par des expériences ESI-MSⁿ (electrospray-spectrométrie de masse multiple) 3 et MALDI-MS/MS (désorption-ionisation laser assistée par matrice-spectrométrie de masse en tandem). Les analyses MS/MS à partir des précurseurs protonés et sodés (GnH⁺ et GnNa⁺ (n= 0.5 et 0)) ont montré des ions fragments caractéristiques des PAMAM. Cependant dans le cas du PAMAM G-0.5 avec cœur amine, de nouveaux ions fragments ont été observés; des hypothèses de mécanismes de fragmentations nous ont permis de déterminer des pertes de neutres spécifiques de la molécule.

1- Janel PETERSON, Arkaali EBBER, Veiko ALLIKMAA, and Margus LOPP, Synthesis and UZE analysis of PAMAM dendrimers with an ethylenediamine core, Proc. Estonian Acad. Sci. Chem., 2001, 50, 3, 156-166

2- Gaëlle Coeussat and Guy Zubot, Supporting information for Self-assembling Polyethyleneimine Derivatives Mediate Efficient siRNA Delivery in Mammalian Cells, CHEMBIOCHEM Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2008

3- Thomas J.-C. Vincent, Romain Dole and Catherine M. Lange, Gas-phase fragmentation of half- and first-generation polyamidoamine dendrimers by electrospray mass spectrometry using a quadrupole ion trap, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2008, 22, 363-372

Identification de la régiospécificité de triglycérides mixtes par la méthode cinétique de Cooks

Akwasi Acheampong • Nathalie Leveque • Sylvie Heron • Alain Tchaplal

Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud EA 4041, LETIAM, IUT d'Orsay (Université Paris Sud), Orsay, France.

Les lipides, qu'ils soient d'origine animale ou végétale, sont des mélanges complexes. Les constituants fortement majoritaires des graisses et huiles (90 à 99 %) sont les triglycérides (TAGs), triesters d'acides gras du glycérol. La connaissance de la distribution régiospécifique des acides gras sur la chaîne du glycérol est nécessaire pour résoudre de nombreux problèmes liés à leur métabolisation. De manière générale, la détermination de la nature de l'acide gras en position sn-2 peut être réalisée par voie enzymatique, par voie magnésienne ou par voie analytique (RMN, Ag-HPLC). Une nouvelle méthode développée au laboratoire a permis de distinguer les stéréoisomères des TAGs par LC-MS. Il s'agit d'une méthode rapide et simple. Toutefois, elle présente l'inconvénient de n'être pas suffisamment sensible pour les TAGs présents en très faible quantité.

L'objectif de notre travail a consisté à développer une nouvelle méthode par LC-MS afin de distinguer les isomères de position des TAGs. Cette méthode s'appuie sur la méthode cinétique de Cooks. Le principe de cette méthode repose sur l'étude de la décomposition d'un dimère cationisé $[M-Cat-Ref]^+$ entre la molécule choisie (M), un cation (Cat) et un composé de référence (Ref). Pour cette étude, nous avons choisi comme molécule M, les TAGs POO et OPO. Plusieurs cations (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ , Cu^+ , Co^{2+}) ont été testés ainsi que plusieurs composés de référence (SOO, OSO, OOO, LLL, LnLnLn, PPO, POP). Ces études ont permis de mettre en évidence que le cation Li^+ et la référence OOO permettent de distinguer les stéréoisomères POO et OPO.

P2-026

Identification des triglycérides présents dans une huile d'arachide de Tunisie (*Arachis hypogaea* L.) par LC-MS. Étude de trois variétés locales

A. O. Cberif(1) • N. Leveque (2) • M. Ben Messaouda (3) • B. Kâabi (4), • H. Kallel(1) • E. Moussa(2)

(1)Labo. de biochimie des lipides et interactions avec les macromolécules, fac. des sciences de Tunis, Univ. Tunis-El-Manar, Tunisie, • (2)LETIAM, Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud, EA4041, IUT d'Orsay, France. • (3)Unité de physico-chimie moléculaire, BP51 IPEST, La Marsa, Tunisie
(4)Labo. d'Epidémiologie et d'écologie des parasites, inst. de Pasteur de Tunis, Tunisie.

L'identification et la séparation de triglycérides (TAGs) en HPLC couplée ou non à la spectrométrie de masse a déjà été développée avec succès. Cependant, l'analyse est en général précédée de plusieurs étapes de séparation et la détection est peu sensible. Or, il existe des matrices dans lesquels les TAGs sont présents en très faible quantité, ce qui requière le passage à des techniques plus sensibles.

Afin de pouvoir identifier l'ensemble des TAGs présents dans différentes variétés d'une huile d'arachide de Tunisie, une méthode sensible, utilisant une phase mobile non aqueuse couplée à la spectrométrie de masse (NARPLC-MS) avec ajout d'argent en post-colonne, a été employée. La séparation des TAGs a été réalisée avec une colonne Nucleosil 100Å C18 (150 x 2,1mm i.d., 3µm, Macherey Nagel). Les analyses ont été effectuées avec une source ESI et une trappe d'ions (LCQ, Thermo Fisher).

Les résultats obtenus ont montré la présence de plus de 30 TAGs dans l'huile d'arachide provenant de Tunisie. Parmi ces TAGs, certains sont rares. Il s'agit, en effet, de TAGs à nombre impair de carbone. De plus, les concentrations des TAGs identifiés sont différentes d'une variété à une autre.

P2-026

Identification des triglycérides présents dans une huile d'arachide de Tunisie (*Arachis hypogaea* L.) par LC-MS. Étude de trois variétés locales

A. O. Cberif(1) • N. Leveque (2) • M. Ben Messaouda (3) • B. Kâabi (4), • H. Kallel(1) • E. Moussa(2)

(1)Labo. de biochimie des lipides et interactions avec les macromolécules, fac. des sciences de Tunis, Univ. Tunis-El-Manar, Tunisie, • (2)LETIAM, Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud, EA4041, IUT d'Orsay, France. • (3)Unité de physico-chimie moléculaire, BP51 IPEST, La Marsa, Tunisie
(4)Labo. d'Epidémiologie et d'écologie des parasites, inst. de Pasteur de Tunis, Tunisie.

L'identification et la séparation de triglycérides (TAGs) en HPLC couplée ou non à la spectrométrie de masse a déjà été développée avec succès. Cependant, l'analyse est en général précédée de plusieurs étapes de séparation et la détection est peu sensible. Or, il existe des matrices dans lesquels les TAGs sont présents en très faible quantité, ce qui requière le passage à des techniques plus sensibles.

Afin de pouvoir identifier l'ensemble des TAGs présents dans différentes variétés d'une huile d'arachide de Tunisie, une méthode sensible, utilisant une phase mobile non aqueuse couplée à la spectrométrie de masse (NARPLC-MS) avec ajout d'argent en post-colonne, a été employée. La séparation des TAGs a été réalisée avec une colonne Nucleosil 100Å C18 (150 x 2,1mm i.d., 3µm, Macherey Nagel). Les analyses ont été effectuées avec une source ESI et une trappe d'ions (LCQ, Thermo Fisher).

Les résultats obtenus ont montré la présence de plus de 30 TAGs dans l'huile d'arachide provenant de Tunisie. Parmi ces TAGs, certains sont rares. Il s'agit, en effet, de TAGs à nombre impair de carbone. De plus, les concentrations des TAGs identifiés sont différentes d'une variété à une autre.

Appearance of nitrogenised azaphilones, secondary metabolites from fungi *Hypoxylon Fragiforme* under the unusual electrospray conditions

Ljubica Svilar(1,2) • Vesna Stankov-Jovanovic(2) • Denis Lesage(1) • Sandra Alves(1) • Jean Claude-Tabet(1)

(1) Université Pierre et Marie Curie, Paris, France • (2) Faculty of Science and Mathematics, University of Nis, Serbia

Azaphilones present a wide class of fungal metabolites with diverse biological activities, such as antimicrobial, antifungal, cytotoxic, nematocidal(1)... Many of these reactivities can be explained by their potential to promote nucleophilic attack to amino group, coming from amino acids, proteins and nucleic acids. It results in the formation of the vinylogous γ -pyridones due to the exchange of pyran-oxygen by nitrogen during a complex pathway. Because of their property to react with amino group, they were named azaphilones.

In the earlier works, the azaphilones were mostly examined by HPLC/UV, by this way, they are isolated and analyzed(2). Reaction of azaphilones with amino group was detected by the LC/MS experiments of *Hypoxylon Fragiforme* crude extract under unconventional electrospray conditions. For all detected azaphilones, at different retention times were noticed ions differing for one Th unit, while the abundance of new derivatives was not high as already existing azaphilones in the fungal extract. Probably, due to these reasons, peaks of these derivatives in UV or DAD chromatogram were not obvious, and these compounds were not detected. By ITMS, m/z values of protonated derivated azaphilones were detected. FTMS gave accurate elemental compositions consisted with the presence of nitrogen derivatives of existing azaphilones.

Sampling has been done on the conventional way. Methanol extracts were purified by SPE, and as that, crude extracts were analyzed by HPLC/ESI/MS, HPLC/ESI/FTMS and HPLC/ESI MSMS. MSMS experiments were used for confirmation of both the azaphilon and their derivative structures. By applying different conditions in electrospray ionisation, from soft to hard desolvation conditions, we will try in this work to show the dependence of naturally occurring nitrogen-containing azaphilone detection from the electrospray conditions.

The first detection of the nitrogen-containing azaphilon derivatives by high resolution mass spectrometry can be of a high significance for further analysis of fungal secondary metabolites.

(1) N. Oumamova, W. Schultze, N. Ayoubi: Azaphilones: a class of fungal metabolites with a diverse biological activities; *Phytochem Rev* DOI 10.1007/s11101-010-9171-3

(2) M. Stadler, H. Wollweber: Secondary metabolite profiles, genetic fingerprints, and taxonomy of *Daldinia* and allies; *Mycotaxon* Volume LXXVII, pp. 379-429

(3) W-G. Wei and Z-J. Yao: Synthesis studies toward Chloroazaphilone and Vinylogous γ -Pyridones: Two common Natural Product Core Structures; *J. Org. Chem.* 2005, 70, 4585-4590

Identification d'arabinoxylanes d'*Eragrostis nindensis* par ESI/MSn et GC/MS

C. Loutelier-Bourhis(1) • B. Plancot(2) • M. Vicré-Gibouin(2) • M. Bardot(2) • J.M. Farrant(3) • A. Drionich(2)
C. M. Lange(1)

(1)Université de Rouen, UMR CNRS 6014 - Colne, FR 3038, Mont Saint Aigne, France • (2)Université de Rouen, Laboratoire GLYCO MEV EA4358, IFRMP 23, Mont Saint Aignan, France • (3)Molecular and Cell Biology Dept, University of Cape Town, Private Bag, Rondebosch, 7701, South Africa

Eragrostis nindensis est une graminée reviviscente présentant la remarquable capacité de survivre à une déshydratation quasi-totale (plus de 95% d'eau) de ses tissus végétatifs, sans subir de dommages permanents. Les plantes reviviscentes constituent un modèle d'étude intéressant pour comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques impliqués dans la tolérance à la dessiccation et permettre à terme d'améliorer le rendement des plantes de grandes cultures dans les régions semi-arides. Pour faire face à la dessiccation, les plantes reviviscentes doivent faire face à de nombreux stress dont le stress mécanique lié à la perte de turgescence. De récentes études ont montré l'importance de la paroi cellulaire dans les mécanismes de tolérance à la dessiccation (Vicré et al., 2004 a,b; Moore et al., 2006, 2008). L'objectif de nos travaux est de déterminer si la paroi cellulaire joue un rôle dans la tolérance à la dessiccation chez *E. nindensis*. La plante *E. tef*, sensible à la dessiccation, est utilisée comme plante contrôle.

L'analyse structurale du digestat de la paroi totale par l'endoxylanase (clivage spécifique des liaisons beta-1-4 du squelette xylane) montre la présence d'arabinoxylanes identifiés par la combinaison d'expérience ESI/MSn et GC/MS.

La composition en monosaccharides a été déterminée par GC/MS après hydrolyse du digestat par méthanolyse et triméthylsilylation.

Des informations sur la structure des oligosaccharides (le type de liaisons, la position des arabinoses ou d'autres substituants) ont été obtenues par ESI/MS2 et MS3 : les spectres montrent des séries d'ions séquentiels B, Y mais aussi O₂A et Z₂A.

- Moore J. P., Ngunjiri-Ong'ala E., Chevalier L., Lindsey G., Brandt W. E., Lerouge P., Farrant J. M. and Drionich A. (2006) Response of the Leaf Cell Wall to Desiccation in the Resurrection Plant *Myrothamnus flabellifolius* *Plant Physiology* 141:651-662.

- Moore J. P., Vicré-Gibouin M., Farrant J. M. and Drionich A. (2008) Adaptation of higher plant cell wall to water loss: drought vs desiccation *Physiologia Plantarum* 134: 237-245.

- Vicré M., Farrant J. M. and Drionich A. (2004a) Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species *Plant, Cell and Environment* 27:1329-1340.

- Vicré M., Lerouge O., Farrant J. M., Lerouge P. and Drionich A. (2004b) Composition and desiccation-induced alterations of the cell wall in the resurrection plant *Craterostigma wilmsii* *Physiologia Plantarum* 120:229-239.

Etude de réactions amorcées sous rayonnement UV entre la benzophénone et des molécules modèles porteuses de groupements fonctionnels caractéristiques d'un polyamide

M. N'Négué Mintsá(1) • I. Lecamp(1) • C. Loutelier-Bourbis(2) • C. M. Lange(2) • S. Baumgarten(3) • C. Bunel(1) (1) INSA de Rouen, PBS L2M, UMR CNRS 6270, FR 3038, St-Etienne du Rouvray, France • (2)Univ. de Rouen, UMR CNRS 6014, COBRA, FR, Mont Saint Aignan, France • (3)Univ. P. et M. Curie Paris VI, SSEM, CNRS UMR 7613, Groupe de spectrométrie de masse, Paris, France

Les réactions de photopolymérisation sont utilisées au cours de nombreux procédés industriels pour l'élaboration de nouveaux matériaux polymères dans les domaines des revêtements de surface, des adhésifs, de l'impression ou la lunetterie...

Les mécanismes réactionnels mis en jeu lors des polymérisations radicalaires photoinduites en présence de benzophénone sont ici étudiés au moyen de différentes molécules modèles représentatives des fonctions présentes dans un polyamide photoréticulable. L'identification et l'étucidation structurale des produits issus des réactions radicalaires a nécessité le recours à des expériences ESI/MSⁿ ainsi qu'à la très haute résolution en MS/MS.

Ainsi, la réactivité sous UV de standards d'acides carboxyliques saturé et insaturé, d'amine, d'amides saturé et insaturé en présence du photoamorceur benzophénone a conduit à l'observation de plusieurs combinaisons d'oligomères résultant:

- d'un couplage entre la benzophénone et les différentes molécules modèles d'une part,
- de couplage entre molécules modèles d'autre part,
- et de l'addition des radicaux sur les insaturations.

L'arrachement d'hydrogène radical en position alpha des fonctions acide, amine et amide s'avère le plus probable mais il peut également se produire sur les fonctions amine et amide.

P2-030

Benefits of Ion Mobility Mass Spectrometry for dendrimer analytical investigations

Maire Florian(1) • Coadou Gaël(2) • Loutelier Corinne(1) • Cravell Laetitia(2) • Lange Catherine(1)

(1)Université de Rouen, UMR 6014 CNRS COBRA, F-76821 Mont Saint Aignan, France • (2)Waters Corporation, Manchester, United Kingdom

Mass Spectrometry is one of the characterisation method regularly used in dendrimer chemistry. This is an appropriate analytical technique to monitor syntheses, determine chemical composition, relative molar mass and also to investigate structural defects .

The coupling of Ion Mobility with Mass Spectrometry allows a postionization separation before sorting the ions by mass-to-charge ratios. Molecules are ionized (usually by ESI or MALDI) and guided to a mobility cell which is filled with a buffer gas. In the Travelling-Wave device (Waters corp., Manchester), ions are separated as they drift through the cell under the influence of a moving electric field . The time required by an ion to traverse the ion mobility cell is dependant on ion charge, size and shape . Next, the streams of separated ions are sorted by the mass analyzer and finally detected.

In this poster, practical examples with polyamidoamine dendrimers will serve to illustrate that Ion Mobility Mass Spectrometry allows reaching an additional level of information with the possibility to estimate dendrimer dimension in the gas phase. Benefits in structural investigations will also be discussed.

Distinction et quantification d'isomères de di- et de tri-saccharides en mélange binaire par la méthode cinétique

Mohamed Major • Thierry Fouquet • Laurence Charles

Laboratoire Chimie Provence, UMR 6264, Equipe Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale, Aix-Marseille Université I, II et III – CNRS, Campus de St Jérôme, Marseille (France).

Dans le cadre de la recherche d'énergies renouvelables, l'amélioration et l'optimisation des procédés de conversion de la biomasse nécessitent des méthodes d'analyse structurale extrêmement précises et sensibles. Les techniques analytiques permettant l'étude des oligosaccharides, issus de la digestion enzymatique ou de la dégradation chimique de fibres végétales, sont diverses. La résonance magnétique nucléaire est capable de caractériser des isomères de polysaccharides mais se heurte rapidement à la complexité des signaux lors d'analyses de mélanges. Les méthodes chromatographiques sont très efficaces pour séparer des sucres isomères ou énantiomères mais sont longues à mettre en œuvre. La discrimination purement qualitative de pentoses et d'hexoses par comparaison du profil de fragmentation induite par collision d'adduits métalliques est une méthode déjà largement utilisée en spectrométrie de masse, mais la quantification d'isomères en mélange binaire ou ternaire nécessite la comparaison de l'abondance de plusieurs ions fragments dans le spectre MS/MS couplée à un développement d'algèbre matricielle.

Les travaux présentés ici mettent en évidence une nouvelle application de la méthode cinétique permettant la distinction et la quantification en mélange binaire d'isomères de disaccharides et de trisaccharides. Basée sur une précédente étude qui a permis une distinction isomérique de monosaccharides,² ces travaux montrent qu'il est possible de rationaliser l'optimisation des systèmes métal/référence pour discriminer des homologues supérieurs. L'analyse isomérique quantitative de quatre disaccharides (D-maltose, D-cellobiose, D-saccharose, D-lactose) et de quatre trisaccharides (D-maltotriose, D-celotriose, D-panose et D-isomaltotriose) a pu être réalisée. Une procédure de calibration à trois points a été appliquée pour pallier à la non-linéarité des réponses, induite par des effets de compétition entre analytes lors de la formation du complexe trimérique.

¹ Cooks, R. G. and Kruger T. L. J. *Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 1279.

² Fouquet T. and Charles L. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2010, 21, 60

Exploration de l'organisation des dépôts MALDI par RMN du solide

Yannis Major • Hélène Pizzala • Laurence Charles • *Laboratoire Chimie Provence, UMR 6264, Equipe Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale, Aix-Marseille Université I, II et III – CNRS, Campus de St Jérôme, Marseille (France)* • Fabio Ziarelli • *Fédération des Sciences Chimiques – CNRS, FR1739, Spectropole, Aix-Marseille Université I, II et III – CNRS, Campus de St Jérôme, Marseille (France).*

La technique d'ionisation MALDI s'est rapidement imposée comme la méthode de choix pour l'ionisation des polymères synthétiques car elle permet l'ionisation de chaque oligomère sous la forme d'adduits monochargés et, par conséquent, donne lieu à des spectres de masse plus simples. Tant que la polydispersité du polymère n'est pas trop élevée, la technique MALDI se compare avantageusement à d'autres techniques mises en œuvre pour la détermination des masses moléculaires en raison de sa sensibilité et de sa rapidité. Toutefois, un problème majeur qui limite l'application généralisée de la technique MALDI est la mauvaise connaissance des processus fondamentaux qui régissent la désorption et l'ionisation des analytes. En conséquence, le développement de méthodes de préparation des échantillons MALDI reste assez empirique et devient extrêmement difficile quand il s'agit de systèmes polymériques complexes. Un point-clé de la réussite d'une analyse MALDI-MS est la préparation des échantillons, avec notamment la sélection appropriée de la matrice et du cation. La technique MALDI souffre également d'une forte dépendance du mode de préparation du dépôt solide matrice/polymère/sel.

Nous avons récemment montré que la résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide était un outil de choix pour explorer l'organisation moléculaire au sein des dépôts MALDI.(1) Cette approche a permis d'établir clairement que la présence de certains groupes fonctionnels dans la molécule de matrice jouaient un rôle important dans le processus de cationisation du poly(éthylène glycol) (PEG). Cette étude propose d'utiliser la RMN du solide pour sonder la structure d'échantillons préparés par la méthode sans solvant et broyés au vortex. Cette méthode de préparation des échantillons permet de s'affranchir des inconvénients liés à l'utilisation de solvants tout en procurant des données MALDI de qualité,(2) et apparaît donc comme une méthode qui devrait simplifier notre compréhension des relations entre la structure des dépôts et le processus d'ionisation MALDI. Des mélanges solides de PEG, d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et de chlorure de césium ont été préparés puis analysés par RMN du solide et MALDI-MS. Les résultats obtenus montrent que l'ordre dans lequel sont broyés les trois constituants

influence fortement les interactions intermoléculaires au sein du mélange solide et, de là, la qualité du signal spectral voire la nature des adduits cationiques formés par MALDI.

(1) Tranqui S., Rouhampour A., Az R., Radler HJ and Mullen K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001; 15: 1364

(2) Pizzala H., Barriere C., Mazarin M., Ziarelli F and Charles L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009; 20: 1906

Size effect in tandem mass spectrometry: the survival yield technique as a tool for structural analysis

A. Memboef(1,4) • A. Nasioudis(2) • S. Indelicato(1,5) • A. Kuki(3) • S. Kéki(3) • O. Van Den Brink(2) • K. Vékey(1) L. Drahos(1)

(1)Hungarian Academy of Sciences, Institute of Structural Chemistry, Budapest • (2)AkzoNobel, Research, Development & Innovation, Deventer, The Netherlands • (3)University of Debrecen, Institute of Applied Chemistry, Hungary • (4) Fourier University, Department of Molecular Chemistry, Grenoble, France • (5)University of Palermo, Department of Chemical and Pharmaceutical Technologies, Palermo, Italy

Collision Induced Dissociation mass spectrometry is an indispensable and powerful tool to investigate in detail molecular structures; it is generally easy to perform and is widely available in different type of mass spectrometers. Tandem MS experiments based on collisional activation require ions to be excited through a certain number of energetic collisions with neutral species, to increase their internal energy above the dissociation threshold within the experimental timescale.

A wide mass range and variety of molecules is studied using this method, and all these studies are performed in a variety of instruments and under very different experimental conditions. The question can now be raised upon how the fragmentation observed depends on the size and the structure of the ion excited and how the experimental conditions affect the fragmentation behavior.

We present here a systematic study on the size dependent fragmentation of a variety of polymers, viz. polyethers, polyesters and polyacrylates, in relation to their size (ranging from ~ 200 Da up to 4.5 kDa) and under different experimental conditions: e.g. ESI-QqQ, ESI-QToF and especially ESI-qIT which altogether cover the most common ranges of energetics and timescales in instrumental MS.

After having defined the Survival Yield technique, we will present the linear relationship observed between required fragmentation energy and size of the molecular ion, other parameters or variables remaining constant. We will also demonstrate this result to be instrument-independent suggesting the prevalence of the "degrees of freedom effect".

Finally, it will be shown how this technique can be used in the study of a variety of polymer classes (namely polyethers, polyesters and polyacrylates) and, as a consequence, which type of additional information can be gained from it.

This work is part of the Marie Curie POLY-MS project granted by EU under the contract number MEST-CT-2005-021029.

P2-034

Mesure des constantes de stabilité de complexes protéine/protéine par ESI-MS

A. Mème(1) • L. Guidat(1) • F. Hannemann(2) • R. Bernhardt(2) • E. Leize(1)

(1)Labo. de Dynamique et Structure Moléculaire par Spectrométrie de Masse, Institut de Chimie – UMR 7177 CNRS-ULP, Strasbourg •

(2)Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Fachrichtung 8.8 – Biochemie Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Allemagne

La plupart des processus biologique sont dépendants de la formation de complexes entre protéines. Par conséquent, la modulation des complexes de protéines et donc de leurs fonctions offre de nouvelles opportunités pour la recherche médicale [1].

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au complexe formé entre l'adrénodoxine Adx et l'adrénodoxine réductase AdR, qui fait partie du système mitochondrial de biosynthèse des stéroïdes chez les vertébrés [2]. En effet, il a été montré que trois polyamines, la putrescine, la spermidine et la spermine, avaient un effet modulateur sur les interactions de ce système à des concentrations similaires aux concentrations physiologiques [3].

Afin de mieux comprendre l'influence de ces polyamines sur les interactions entre Adx et AdR, une mesure fiable des constantes de stabilité des complexes Adx/AdR associés aux modulateurs est nécessaire. Les constantes de dissociation du complexe Adx/AdR associé à la putrescine, la spermidine et la spermine ont déjà été déterminées par résonance plasmonique de surface (SPR)[3]. Or cette technique est parfois sujette à controverse.

Dans le but de confronter les résultats obtenus par SPR avec une autre technique de détermination des constantes de stabilité, nous avons développé une approche par spectrométrie de masse. Cette approche a tout d'abord été testée sur le complexe Adx/AdR, puis sur le complexe associé à la putrescine, la spermidine et la spermine.

1. Wells, J. A.; McClendon, C. L., *Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces.* *Nature* 2007, 450 (7172), 1001-1009.

2. Gruberg, A. V.; Hannemann, F.; Schiffler, B.; Müller, J.; Heinemann, U.; Bernhardt, R., *Adrenodoxin: Structure, stability, and electron transfer properties.* *Protein-Structure Function and Genetics* 2000, 40 (4), 590-612.

3. Berwanger, A.; Eynich, S.; Schuster, I.; Helm, U.; Bernhardt, R., *Polyamines: Naturally occurring small molecule modulators of electrostatic protein-protein interactions.* *Journal of Inorganic Biochemistry* 2010, 104 (2), 118-125.

MALDI-MS des polymères synthétiques à groupement terminal labile : une nouvelle approche

V. Monnier(1) • T. Trimaille(2) • S. Viel(3) • D. Gigmes(2) • L. Charles(3)

(1)Fédération des Sciences Chimiques, CNRS, FR1739, Spectropôle • (2)Laboratoire Chimie Provence, UMR 6264, Equipe Chimie Radicalaire, Organique et Polymères de Spécialité • (3)Laboratoire Chimie Provence, UMR 6264, Equipe Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale, Aix-Marseille Université I, II et III - CNRS, Campus de St Jérôme, Marseille (France).

Les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) sont très largement utilisées pour synthétiser divers types de polymères de faibles indices de polydispersité en maîtrisant leur taille. Parmi ces techniques, la polymérisation assistée par nitroxyde (NMP) repose sur le piégeage réversible de radicaux polymères par l'espèce radicalaire stable qu'est le nitroxyde. Parmi les radicaux les plus utilisés, le nitroxyde SG1 (N-(2-méthylpropyl)-N-(1-diéthylphosphono-2,2-diméthyl propyl)-N-oxyl) permet la synthèse de copolymères à blocs amphiphiles de type poly(oxyde d'éthylène)/polystyrène mais aussi la croissance de segments acrylates.

Cependant, l'homolyse réversible de la liaison C-ON (entre la dernière unité du bloc en croissance et le groupement terminal nitroxyde) qui est la base du processus NMP devient un inconvénient majeur lorsqu'il s'agit de caractériser ces macromolécules par spectrométrie de masse après ionisation MALDI. En effet, le nitroxyde SG1 est de fait un groupement terminal labile qui est éliminé sous forme radicalaire lors de l'ionisation, ce qui ne permet plus une analyse fiable des groupements terminaux du polymère synthétique. Une précédente étude a montré que lorsque le processus d'ionisation favorisait la protonation spécifique de l'azote du nitroxyde (1), la liaison C-ON liant SG1 au polymère était renforcée et des adduits cationiques intacts produits en phase gazeuse (2). Toutefois, les polymères synthétiques présentant une affinité protonique d'autant plus faible que leur taille augmente, cette méthode reste limitée à l'étude de petits oligomères.

Cette étude montre qu'une modification chimique du groupement terminal à l'issue de la polymérisation permet de renforcer la liaison C-ON et de conserver le groupement terminal lors de l'analyse MALDI. La réaction du polymère synthétisé avec l'acide trifluoroacétique engendre l'élimination du groupement tert-butyl porté par l'azote du nitroxyde, transformant le nitroxyde SG1 en un groupement terminal N-(1-diéthylphosphono-2,2-diméthyl propyl)-N-oxyl comme indiqué par résonance magnétique nucléaire. Cette méthodologie a été appliquée à l'analyse de poly(oxyde d'éthylène)s, de polystyrènes et de poly(butyl acrylate)s.

(1) Mazarin M., Phan T.N.T. and Charles L. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2009 ; 22 : 3776

(2) Mazarin M., Girard M., Viel S., Phan T.N.T., Marque S.R.A., Humbul S. and Charles L. *Macromolecules* 2009 ; 42 : 1849

Profil et Caractérisation de caroténoïdes de cyanobactéries par LC-ESI-MS/MS

F. Perreau • J.-M. Routaboul • A. Marion-Poll • Institut J.-P. Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech, INRA Centre de Versailles-Grignon, France • A. Wilson • Diana Kirilovsky • CEA, Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBt(Tic-S)), CNRS, URA 2906, Gif sur Yvette, France.

Lorsque la lumière est trop intense, les organismes photosynthétiques disposent de mécanismes de photoprotection par dissipation thermique de l'excès d'énergie absorbée. Si ces processus sont plutôt bien décrits chez les plantes supérieures, ils n'ont été étudiés que récemment chez la cyanobactérie (ou algue bleue), *Synechocystis* PCC6803. Cette photoprotection fait intervenir l'activation d'une protéine soluble appelée OCP (Orange Carotenoid Protein) liée à un caroténoïde spécifique, l'hydroxyéchinénone [1]. Pour comprendre ce mécanisme et sa spécificité par rapport au caroténoïde, nous avons produit des cyanobactéries mutantes pour lesquelles la biosynthèse des caroténoïdes a été altérée. La technique de mutagenèse dirigée a été utilisée pour modifier certains acides aminés de la protéine afin de préciser ceux essentiels à l'interaction avec le caroténoïde et au processus de photoprotection [2]. Après avoir purifié les protéines OCP des différents génotypes mutants, nous en avons extrait les caroténoïdes associés et les avons analysés en associant les analyses LC-UV, un profilage par LC-ESI-MS et une caractérisation par LC-ESI-MS/MS en mode positif.

La comparaison à des étalons connus, ainsi que des raisonnements sur la fragmentation avec perte de certains groupements, la structure et la biosynthèse des caroténoïdes, nous ont permis d'identifier 8 caroténoïdes différents dans les cyanobactéries sauvage ou mutantes. L'étude des différents mutants par spectrométrie de masse a montré en particulier que d'autres caroténoïdes peuvent remplacer l'hydroxyéchinénone native et permettre l'activation de l'OCP. Ces caroténoïdes nécessaires à l'activation possèdent tous un groupement terminal cétonique 3-oxo- β . La LC-MS(/MS) s'est donc révélée essentielle pour déterminer l'ensemble des caroténoïdes en interaction avec les différentes OCP.

[1] A. Wilson, C. Punginelli, A. Gall, C. Bouratti, M. Alexandre, J.M. Routaboul, C.A. Kerfeld, R. van Grondelle, B. Robert, J.T.M. Kennis, D. Kirilovsky, (2008) A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12075-12080.

[2] A. Wilson, J. N. Kinney, P. H. Zwart, C. Punginelli, S. D'Haese, F. Perreau, M. G. Klein, D. Kirilovsky, C. A. Kerfeld, (2010) Structural Determinants Underlying Photoprotection in the Photoactive Orange Carotenoid Protein of Cyanobacteria, *J. Biol. Chem.* 285(24), 18364 - 18375.

P2-037

Apport du couplage IM-MS pour la caractérisation de peptides isobares

Stéphanie Petiot • Hélène Diemer • Alain Van Dorsselaer • Sarah Sanglier-Cianférani

Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO), IPHC-DSA, Université de Strasbourg, Uds, CNRS, UMR7178, Strasbourg, France

Les modifications post-traductionnelles (PTM) des protéines sont impliquées dans le contrôle de différents processus cellulaires comme la division cellulaire, la transduction du signal ou la régulation fine des voies métaboliques. Malgré la multiplicité des stratégies analytiques et les importants développements instrumentaux réalisés ces dernières années en spectrométrie de masse (MS), notamment au niveau de la sensibilité de détection, la caractérisation fine et la localisation des ces PTMs reste encore délicate. Celle-ci devient un véritable défi dans le cas de peptides isobares (peptides de mêmes masses).

Depuis quelques années, est apparu un couplage intéressant : le couplage de la spectroscopie de mobilité ionique avec la spectrométrie de masse (IM-MS). Celui-ci permet désormais d'accéder à des informations sur la conformation des ions en phases gazeuses par la mesure de section efficaces rotationnelles. Cette nouvelle approche présente un fort potentiel pour la séparation de peptides isobares qui ne peuvent être différenciés en MS.

Nous souhaitons ici illustrer les potentialités du couplage IM-MS pour la caractérisation de peptides isobares. Nous avons mis à profit les capacités séparatives de la cellule de mobilité ionique du Synapt HDMS G2 (Waters) pour séparer des peptides isobares portant différentes PTMs (peptides phosphorylés isobares, peptides acétylés versus triméthylés, etc.). Après passage dans la cellule de mobilité ionique, les peptides d'intérêt sont fragmentés. Le couplage IM-MS présente alors l'avantage de permettre en une unique analyse IM-MS/MS de : 1) séparer des peptides isobares et 2) déterminer l'acide aminé modifié par MS/MS.

P2-038

Caractérisation structurale des molécules impliquées dans le dialogue moléculaire lors de la symbiose mycorhizienne

V. Puech-Pagès • V. Gomez-Roldan • V. Poinsot • O. André • F. Maillet • J. Dénarié • G. Bécard

Univ. de Toulouse UPS-CNRS ; Surface Cellulaire et Signalisation chez les Végétaux, Castanet-Tolosan, France.

Les racines des plantes interagissent avec un grand nombre de microorganismes, dont certains sont pathogènes, d'autres bénéfiques. La symbiose mycorhizienne, très ancienne (450 millions d'années) et très répandue, s'établit entre la plupart des plantes terrestres et les champignons mycorhiziens (Glomeromycota). Lors de cette symbiose, le champignon apporte de l'eau et des minéraux à la plante et récupère en échange des oses. La croissance d'une plante mycorhizée est augmentée, ainsi que sa résistance à certaines maladies, ce qui présente un intérêt important pour une exploitation de cette symbiose en agriculture durable.

Depuis plusieurs années, l'équipe de G. Bécard s'intéresse aux mécanismes de reconnaissance des deux partenaires dans l'étape pré-symbiotique. Dans un premier temps, nous avons réalisé la caractérisation des molécules végétales permettant l'activation du champignon mycorhizien, les strigolactones (Besserer et al, 2006, Gomez-Roldan et al, 2008), via une collaboration avec l'équipe de JC Portais (INSA). Dans un second temps, nous caractérisons les molécules fongiques activant la plante, les facteurs myc, via une collaboration avec l'équipe de J Dénarié (LIPM) et V. Poinsot (IMRCP).

Ces molécules sont caractérisées par spectrométrie de masse, LC-Q-TOF (ITAV) et LC-Q TRAP (plateforme Metatoul).

P2-039

Directed Photo-induced Dissociation pathway of Heparin-Derived Oligosaccharides by controlling charge location

Amandine Racaud(1,2) • Rodolphe Antoine(1) • Philippe Dugourd(1) • Jérôme Lemoine(2)

(1)Université de Lyon, France, Université Lyon 1, Villeurbanne ; CNRS, UMR 5579, LASIM. • (2)Université de Lyon, France, Université Lyon 1, Villeurbanne, CNRS, UMR 5180, Sciences Analytiques

The development of strategies based on mass spectrometry to help for deep structural analysis of acidic oligosaccharides remains topical. We thus examined the dissociation behavior of deprotonated ions of heparin-derived di- to octa- saccharides under UV irradiation at 220 nm. Depending on the ionization state of the carboxylic groups, an oxidized species issued from electron photodetachment was observed in complement to photo-induced fragmentation of precursor ions. The influence of the charge location in the oligosaccharide dianions on the balance between photodissociation and electron photodetachment is examined and a way to direct the relaxation pathways, UVPD or EPD, is proposed using sodium adducts. The oxidized species was subjected to activated-electron photodetachment (activated-EPD) leading to complementary informative fragment ions to those issued from photodissociation. Directed photo-induced dissociation at 220 nm and activated-EPD should complement the more conventional CAD and IRMPD activation modes for deeper structural analysis of acidic oligosaccharides-derived anions.

Mise en place d'un crible d'analyse de la dégradation enzymatique de polysaccharides par spectrométrie de masse MALDI-TOF

D. Ropartz(1) • P.-E. Bodet(1) • D. Bertrand(1) • H. Rogniaux(1) • C. Przybyłski(2) • F. Gonnet(2) • R. Daniel(2) • M. Fer(3) • W. Helbert(3)

(1)INRA UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, Plate-forme Biopolymères, Biologie Structurale, Nantes • (2)CNRS UMR 8587 Université Ery-Val-d'Essonne, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, 91025 Ery (3)UMR 7139 CNRS-UPMC, Végétaux Marins et Biomolécules, Station Biologique de Roscoff

Les polysaccharides sont parmi les macromolécules biologiques les plus abondantes et les plus diverses dans la nature. De part leur caractère renouvelable et biodégradable, ils représentent une ressource déjà exploitée dans le milieu industriel, notamment dans l'élaboration de nouvelles bioénergies. Excepté quelques polysaccharides traditionnellement utilisés dans les industries alimentaire et pharmaceutique, la plupart d'entre eux demeurent de structures et fonctions inconnues. L'un des enjeux est donc de disposer d'outils performants pour leur caractérisation et leur exploitation. Dans ce contexte le recours à leur dépolymérisation enzymatique par de nouvelles activités catalytiques s'avère prometteur.

Notre projet (ANR CRAZY-POL) consiste à rechercher ces nouvelles activités enzymatiques dans les sources les plus variées, et à les identifier en caractérisant les oligosaccharides produits. Ces études sont réalisées en mettant des collections de polysaccharides d'origines variées en présence d'extraits enzymatiques, notamment bactériens.

Un outil de criblage dit de moyen débit, s'appuyant sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF, a ainsi été développé pour caractériser dans un premier temps, les produits de dégradation bactérienne de polysaccharides connus. Le choix de la méthode d'ionisation a été guidé par la complexité des échantillons, et l'objectif de moyen débit.

Un large choix de matrices, aussi bien cristallines que ioniques liquides, a été testé sur divers polysaccharides et produits de dégradation, afin de déterminer des conditions d'analyses fiables, reproductibles et généralisables à tout type d'oligosaccharides (acides, neutres...), en mode d'ionisation positif et négatif. Une attention particulière a été portée à l'homogénéité des mélanges matrices/substrats, au dépôt de l'échantillon dans sa matrice, jusqu'à l'exploitation des spectres et le traitement des données dans le but d'automatiser la méthode.

Dans cette phase de mise au point, des expériences de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et d'HPAEC-PAD ont été effectuées afin de confirmer la structure des espèces moléculaires observées sur les spectres MALDI-TOF et éventuellement

de mettre en évidence des artefacts expérimentaux.

Cette étude montre que deux des matrices testées semblent parfaitement adaptées à ce type d'analyse et permettent la mise en évidence d'activités enzymatiques de type polysaccharidase.

Identification et caractérisation des produits de dégradation des herbicides chlorés issus de procédés de photolyse

Yasmine Souissi • Sophie Bourcier • Stéphane Bouchonnet • Christophe Genty • Michel Sablier

École Polytechnique, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, CNRS, Palaiseau, France

En raison du développement des exploitations agricoles ainsi que des moyens fortement déployés pour améliorer les rendements et la qualité des récoltes, nous assistons de plus en plus à l'emploi de produits phytosanitaires qui contribuent depuis plusieurs années à la contamination de l'écosystème aquatique (nappe phréatique souterraine, eaux de surface naturelles, eaux de pluie...). Plusieurs études ont révélé le potentiel de ces composés à induire des effets néfastes sur la santé humaine. Ces produits phytosanitaires, qui peuvent subsister dans les eaux destinées à la consommation, ont été reconnus pour certains comme étant des perturbateurs endocriniens. Il s'agit de xénobiotiques ayant pour potentiel de mimer l'action des hormones ou d'interférer avec leur bon fonctionnement entraînant ainsi des problèmes d'infertilité, de malformations, ou conduisant, encore, au développement de cancers « hormone dépendant ». De plus, ces substances peuvent subir différents processus de transformation soit dans le cycle biologique naturel (biodégradation, volatilisation, irradiation solaire) ou suite aux traitements appliqués en stations d'épuration. Ainsi, ces substances sont présentes dans la nature soit sous leur forme initiale soit sous la forme de produits de dégradation dont les structures restent en général inconnues. Des études récentes ont montré que les produits de dégradation issus des perturbateurs endocriniens sont susceptibles d'être doté du même potentiel que leurs molécules mères [1].

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à des molécules faisant partie de la famille des herbicides chlorés : le métolachlore, l'alachlore et l'acétochlore. Ce travail a pour but d'identifier et de caractériser les produits de dégradation issus de la photolyse de ces trois composés en milieu aqueux. Le procédé de photolyse qui pourrait aussi constituer un procédé prometteur d'élimination des herbicides persistants dans les eaux a été utilisé ici pour mimer la dégradation par irradiation solaire de ces herbicides. Les expériences de photodégradation ont été réalisées dans un réacteur cylindrique en quartz équipé d'une lampe à mercure à haute pression, les concentrations initiales des herbicides sont de 1 mg.ml⁻¹. L'étude des produits de dégradation a été menée en GC-MS et en

LC-MS afin de pouvoir identifier les composés apolaires et polaires. Une stratégie d'élucidation structurale des produits de dégradation de ces herbicides à partir des mécanismes de fragmentation des molécules mères par spectrométrie de masse s'avère fort concluante. Pour confirmer la structure des composés de dégradation, nous avons réalisé la MS/MS et la mesure de masse exacte sur les ions moléculaires obtenus. De plus, les structures proposées ont été confirmées par des expériences conduites sur les homologues deutérés des molécules étudiées. Ainsi, l'identification d'une large gamme de produits de dégradation issus de procédés de photolyse directe sera présentée.

[1] McKinlay, R., et al., *Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment*, *Environment International*, 2008, 34(2): p. 168-183.

P2-042

Étude de molécules standards par MS/MS : lien entre fragmentations et fonctions chimiques

Jean-Yves Bonnet • Maëliiss Frisari • Roland Thissen • Véronique Vuitton • Odile Dutuit • Eric Quirico

Laboratoire de Planétologie de Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Les méthodes de spectrométrie de masse en tandem (ou MS/MS) constituent un outil fréquemment utilisées afin d'apporter des informations structurales pour des ions complexé telles que les protéines. Cependant, aucune contrainte réelle n'existe pour guider les interprétations notamment quand aucun a priori n'est envisageable, comme c'est le cas avec des mélanges complexes du type des tholins ou des polymères de HCN. C'est pourquoi nous avons décidé de mettre en œuvre une étude systématique sur une vingtaine de molécules standards, (de structures connues), de formules générales $C_xH_yN_z$, en MS2 et MS3 afin d'apporter des contraintes solides sur les attributions de structures moléculaires. Ce travail a été réalisé en mode positif et négatif et par analyse en masse dans les éléments «ion trap» et «Orbitrap» d'un LTQ-Orbitrap XL. Les standards ont des structures qui vont de chaînes linéaires à des unités polycycliques hétéroaromatiques et contenant différentes fonctionnalités chimiques, parmi lesquelles les amines, nitriles, guanidine, diaza,... Pour l'une de ces molécules, trois isomères ont été étudiés et leurs signatures de fragmentation comparées. Cette étude révèle un lien direct entre fonctionnalité chimique, nature et intensité des fragmentations observées dans les spectres. L'utilisation de ces résultats pour l'analyse structurale de mélanges complexes tels que Tholins ou polymères de HCN sera présentée.

Stratégie de couplage entre la spectrométrie de masse et la Chromatographie-Olfactométrie

Pascal Tournayre • Caroline Thomas • Frédéric Mercier • Nathalie Kondjoyan • Jean-Louis Berdagué

INRA, Centre de Clermont-Ferrand, Unité QuaPA / T2A, Theix, Saint Genès-Champagnelle

Dans le but de caractériser la fraction volatile odorante des matières premières, des produits ou des atmosphères, il est nécessaire d'utiliser différentes possibilités de couplages entre la chromatographie en phase gazeuse, la spectrométrie de masse et l'olfactométrie. En effet, pour comprendre les qualités et les défauts d'odeur, il est indispensable (i) d'avoir une vision exhaustive sur les substances odorantes qui contiennent ou désorbent les produits analysés et (ii) d'être capable d'identifier avec certitude les substances odorantes d'intérêt, souvent présentes à l'état de traces. Pour cela, plusieurs possibilités de couplages doivent être mises en œuvre dans un ordre bien défini : c'est la stratégie de couplage que nous allons présenter.

Pour avoir une vision exhaustive de la composition de la fraction volatile odorante, nous avons développé une instrumentation unique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et à l'olfactométrie à 8 voies (GC-MS/BO). Cette instrumentation permet de réaliser l'analyse synchrone d'effluves chromatographiques par un jury de 8 flaireurs. Dans ces conditions, 8 aromagrammes individuels sont acquis en seulement 35 minutes. Grâce au développement d'un logiciel spécifique « AcquiSniff® », l'information contenue dans ces aromagrammes va être utilisée pour construire l'aromagramme du panel des flaireurs. Cet aromagramme est un signal sensoriel stabilisé peu sensible aux différences de performances individuelles (anosmie, intensité, durée de perception, description sémantique) classiquement observées lors des épreuves de GC-O. Pratiquement, l'expérience montre que les analyses de GC-MS/BO permettent de détecter un maximum de composés odorants en une seule analyse. L'information sensorielle ainsi acquise est bien sûr physiquement couplée et synchronisée avec la spectrométrie de masse ; ce qui conduit déjà à proposer des structures pour les composés odorants non co-élus pondéralement bien représentés dans les extraits.

Grâce à l'aromagramme du panel de flaireurs, qui permet de repérer rapidement les zones odorantes les plus intensément perçues et qui informe sur la manière dont elles ont été décrites, il est possible de focaliser les efforts d'identification sur des zones odorantes particulières. Cependant, les substances recherchées

sont souvent co-élues et il n'est pas possible de proposer systématiquement une structure à l'issue d'une analyse par GC-MS/BO.

Pour identifier avec certitude les substances odorantes présentes dans n'importe quelle zone de l'aromagramme du panel de flaireurs, nous mettons en œuvre deux équipements complémentaires. Il s'agit :

1) d'un couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse capable de fonctionner dans deux configurations chromatographiques différentes (au moyen d'un système automatisé de vannes multiples et de régulateurs de flux). La première est un couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse / olfactométrie monovoie classique (GC-MS/O) qui permet de retrouver la ou les zones d'intérêt perçue(s) avec le système d'olfactométrie multivoies précédemment décrit. La seconde configuration est utilisée pour traiter en détail ces zones en réalisant une analyse chromatographique bidimensionnelle de type « Heartcut » couplée bien sûr à la spectrométrie de masse et à l'olfactométrie monovoie (GC-GC-MS/O). Dans ces conditions, l'analyste s'affranchit des problèmes de co-élutions rencontrés en GC-MS/BO et en GC-MS/O puisque deux colonnes de polarité différente sont successivement utilisées pour séparer les analytes. La mise en phase des signaux de spectrométrie de masse et d'olfactométrie permet alors de proposer une structure chimique pour expliquer chaque zone odorante (si toutefois le signal instrumental est suffisamment intense pour fournir un spectre de masse exploitable !).

2) d'un équipement de chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle systématique couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GCxGC-MS/ToF) qui, grâce à une séparation bidimensionnelle des composés volatils, une déconvolution numérique des spectres co-élus ainsi qu'à une sensibilité élevée, facilite l'identification de structures « odeur actives » présentes à l'état d'ultra traces.

C'est au prix de la mise en œuvre séquentielle de tous ces couplages entre la spectrométrie de masse et la chromatographie en phase gazeuse (complétée par l'indispensable co-injection de composés de référence), qu'il est possible d'identifier de manière exhaustive les molécules odorantes des produits analysés.