



*Instrumentation*  
*et mécanismes réactionnels*

## Photoionisation à Pression Atmosphérique de Biomolécules à l'aide du rayonnement synchrotron SOLEIL

J. Allegrand(1) • D. Touboul(1) • A. Giuliani(2,3) • O. Laprèvote(1,4)

(1)Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette • (2)Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette • (3) Cepia, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Nantes • (4)Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris

La photoionisation à Pression Atmosphérique (APPI) [1,2] est la technique la plus adéquate pour l'étude de composés apolaires, tout particulièrement dans des solvants aprotiques de type chloroforme. La technique est basée sur la formation d'un spray contenant l'analyte et le solvant qui est exposé aux photons UV provenant le plus fréquemment d'une lampe à décharge dans le krypton. Néanmoins, les expériences présentées dans ce travail ont été effectuées à l'aide du rayonnement synchrotron. Cette accordabilité originale du rayonnement synchrotron avec une source APPI n'a jamais été effectuée jusqu'à présent selon nos connaissances. L'avantage de ce couplage est de travailler avec une gamme d'énergie de photons accordable allant de 5 (248 nm) à 20 eV (62 nm), au contraire d'une énergie fixe obtenue avec une lampe à décharge (10 et 10,6 eV pour la lampe à Krypton). La sélection de l'énergie des photons est réalisée grâce à un monochromateur dont la résolution en longueur d'onde est de l'ordre de 0,1 nm. Afin d'obtenir un flux de photon dans la source APPI à pression atmosphérique, alors que la ligne de lumière est sous un vide poussé, un pompage différentiel a été mis en place. En sortie de ce système, les photons sont dirigés vers la source APPI en lieu et place des photons émis par la lampe à décharge. La source est finalement couplée à un spectromètre de masse de type hybride quadripole/temps de vol (Q Star, Applied Biosystems, Sciex).

Le but est de faire varier les valeurs d'énergies des photons afin d'étudier les seuils d'ionisation du solvant, de l'analyte et/ou du dopant et ainsi de mieux appréhender les phénomènes chimiques présents en APPI des différentes biomolécules étudiées.

L'étude des phospholipides a permis l'observation de fragments tels que l'ion fragment m/z 772, dans le cas des phosphatidylcholines, apparaissant pour des photons d'énergie supérieure à 9,7 eV. Cette valeur serait compatible avec le seuil d'ionisation de la fonction ester (IE=9,7eV). Ainsi il est supposé que l'ionisation se produit pour ce type de fragments sur la fonction ester, menant à un ester radical sur lequel est transféré un H<sup>•</sup>. Par ailleurs, ces résultats ont été confirmés théoriquement par le transfert thermodynamiquement favorisé d'un hydrogène radicalaire du méthanol sur

l'ester cation radical. Cette réaction de transfert d'H<sup>•</sup> sur un groupement photoionisé est spécifique à l'APPI et se démarque de la réaction de transfert de H<sup>+</sup> produite avec l'ESI.

L'étude des molécules comportant des insaturations en solution dans le chloroforme a permis d'obtenir avec une très forte intensité des adduits au dichlorocarbène. L'étude de peptides post-modifiés, menée à l'aide d'un dopant, a par contre permis d'amener à la formation d'ions fragments de type b et c [4,5]. Les différents mécanismes de fragmentations, tels que la capture d'électrons pour les ions fragments de type c générés lors de la photoionisation, ont été étudiés en rapport avec les seuils de photoionisation de chacun des composés (solvant, dopant, analyte).

Ces premières expériences réalisées sur le couplage unique d'une source APPI avec une source de photons VUV monochromatique et accordable ont permis d'obtenir des résultats nécessaires à la compréhension des mécanismes réactionnels en APPI. Il est donc intéressant d'étendre les expériences à d'autres biomolécules telles que les sucres, ou d'étudier la digestion de protéines à travers une séparation chromatographique en phase inverse avec addition en post-colonne d'un dopant.

[1] Robb D.B., Covey T.R. and Bruins A.P., *Anal. Chem.*, 72, (2000), 3653

[2] Cao S.S. and Syage J.A., *J. Chromatogr. A*, 1110, (2006), 15

[3] Giuliani A., Debois D., and Laprèvote O., *Eur. J. Mass Spectrom.*, 11, (2005), 409

[4] Delobel A., Halgand A., Laffranco-Gosse B., Smidars H. and Laprèvote O., *Anal. Chem.*, 75, (2003), 5961

[5] Debois D., Giuliani A., and Laprèvote O., *J. Mass Spectrom.*, 41 (2006), 1554

## Photodissociation and Electron Photodetachment Dissociation (EPD) for structural characterization of sugar and protein polyanions

A. Racaud(1) • C. Brunet(1) • V. Larraillet(1) • R. Antoine(1) • P. Dugourd(1) • J. Lemoine(2)

(1)Université de Lyon, France ; CNRS, UMR5579, LASIM • (2)Université de Lyon ; CNRS, UMR-5180, Sciences Analytiques

Mass spectrometry has during the last two decades deeply revolutionized the structural analysis of biomolecules. It has even become the corner stone of the proteomics and systems biology allowing not only the identification and quantitation of proteins in complex mixture, but also a featuring as exhaustive as possible of the pattern of post-translational modifications or genetic variations.

Currently, two complementary strategies are applied, namely the bottom-up and the top-down approaches. The top-down approach lies in the gas phase fragmentation of protonated molecular ions of intact proteins. The concept of top-down protein identification has really emerged thanks to the decisive development of electron capture dissociation (ECD). In an effort to implement an analogous radical-induced nonergodic fragmentation pathway in the wider available quadrupole ion trap instrument (QIT), Hunt and co-workers introduced the electron transfer dissociation (ETD) technique.

Employing an ion/ion reaction, ETD initiates protein and large peptide dissociation by transferring an electron from a radical anion to a multiply protonated molecular ion.

Recent works revealed that laser irradiation around 260 nm of peptides or DNA polyanions causes electrondetachment. Then, subsequent collisional activation of the isolated radical anions gave rise to intense and nearly complete series of fragment ions similar to those issued from ETD and electron detachment dissociation (EDD) on polyanions of peptides.

We investigated for the first time the merits of what we coined electron photodetachment dissociation (EPD) for polyanions dissociation of large peptides and intact proteins. Compared to direct CID of even-electron species, EPD lead to much more intense and extensive fragmentations of the peptide backbone and opens a new perspective in the field of structural characterization and top-down sequencing of large peptides and proteins. Furthermore, laser irradiation around 260 nm causes interesting fragmentation patterns for structural characterization of oligosaccharides. Recent results obtained on sulfated oligosaccharides will be also presented.

*Wavelength-Tunable Ultraviolet Photodissociation (UVPD) of Heparin-Derived Disaccharides in a Linear Ion Trap.*

Racaud A., Antoine R., Joly L., Meuplet N., Dugourd P., Lemoine J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 1645-1651; (2009)

*Activated-Electron Photodetachment Dissociation for the Structural Characterization of Protein Polyanions*

Larraillet V., Antoine R., Dugourd P., Lemoine J.

*Anal. Chem.* 81, 8410-8416, (2009)

P4-003

## **Elucidation of the dissociation pathways of metolachlor, acetochlor and alachlor under electron ionization - application to the identification of ozonation products**

*S. Bouchonnet(1) • S. Kinani(1) • S. Bourcier(1) • Y. Souissi(1) • M. Sablier(1) • V. Boireau(2) • V. Ingrand(2)*

*P. Roche(3) • (1)Ecole Polytechnique Labo. des Mécanismes Réactionnels CNRS, Palaiseau • (2)CAE, St-Maurice*

*(3)Anjou Recherche, Maisonn-Laflite, France*

The contamination of soils, ground and/or surface water by chlorinated herbicides used in agriculture as the principal weapon against pests, disease and weed infestation, is currently enhancing a growing environmental concern all over the world. Herbicides contaminated lands and farming areas may require remediation to mitigate water resources contamination. Some acetanilide herbicides known as metolachlor, alachlor and acetochlor are widely used to control annual grasses and yellow nutsedge and to manage small-seeded broad leaf weeds. Their widespread use has resulted in their frequent detection in near agriculture area water sources where those compounds are exposed to leaching and urban runoff. Their persistence in soil as well as the emergence of potential breakdown products are non desirable side effects that may lead to serious ecological and human troubles. Recently, they have been demonstrated to be potential endocrine disruptors (EDCs).

Dissociation pathways and ion structures have been proposed to interpret the EI mass spectra of metolachlor, acetochlor and alachlor, on the basis of MS/MS experiments and isotopic labelling. The mass spectrum of metolachlor is fully dominated by ions resulting from the elimination of the ether function through  $\alpha$  cleavage, considering ionization on the nitrogen atom, and subsequent dissociations. The interpretation of acetochlor and alachlor EI mass spectra is more complex; it requires mechanisms implying different  $\alpha$  cleavages considering ionization on the nitrogen atom but also on the aromatic ring. Ionization on the chloride atom leads to Cl.  $\alpha$  elimination and subsequent fragmentations. Other mechanisms beginning by an hydrogen atom transfer have also been proposed to rationalize the formation of daughter ions. This mechanistical approach allowed the straight characterization of the ozonation products of metolachlor and alachlor.

Keywords: dissociation pathways, metolachlor, acetochlor, alachlor, mass spectrometry, degradation compounds

P4-004

## Sum Formula Calculation And Identification Of A Bacterial Metabolite With $m/z > 1100$

Emmanuel Choquet(1) • Wiebke Lobmann(2) • Petra Decker(2) • Aiko Barsch(2)

(1)Bruker Daltonique, Wissembourg, France • (2) Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany

In the course of identification and structural characterization of compounds the unambiguous sum formula calculation is an essential step. With increasing molecular mass the numbers of possible sum formulae are increasing exponentially, so that already for  $m/z$  values around 500 it is not possible anymore to get just one sum formula suggestion from an accurate mass measurement only, even if a mass accuracy of 0.1 ppm is assumed. Calculation constraints like ranges for meaningful H/C ratios, number of rings/double bonds and careful selection of elements allowed for sum formula calculation will reduce the number of suggestions significantly and help to exclude chemically "impossible" molecules from the result list. However, for  $m/z > 1000$  at 0.1 ppm mass accuracy more than 2200 sum formulae would still be calculated (>10,000 for mass accuracy 1 ppm).

Here we will show that Combining accurate mass, isotope pattern, full scan MS and MS/MS information (and an online search tool) allows for sum formula generation and identification of compounds even at high  $m/z$  values > 1000.

P4-005

## **Evaluation of DESI-MS for fast chemical analysis on the hair surface.**

*A. Dulieu(1) • L. Gireaud(2) • M. Péron(2) • G. Provot(2)*

*(1)Stagiaire Ecole EPCM Strasbourg, France • (2)L'Oréal Recherche, Service analyse, Clichy, France.*

The aim of this work was to evaluate the DESI-MS feasibility for the analysis of cosmetic ingredients deposited on hair. After a checking step on simple substrates, locks of hair were directly screened. We succeeded in analyzing a wide range of compounds on hairs such as anionic/cationic surfactants, and UV filters. Finally, the linearity of MS response versus the content of cationic surfactant was shown on unprepared hair surface. These hopeful results let us imagine the possibility of quantitative analyses directly on native hair samples.

To our knowledge, this is for the first time that this technique is used in Cosmetic Science. It is a first step towards further developments in this field.

P4-006

## UV spectroscopy of gas phase entire proteins

*I. Compagnon • R. Antoine • A. R. Allouche • E. Bertorelle • L. Joly • B. Bellina • P. Dugourd*

*LASIM-Université Lyon1-CNRS, Villeurbanne, France*

UV spectroscopy of a variety of trapped anions ranging from the amino-acid to the entire protein was performed by means of photoinduced electron detachment. It is shown that photoinduced electron detachment spectroscopy overcomes the current limitations of photofragmentation and extends the range of UV spectroscopy of trapped species to very large systems. [3-4] The influence of a negative charge on the optical spectrum of aromatic amino-acids is also discussed.[1-2]

[1] L. Joly, R. Antoine, A. R. Allouche, M. Broyer, J. Lemoine, P. Dugourd, *JACS* 2007, 129, 8428.

[2] I. Compagnon, A.-R. Allouche, E. Bertorelle, R. Antoine, P. Dugourd, *PCCP* 2010, 12, 3399.

[3] L. Joly, R. Antoine, M. Broyer, J. Lemoine, P. Dugourd, *J. Phys. Chem A* 2008, 112, 898.

[4] B. Bellina, I. Compagnon, L. Joly, E. Allricux, A. R. Allouche, E. Bertorelle, J. Lemoine, R. Antoine, P. Dugourd, *JMS*, submitted 2010.

## LDI-MS sur matériaux inertes de silicium/silice : Application à la détection sensible et reproductible de peptides

M. Dupré • G. Fromenty • A. Pialat • S. Cantel • J. Martinez • C. Enjalbal • Institut des Biomolécules Max. Moissonon (IBMM) UMR 5247, CNRS, Université Montpellier 1 et 2, CC. 1702, Université Montpellier 2, France • K. Kaaki • L. Raehm • J.-O. Durand • A. Mebdi • Institut Charles Gerhardt, UMR 5253, CNRS, Université Montpellier 2, France • Rabah Boukherroub • Groupe Nanobiointerfaces, Institut de Recherche Interdisciplinaire (IRI) Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Les techniques de spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser sans matrice ('Matrix-free' LDI) ont été utilisées ces dix dernières années afin de générer la formation d'ions à partir d'échantillons organiques déposés sur des surfaces inertes [1]. En plus du silicium poreux utilisé dans la méthode DIOS originelle [2], divers matériaux solides ont été étudiés en LDI-MS : métaux, oxydes métalliques, carbone, silicium/silice, alumine, sous forme de poudres, de particules poreuses, de nanoparticules et plus récemment de matériaux présentant des structures tridimensionnelles (nanotubes, nanofils). A ce titre, les cibles NALDITM, supports prêts à l'emploi et jetables, commercialisés par la Société Bruker, présentent des surfaces constituées de nanofils de silicium qui ont montré récemment de très bons résultats en LDI-MS pour l'analyse de petites molécules organiques et de peptides [3,4].

Nous avons développé une méthode simple et peu coûteuse de LDI-MS par l'utilisation de matériaux poreux de chromatographie (gel de silice, gel de silice phase inverse, alumine, présentant des tailles de pores variables) pour la détection de peptides [5]. Le choix de telles matrices inertes a été guidé par le fait que ce sont des matériaux commerciaux très peu coûteux, prêts à l'emploi, disponibles dans tout laboratoire de chimie et qui permettent une préparation de l'échantillon ainsi qu'un protocole de dépôt sur une cible MALDI classique très simples.

Suivant la même stratégie analytique, sachant que les matériaux structurés ont montrés de bons résultats en sensibilité de détection, nous avons alors exploré d'autres substrats inorganiques à base de silicium ou de silice présentant diverses structurations (poudres amorphes / nanoparticules / surfaces) et différentes propriétés chimiques de surface obtenues par fonctionnalisation. Nous présentons les analyses LDI-MS d'une collection de peptides modèles déposés sur des nanoparticules de silice et nanofils de silicium. Au travers de cet ensemble de données spectrales, une comparaison des multiples supports étudiés en termes de performance en sensibilité de détection, en reproductibilité ainsi qu'en robustesse de la méthode a été menée.

[1] Petercau DS, *Mass Spectrom. Rev.* 2007; 26: 19-34.

[2] Wei J, Buriak J, Szizdak G, *Nature* 1999; 399: 243-246.

[3] Guéhin E, Lecomte M, Hardouin J, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 1395-1400.

[4] Steiner N, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 2371-2379.

[5] Steiner N, Martinez J, Enjalbal C, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2008; 19: 632-644.



## Étude lipidomique de promastigotes de *Leishmania donovani* traitées à la miltéfosine : analyse en LC-ESI/MS et PLS-DA

R.Godoy(2) • D. Libong(1) • L. Imbert(1) • P.M. Loiseau(3) • P. Chaminade(1)

(1)EA4041 Groupe de Chimie Analytique, Fac. de Pharmacie, Univ. Paris-Sud XI, Châtenay-Malabry • (2)UMR 8076 « Biomolécules : Conception, Isolation et Synthèse », Fac. de Pharmacie, Univ. Paris-Sud XI, Châtenay-Malabry. • (3)Fac. de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile.

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des protistes du genre *Leishmania*, elles touchent 12 millions de personnes et 2 millions de nouveaux cas sont enregistrés chaque année. Cette maladie qui touche généralement l'Inde, l'Amérique du sud, le Moyen-Orient et l'Asie est en recrudescence dans le bassin méditerranéen. Elle se manifeste par des lésions cutanées, cutanéomuqueuses, ou encore viscérales, par ordre de gravité. La miltéfosine est un nouveau médicament administré par voie orale. Cette molécule présente une similitude de structure avec les phospholipides qui sont les lipides membranaires majoritaires. Il a été montré qu'elle interagit avec le métabolisme de ceux-ci, modifiant ainsi leur composition membranaire. Ceci induirait la mort par apoptose des cellules de *Leishmania donovani*.

L'objectif de ces travaux est d'étudier l'impact de la miltéfosine sur la composition membranaire en phospholipides de souches de *Leishmania donovani*, en couplage LC-ESI/MS et par traitement chimiométrie en PLS-DA sur des souches sauvages, traitées à la miltéfosine et résistantes au traitement.

L'analyse des dix phospholipides membranaires (acide phosphatidique (PA), phosphatidyl-glycerol (PG), -inositol (PI), -serine (PS), -choline (PC), -ethanolamine (PE), cardiolipide (CL), lysophosphatidyl-ethanolamine (LPE), -choline (LPC), et sphingomyéline (SM)) est réalisée en chromatographie liquide haute performance en phase normale. L'identification de espèces moléculaires s'effectue spectrométrie de masse. Nous avons utilisé un couplage LC-ESI-MS, en mode négatif et positif, souvent utilisé en métabolomique, utilisant une trappe d'ions Bruker®. L'ionisation douce de l'électrospray favorise la détection d'ions moléculaires [M-H]<sup>-</sup> et [M+H]<sup>+</sup> en mode négatif et positif, ainsi que des adduits sodium [M+Na]<sup>+</sup> en mode positif, l'interprétation des résultats est donc relativement aisée. Le traitement des données obtenues en couplage est réalisé à l'aide d'un traitement chimiométrique (Partial Least Square-Discriminant Analysis) effectué sur Simca-P 11 après un pré-traitement des données sur MzMine, afin de mettre en évidence les espèces moléculaires dont l'expression est modifiée chez les souches traitées ou rendues résistantes à la miltéfosine par rapport aux souches sauvages.

Il apparaît dans un premier temps que les classes PI, PE, PS, PC et LPC sont affectées par un traitement à la miltéfosine. Les PC semblent être les plus significativement influencés par la miltéfosine, avec les ions de la zone  $m/z=742.9-746.9$  et  $770.8-773.9$  plus exprimés sur les souches traitées, et les ions de la zone  $m/z=780.8-788.8$  moins exprimés par rapport aux souches sauvages. Les souches résistantes présentent un profil intermédiaire entre les deux autres.

D'un point de vue biologique, ceci permet de remonter aux enzymes et processus cellulaires influencés par la miltéfosine.

Ces travaux présentent donc une technique LC-ESI-MS suivie d'un traitement statistique des données en chimiométrie pour l'étude de lipides membranaires, et plus précisément de phospholipides de parasites, aisément adaptable à tout autre modèle d'étude en lipidomique.

## Mode de création et d'injection des ions et dynamique de détection dans les modes opératoires par Transformée de Fourier appliqués aux pièges à ions 3D

N. A. Djossou(1,2) • A. Janulyte • Y. Zerega • M. Carette • C. Reynard • J. Andre(1) • B. Brkic • S. Taylor(2)

(1)Labo. Chimie Provence - UMR6264, Univ. de Provence, CNRS, Centre de St Jérôme, Marseille, France. • (2)Department of Electrical Engineering and Electronics, Univ. of Liverpool, Brownlow Hill, United Kingdom.

La trajectoire séculaire axiale d'un ion confiné dans un piège quadripolaire 3D, échantillonnée à la période du potentiel alternatif de confinement, est calculée par la méthode matricielle [1]. Cette trajectoire est exprimée à partir des conditions initiales (CI) en position et vitesse de l'ion et des paramètres de l'ellipse d'acceptance du piège. Le signal image détecté avec les modes opératoires par Transformée de Fourier (TF) est formé par la superposition des trajectoires des ions simultanément confinés : des ions de même espèce (de même rapport  $m/z$ ) ayant des conditions initiales différentes et des ions d'espèces différentes [2]. Le signal image est périodique : chaque espèce ionique donne une composante fréquentielle à sa fréquence séculaire axiale d'oscillation dans le piège. Pour chaque espèce ionique l'amplitude maximale du signal périodique correspondant dépend des conditions initiales de chaque ion et des paramètres de l'ellipse d'acceptance (l'amplitude de la raie de fréquence après TF est proportionnelle à cette amplitude maximale).

La distribution des CI au confinement des ions sont imposées par le mode de création et d'injection des ions, car ces derniers sont créés extérieurement au piège. Nous proposons un mode d'injection qui conduit à un flux continu d'ions dans le piège : les ions entrent dans le piège, subissent une barrière de potentiel, s'arrêtent avant le centre de piège puis retournent en arrière [3]. Avec ce mode d'injection, l'amplitude maximale de la raie de fréquence ne dépend que de la distribution initiale en position des ions lorsque la distribution de vitesses axiales initiales est centrée sur zéro. En arrêtant les ions avant le centre du piège, tous contribuent à renforcer l'amplitude du signal image détecté [4].

Dans ce travail nous présentons, d'une part, les expressions analytiques du signal image détecté avec un mode opératoire par TF. D'autre part, nous comparons deux modélisations qui nous permettent d'exprimer le champ électrique depuis la source d'ions jusqu'au piège à ions : (1) un modèle axial simplifié (déjà présenté), et (2) un nouveau modèle 3D obtenu avec le logiciel CPO [5]. A partir de ces modèles, nous calculons les trajectoires ioniques afin d'obtenir des distributions en positions et vitesses initiales au confinement selon les géométries et positions des électrodes et les potentiels

appliqués. Nous pouvons ainsi estimer l'influence des variations (1) du nombre d'ions et (2) des distributions des CI, sur la valeur et les fluctuations de l'amplitude maximale du signal image.

[1] M. Baril and A. Septier. Piégeage des ions dans un champ quadripolaire tridimensionnel à haute fréquence. *Rev. Phys. Appl.* 9 (1974) 525-531.

[2] par exemple :

J.E.L. Syka and W.J. Fies. Fourier transform quadrupole mass spectrometer and method. US Patent 4,755,670 (1988).

S.A. Lammert, C.D. Clevenand, R.G. Cooks. Determination of ion frequencies in a quadrupole ion trap by using a fast direct-current pulse as pump and a laser probe. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5 (1994) 29-36.

E.R. Badman, G.E. Patterson, J.M. Wells, R.E. Santini and R.G. Cooks. Differential non-destructive image current detection in a Fourier transform quadrupole ion trap. *J. of Mass Spectrom.* 34 (1999) 889-894.

[3] A. Janulyte, Y. Zerega, M. Carette, C. Reynard and J. Andre. Model for ion injection into a quadrupole ion trap to assist the distribution of initial conditions of confinement. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2479-2492.

[4] Y. Zerega, J. Andre, M. Carette, A. Janulyte and C. Reynard. Chap 9: A Fourier Transform Operating Mode Applied to a Three-Dimensional Quadrupole Ion Trap, in *Practical Aspects of Trapped Ion Mass Spectrometry*, Vol IV, éditeurs : March R. E. and Todd J. E. J. (2010).

[5] CPO = Charged Particle Optics Programs : <http://www.electrooptics.com/> (accès Juin 2010).

P4-010

## Flavour release using mass spectrometry: PTR-ToF versus APCI-ion trap.

Jean-Luc Le Quéré • Etienne Sémon

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Plate-Forme Lipides-Aromes, UMR CNRS-INRA-U niv. de Bourgogne-AgroSup Dijon, INRA

Flavour release, either in vitro (headspace) or in vivo (nosespace), is advantageously studied by mass spectrometry using atmospheric pressure ionization like proton transfer reaction (PTR) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI).

The results obtained with a new time-of-flight (ToF) instrument equipped with a PTR source (1) have been compared to those obtained with an ion trap mass spectrometer equipped with an APCI source developed in Dijon (2). Headspace analyses of aqueous solutions of various flavour molecules varying in terms of hydrophobicity (log P), volatility and chemical class [acetic acid, butyric acid, acetoine, diacetyly, 3-methylbutanal, 3-methylbutan-1-ol, ethyl hexanoate, heptan-2-ol, 2,3,5-trimethylpyrazine, gamma-decalactone] have been performed on both instruments. These instruments have been compared in terms of response factor, linearity and limit of detection.

Both instruments displayed similar results, particularly for the limits of detection and linearity range. The PTR-ToF instrument displayed faster and more reliable responses for hydrophilic molecules. Despite the tandem MS capabilities of the ion trap instrument, a clear advantage of the ToF one is the separation of isobaric species [for example:  $m/z$  87.044 for diacetyly versus  $m/z$  87.080 for 3-methylbutanal or  $m/z$  89.059 for acetoine versus 89.096 for 3-methylbutan-1-ol] allowing easier distinction of compounds in complex mixtures of flavours.

(1) Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Austria

(2) Simon E, Gierczynski I, Langlois D, Le Quéré JL. 2003. Analysis of aroma compounds by atmospheric pressure chemical ionization - ion trap mass spectrometry. Construction and validation of an interface for in vivo analysis of human breath volatile content, in: Ashcroft AE, Brenton G, Monaghan JJ, editors. 16th International Mass Spectrometry Conference, Edinburgh; Elsevier p. CD-ROM Supplement, abstract 324.

## Analyse de traces dans l'air par spectrométrie de masse FTICR transportable. Applications dans le domaine de la sécurité

Clotilde Le Voi(1) • Moussa Bouaziz(2) • Michel Héninger(2) • Hélène Mestdagb(1) • Joël Lemaire(1)

(1) Laboratoire de Chimie Physique, UMR 8000 CNRS - Univ. Paris Sud, Centre Univ. d'Orsay, France • (2) AtyNam, Univ. Paris Sud, Orsay, France

La spectrométrie de masse FTICR transportable que nous avons développée permet un suivi en temps réel des composés organiques volatils présents dans l'air avec une résolution temporelle de quelques secondes et avec une résolution permettant d'identifier avec précision les composés présents [1].

Les instruments que nous avons construits jusqu'à présent permettent d'analyser les espèces présentes dans une gamme de concentration allant de la ppm à plusieurs dizaines de %, en injection directe [2-3]. Les applications possibles sont déjà nombreuses dans cette gamme, notamment pour le contrôle de processus industriels. Mais les applications dans le domaine environnemental et de la sécurité sont demandeuses de sensibilités plus grandes ; c'est pourquoi nous avons entrepris le développement d'un nouvel instrument visant la détection en temps réel haute résolution avec une limite de détection sub ppb.

La solution que nous avons retenue repose sur l'association d'un spectromètre de masse FT-ICR doté d'un aimant permanent cylindrique générant un champ axial et d'une source externe à pression atmosphérique [4].

L'aimant permanent est réalisé par assemblage de segments aimantés et fournit un champ de 1 Tesla au centre de la structure avec une homogénéité de quelques pour mille. La configuration axiale du champ permet de transférer les ions depuis la source externe jusque dans la cellule d'analyse située au centre de l'aimant.

Nous avons opté pour deux types de sources à pression atmosphérique : une source à décharge lumineuse (glow-discharge) et une source à décharge à barrière diélectrique (DBD). Les espèces excitées formées dans la décharge servent d'espèces primaires pour l'ionisation des composés organiques présents dans l'air.

Les ions produits par la source à pression atmosphérique sont introduits dans le spectromètre de masse portés par un flux d'air à travers un capillaire. Ils sont accumulés dans un piège radiofréquence (de type « piège mixte » car il fonctionne dans le champ magnétique). Une fois les ions accumulés, l'introduction par le capillaire peut être interrompue et le paquet d'ions transféré vers la cellule ICR.

Les pièges ICR et radiofréquence sont placés dans des enceintes séparées par un orifice ayant un diamètre de l'ordre du mm. Ceci permet d'atteindre au niveau de la cellule ICR, un vide suffisamment poussé pour la détection, de l'ordre de  $10^{-8}$  mbar lorsque les ions  $\gamma$  sont transférés.

Le capillaire qui assure le transport pneumatique des ions entre la source à pression atmosphérique et le piège radiofréquence a été dimensionné de façon à assurer une transmission efficace des ions tout en ayant des pressions compatibles avec un bon fonctionnement du piège d'accumulation. Les courants transmis ont été mesurés au pico ampèremètre.

La cellule ICR est une cellule cylindrique composée de 7 sections, chaque section étant elle-même constituée de 4 électrodes. C'est une cellule de type « cellule compensée » dans laquelle le piégeage est proche d'un potentiel quadripolaire et où l'excitation des ions peut être linéarisée par couplage capacitif. Cette cellule sera caractérisée indépendamment en mettant en œuvre l'ionisation chimique dans la cellule pour vérifier ses performances avant de la coupler au reste du système.

[1] M. Héninger, J. Leprovost, L. Courthaudon, H. Mestdagb, J. Lemaire, *L'actualité Chimique*, 329 (2009), 19-24.

[2] A. S. Chipen, N. Blin-Simianč, M. Héninger, H. Mestdagb, P. Boissel, E. Jorand, J. Lemaire, J. Leprovost, S. Pasquier, G. Poppa and C. Postel, *J. Phys. Chem. A* 114 (2010), 397-407.

[3] S. Sarrahi, X. Colin, A. Tebarkhtchi, M. Héninger, J. Leprovost and H. Mestdagb, *Anal. Chem.* 81 (2009), 6013-6020.

[4] projet ANR DIRECT (ANR-08-SECU-003)

## Coupling of a linear ion trap with a VUV beamline

O. May(1) • A. R. Milosavljevic(1,2) • A. Giuliani(1,3) • J.-F. Gil(1) • M. Refregiers(1) • L. Nabon(1)

(1) Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France • (2) Institute of Physics, University of Belgrade, Serbia • (3) Cepisa, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Nantes, France

A novel experimental system for tandem mass spectrometry and ion spectroscopy of electrosprayed ions in a linear quadrupole ion trap using VUV synchrotron radiation is presented. Tandem mass spectrometry, which is based upon the isolation and further activation (fragmentation) of the ion of interest (precursor ion), combined with modern ionization techniques such as electrospray (ESI), represents a powerful tool to study the structure of biopolymers. The classical activation methods of the precursor ion are mostly performed via collisions with neutral gas atoms. However, photon activation can offer a possibility to selectively release large amount of internal energy into the ions of interest, allowing performing spectroscopy on large isolated biological species, as well as on small ligand molecules forming non-covalent complexes.

Trapped ions spectroscopy, however, is a rather challenging task because of the limited ion densities, as well as limited available photon fluxes. The synchrotron radiation MS/MS method implies the following sequence of events: 1) electrosprayed ions are injected, selected and stored in the trap; 2) when the desired ion capacity is reached, the beam shutter opens, thus starting the irradiation; 3) after a desired time of irradiation, the shutter intercept the beam; 4) the mass spectrum is recorded; 5) the monochromator is set to the next wavelength and the procedure is repeated.

The present experimental setup for spectroscopy of electrosprayed ions was coupled with the DESIRS beamline at the SOLEIL synchrotron radiation facility. The undulator emission allowed measurements in the 4-20 eV photon energy range. The photon beam can be filtered out for high harmonics using a gas filter. The experimental system was based upon a commercial linear quadrupole ion trap ("Thermo scientific LTQ XL"), equipped with the ESI probe. Calculations were performed to conceive an optimal overlap between the beam and the trapping region, regarding the size and divergence of the light beam, as a function of the photon energy and the trap distance from the focal point. The synchrotron beam is introduced into the trap through the back lens of the spectrometer. A special frame has been constructed to allow fine-tuning of the position of the spectrometer, ie of the trapping region, with respect

to the light beam. The vacuum manifold with a turbo pumping stage has been designed to accommodate pressure difference between the beamline (10<sup>-8</sup> mbar) and LTQ (10<sup>-5</sup> mbar). The manifold also includes elements for additional filtering of high order radiation, photon flux measurements and photon beam shutter. The shutter has been designed to achieve short (5-10 ms) and reproducible chopping time under high-vacuum conditions. The most recent obtained results include, for the first time on biopolymers, the photodetachment spectroscopy using first-order synchrotron light of peptide polyanions and the first ionization spectroscopy of polycations.

Beside the fundamental interest of accessing physical properties of large biological ions isolated in vacuo, the present work could lead to a new, efficient and powerful MS/MS technique.

## Analyse oligonucléotides en mode positif par hot-ECD : effet de charge stripping

Nguyen viet Hung • Carlos Afonso • Jean-Claude Tabet

Institut Parisienne de chimie moléculaire UMR 7201, Paris

Les spectres SORI-CID enregistrés en mode positif et négatif de simples brins d'oligonucléotides (GT5, T2AT3, T2CT3, T6, G3T3, GCATGC) montrent des fragmentations similaires. Ainsi des ruptures conduisant aux ions fragments w/[a-B] sont observées dans les deux cas. Comme attendu des pertes d'H<sub>2</sub>O sont importantes en mode positif alors qu'en mode négatif ces pertes ne sont pas observées. En ce qui concerne les modes d'activation faisant intervenir soit la capture (ECD et ETD) soit le bombardement d'électrons (EDD, et EID) peu d'études ont cherché à étudier les oligonucléotides en mode positifs.

Au cours de notre travail, des oligonucléotides (de 6mers à 12mers) sont activés par bombardement électrons avec les différentes énergies cinétique allant de 4.5 eV à 30 eV. Ainsi, la capture d'un électron de l'ion [T2(GC)4T2]+3H<sup>3+</sup> (m/z 1209) conduit à l'espèce radicalaire [T2(GC)4T2]+3H<sup>•</sup> (m/z 1813) quelque soit l'énergie des électrons.

Lorsque cette expérience est répétée avec des électrons de relativement haute énergie cinétique (30 eV), l'ion produit [T2(GC)4T2]+3H<sup>•</sup>4<sup>+</sup> (m/z 907) est détecté impliquant de façon inattendu l'arrachement d'un électron (charge stripping). Le détachement d'électron d'espèces positifs a été rarement décrit et à notre connaissance jamais dans le cas d'oligonucléotides. Il faut remarquer que le détachement d'électrons à partir d'espèces négatives est obtenu avec une énergie cinétique des électrons significativement plus faible (environ 19 eV). A 30 eV le spectre d'activation présente beaucoup plus d'ion fragment que ceux enregistrés avec moins énergie cinétique. L'origine de ces ions fragments est encore mal précisé, en effet ces ions peuvent être produits directement à partir de l'ion précurseur par EID (electron induced dissociation) ou à partir de la dissociation de l'ion radicalaire [M+nH]<sup>•</sup> (n+1)<sup>+</sup> (charge-stripped ion) cette dernière hypothèse est connue sous le nom EDD (electron detachment dissociation). Les expériences EDD sur les ions négatifs oligonucléotides réalisés par plusieurs groupes, suggèrent que si certains ions fragments sont effectivement produits par EDD, d'autres sont produits en fait par EID. Les ions oligonucléotides 6mers (GT5, T2AT3, T2CT3, T6, G3T3, GCATGC) ont également été étudiés par bombardement

électrons à 30 eV. Il apparaît que l'efficacité de détachement électron est très faible par rapport aux ions oligonucléotides 12mer, ce ci peut être expliqué par le fait que les oligonucléotides 12mers comportent plus de site à partir duquel l'électron peut être arraché. En pratique, sur 6 séquences d'oligonucléotides 6mers on observe seulement le détachement d'un électrons à partir de l'ion [M+2H]<sup>2+</sup> (m/z 596) de la séquence GT5. En pratique, le mode hot-ECD apparaît comme une méthode intéressante pour le séquençage des oligonucléotides conduisant à des dissociations complémentaires aux autres modes d'activations.

J. Yang, J. Mo, J.T. Adamson, and K. Hakansson, Characterization of Oligodeoxynucleotides by Electron Detachment Dissociation Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1876-1882

H.J. Yoo, H. Liu, K. Hakansson, Infrared multiphoton dissociation and electron-induced dissociation as alternative MS/MS strategies for metabolite identification, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7858-66

J.J. Wolff, J.J. Amster, L. Chi, R.J. Linhardt, Electron Detachment Dissociation of Glycosaminoglycan Tetrasaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 234-244

## Combined electrospray ionization and mass spectrometry characterization of isomeric heparin disaccharides using copper and calcium cationization

D. Ortiz • J. Tortajada • J-Y. Salpin

Labo. Analyse et Modélisation pour la biologie et l'Environnement – UMR CNRS 8387- Université d'Evry Val d'Essonne, France

Heparin molecule is a sulfated disaccharide that has been identified as important key in many biological processes such as blood coagulation, cell-cell and cell-matrix interaction, inflammatory processes, cell growth, lipid transport and metabolism [1]. Nowadays heparin is used clinically as an anticoagulant.

Given the importance of heparins, many efforts were devoted in the last years to the characterization of heparins by mass spectrometry. In previous works [2-5], our group has shown that divalent metal ions mainly react with carbohydrates by proton abstraction to generate  $[\text{Metal}(\text{saccharide})\text{-H}]^+$  under electrospray conditions, and that under low-energy CID conditions, these metallic complexes allows distinguishing both monosaccharide and disaccharides isomers. In this context, we tried to apply the use of metal ions in order to differentiate heparin isomers.

Heparins possess several chemical groups that can interact with these metals but they generate the same kind of complex, namely  $[\text{Metal}(\text{Heparin})]^+$ . In the present poster We demonstrate the successful use of tandem mass spectrometry in order to distinguish all the mono sulfated heparins (II-A,III-A,II-H-III-H) cationized either with calcium or copper dications.

1. H. Copila and R.J. Lindhardt, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 391 (2002).

2. J-Y. Salpin, L. Bouteau, V. Haldys, J. Tortajada, *Eur. J. Mass Spectrom.* 7, 321 (2001)

3. J-Y. Salpin, J. Tortajada, *J. Mass Spectrom.* 37, 379(2002).

4. L. Bouteau, R.E. Lyon, J-Y. Salpin, B. Amekraz, C. Monlin, J. Tortajada, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9, 377 (2003).

5. A. el Firdoussi, M. Lafitte, J. Tortajada, O. Kome, J-Y. Salpin, *J. Mass Spectrom.* 42, 999 (2007)

## Analyse des effets de taille sur la fragmentation ECD de peptides

Guillaume van der Rest • Renjie Hui • Gilles Frison • Julia Chamot-Rooke

Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, Ecole Polytechnique, Palaiseau, France

Au cours d'un travail portant sur l'étude de la fragmentation ECD de pentapeptides de type AGXLK, nous avons observé le comportement inhabituel de ces peptides lorsqu'ils sont doublement protonés : ils conduisent quasiment exclusivement à la formation de fragments b, y et w, au lieu des fragments c et z habituellement observés en ECD. L'observation de tels fragments en ECD n'est pas inhabituelle [1], mais leur origine reste discutée. L'une des hypothèses que nous avons formulée pour expliquer ce comportement est un effet de la taille des peptides sur les voies de fragmentation. Pour préciser ces effets de taille, il est nécessaire de disposer d'un grand nombre de peptides de tailles variées. Une alternative possible à une collection de spectres de peptides de synthèse est une collection de spectres validés issus d'échantillons protéomiques réels. C'est ainsi que la base SwedECD [2] [3] a été conçue, et c'est sur l'analyse de celle-ci que ce travail s'est basé.

La base SwedECD est constituée de 11 492 spectres ECD de peptides tryptiques annotés et validés. Les peptides ne sont présents dans la base que si leur spectre ECD comporte au moins trois fragments c, z ou w. Les ions parents sont tous doublement chargés et font entre 6 et 24 résidus. Ces peptides ne sont donc pas représentatifs d'un ensemble aléatoire de peptides et les conclusions ne sont par conséquent pas immédiatement généralisables. On peut noter en particulier que les peptides de la série AGXLK, question initiale de ce travail, en seraient exclus du fait de l'absence de fragments c et z.

Le premier travail que nous avons réalisé a été d'assigner correctement un type de fragment donné (a, b, c, x, y, z ainsi que les variants à transfert d'hydrogène pour c et z) aux différents ions présents dans les spectres ECD de la base. A partir de cette annotation systématique, le paramètre de la taille des peptides sur la nature des fragments observés a ainsi pu systématiquement être exploré.

Si on considère trois voies séparées que seraient la formation des ions c/z, b/y et w, on observe que la proportion de peptides donnant des fragments b/y diminue rapidement entre les peptides de 6 résidus (85%) et ceux de 11 résidus (50%), atteignant ensuite un plateau. Le même type d'évolution est observé

pour les peptides conduisant à des fragments w : de 95% à 6 résidus à 10% à 14 résidus. On peut noter que les évolutions ne sont pas parallèles, ce qui soulève l'hypothèse d'une origine distincte pour les deux types d'ions. D'autres paramètres ont aussi un effet sur l'apparition de ces fragments (nombre et nature des sites basiques en particulier).

Finalement, une analyse de la taille moyenne des fragments en fonction de la taille des peptides s'est révélée très informative. On observe ainsi que les fragments z ont une taille moyenne inférieure de 5 résidus à celle du peptide parent, traduisant un clivage préférentiel à 5 résidus de l'extrémité N-terminale. Par contraste, les fragments w présentent un clivage moyen au centre des peptides, traduisant soit une discrimination vers le centre du peptide, soit une coupure aléatoire. Il est ainsi clair que l'origine des fragments z et w est différente. L'extrapolation à des peptides de 5 résidus explique ainsi l'absence de fragments z et la présence de fragments w pour ces pentapeptides. On met également en évidence l'existence de deux origines distinctes pour les ions c : une fraction qui suit des critères (taille des parents, taille moyenne des fragments, nature et nombre des sites basiques) de la voie des ions w et une autre fraction qui suit les critères de la voie des ions z. Ce travail permet de proposer un nouveau schéma pour la fragmentation ECD, constitué de trois voies possibles, conduisant respectivement à des fragments c/z, c/w et b/y, avec l'introduction du critère de la taille des peptides parents comme discriminant entre ces trois voies.

On peut également suggérer que la localisation initiale de la charge sur le squelette peptidique est un facteur important pouvant être à l'origine des différences observées.

[1] H.J. Couper, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1932-1940 (2005)

[2] M. Fülth et al., *Anal. Chem.*, **80**, 8089-8094 (2008)

[3] M. M. Savitski et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 113-120 (2007)



## AtmOrbitrap : Spectrométrie de Masse à Ultra-Haute Résolution pour la chimie de l'aérosol atmosphérique.

Guillaume Salque • Didier Voisin • LGGE - CNRS / UJF, Saint-Martin-d'Hères • Yao Liu • Anne Monod • LCP-IRA, Université de Provence, Marseille • Roland Thissen • LPG - CNRS / UJF, Grenoble

La moitié environ de la masse de l'aérosol atmosphérique est constituée de matière organique. Cette fraction organique influence le rôle de l'aérosol dans le climat, à travers ses interactions avec la lumière et la vapeur d'eau. Elle est aussi impliquée dans la toxicité de cet aérosol.

En été, cette matière organique est surtout d'origine secondaire, c'est-à-dire produite dans l'atmosphère à partir d'espèces gazeuses, par des réactions ayant lieu dans les gouttelettes de nuage ou à la surface d'aérosol existant. Une part importante de cet aérosol secondaire est constituée de macromolécules probablement produites par accréation de petites molécules à travers des réactions de polymérisation et/ou de polycondensation.

La compréhension des mécanismes de ces réactions d'accréation passe par une identification des produits de réactions, qui peuvent être nombreux, allant de quelques centaines dans une expérience contrôlée en laboratoire à quelques milliers dans un échantillon réel. Récemment, la spectrométrie de masse à ultrahaute résolution (FTICR-MS, puis Orbitrap) a été appliquée à cette problématique. En permettant l'attribution de formules brutes non ambiguës à une très grande fraction de la matière organique analysée, cette technique doit permettre de contraindre largement les mécanismes proposés pour ces réactions d'accréation.

L'isoprène est le composé organique volatil qui représente la plus forte émission individuelle au monde (650 Tg C / an). Ces 2 principaux produits d'oxydation dans l'atmosphère sont la méthyl-vinyl-cétone et la méthacroléine (70 u.m.a.).

Les produits de la réaction en phase aqueuse de ces composés avec le radical HO<sup>•</sup> ont été analysés par spectrométrie de masse à Ultra Haute Résolution (Orbitrap). Les 2 réactions donnent naissance à de nombreux oligomères avec des masses moléculaires dépassant 1000 u.m.a. dans le cas de la méthylvinylcétone. Malgré la similitude structurale des 2 produits de départ, les oligomères produits sont radicalement différents.

Si ces oligomères peuvent se voir attribuer des formules brutes uniques en dessous de 300 u.m.a., le nombre de formule brutes compatibles avec la masse

exacte mesurée atteint 10 à 1200 u.m.a. L'utilisation systématique de diagramme de Kendrick permet cependant d'affiner les attributions résultant en l'identification non ambiguë de la stoechiométrie des 200 pics les plus intenses, représentant 90% du signal mesuré.