

UNIVERSITÉ D'ÉVRY VAL D'ESSONNE

**ÉCOLE DOCTORALE :
DES GÉNOMES AUX ORGANISMES**

THÈSE

Présentée

A L'INSTITUT DE CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES (ICSN)

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ D'ÉVRY VAL D'ESSONNE

Par

Julie ALLEGRAND

**SPECTROMÉTRIE DE MASSE DE BIOMOLECULES PAR
PHOTOIONISATION A PRESSION ATMOSPHERIQUE**

Soutenue le 11 Juillet 2012 devant la Commission d'Examen :

M. Carlos AFONSO
M. Laurent DEBRAUWER
Mme Florence GONNET
M. Olivier LAPREVOTE
M. David TOUBOUL
M. Alain BRUNELLE

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

UNIVERSITÉ D'ÉVRY VAL D'ESSONNE

**ÉCOLE DOCTORALE :
DES GÉNOMES AUX ORGANISMES**

THÈSE

Présentée

A L'INSTITUT DE CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES (ICSN)

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ D'ÉVRY VAL D'ESSONNE

Par

Julie ALLEGRAND

**SPECTROMÉTRIE DE MASSE DE BIOMOLECULES PAR
PHOTOIONISATION A PRESSION ATMOSPHERIQUE**

Soutenue le 11 Juillet 2012 devant la Commission d'Examen :

M. Carlos AFONSO
M. Laurent DEBRAUWER
Mme Florence GONNET
M. Olivier LAPREVOTE
M. David TOUBOUL
M. Alain BRUNELLE

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

A Ma Famille,

Ce travail et tout le reste je le dois à votre amour et surtout votre soutien incommensurable et à toute épreuve. C'est grâce à vous que je suis une personne si juste et forte.

A Mes Amis,

Ce travail je l'ai concrétisé aussi grâce à votre soutien, votre écoute, votre patience et tous nos fous rires et moments juste inoubliables. Vous m'avez soutenue comme un coach le fait pour son boxeur qui continue le match malgré les coups.

Ce qui ne tue pas, rend plus fort

REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier vivement Monsieur le Docteur **Alain BRUNELLE** d'avoir été mon directeur de thèse. Je le remercie particulièrement de m'avoir permis à la fois d'effectuer et de mener à bien ce travail scientifique dense et riche mais également de m'avoir permis d'accéder et participer à de nombreuses formations et congrès.*

*Je remercie également Monsieur le Docteur **David TOUBOUL**, responsable scientifique de cette thèse, pour ses nombreux conseils et ses compétences scientifiques qui m'ont permis à la fois de mener à bien mes travaux et d'élargir mes connaissances scientifiques. Ainsi ce travail a conduit à de nombreux résultats qui ont pu être en partie retranscrits dans des publications.*

*Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Alexandre GIULIANI**, responsable scientifique sur la ligne DISCO, d'avoir mis à ma disposition toutes les conditions nécessaires pour me permettre d'obtenir des résultats de valeur.*

*J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur **Olivier LAPREVOTE**, premier directeur de thèse, pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.*

*Je tiens à remercier Madame la Professeure **Florence GONNET**, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse et pour avoir corrigé avec patience et minutie mon manuscrit.*

*Monsieur le Docteur **Laurent DEBRAUWER** pour avoir accepté de rapporter ce travail de thèse.*

*Monsieur le Professeur **Carlos ALFONSO** pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et être présent comme rapporteur le jour de ma soutenance après avoir été présent au cours de ma formation universitaire.*

***Toute l'équipe de l'ICSN**, pour la bonne humeur qui a régné au sein du labo pendant ces 3 ans. L'équipe a beaucoup bougé au cours de ces années mais ceux qui ont été importants n'ont pas attendu ce manuscrit pour le savoir de vive voix. Merci pour tous ces bons moments.*

***Toute l'équipe DISCO**, pour votre accueil lors de mes passages à SOLEIL et pour votre disponibilité.*

***L'institut de l'ICSN** pour m'avoir accordé ce financement qui m'a permis de mener à bien cette thèse.*

SOMMAIRE

La même étude que celle effectuée sur l'Orbitrap (III. 1. a.) a été menée sur le Q-ToF afin de comparer les spectres d'ionisation ESI obtenus avec ces deux appareils.....77

ABBREVIATIONS UTILISEES DANS CE MEMOIRE

AE : Affinité électronique

AP : Affinité Protonique

APPI : *Atmospheric Pressure Photoionization*, Photoionisation à pression atmosphérique

ECD : *Electron Capture Dissociation*, Capture d'électrons dissociative

EI : Energie d'ionisation

ESI : *Electrospray Ionization*, Ionisation par électronébulisation

ETD : *Electron Transfer Dissociation*, Transfert d'électrons dissociatif

FAB : *Fast-Atom-Bombardment*, Bombardement par des atomes rapides

FIA : *Flow Injection Analysis*

FTICR : *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*, Résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier

GC : *Gas Chromatography*, Chromatographie en phase gazeuse

IC : Ionisation Chimique

IE : Ionisation Electronique

LC : *Liquid Chromatography*, Chromatographie en phase liquide

m/z : rapport masse sur nombre de charges

MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, désorption-ionisation laser assistée par matrice

MCP : *Multiple Channel Plate*, Galette de micro-canaux

MS : *Mass Spectrometry*, Spectrométrie de masse

PID : *Photoionization Detection*, Détection par photoionisation

TIC : *Total Ion Current*, Courant ionique total

TOF : *Time-of-Flight*, Temps de vol

u : unité conventionnelle de masse moléculaire basée sur $m(^{12}\text{C}) = 12$ u

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La caractéristique de la photoionisation à pression atmosphérique (APPI) est de pouvoir analyser des biomolécules hydrophobes donc difficilement observables avec les sources d'ions connues comme l'électro-nébulisation (ESI) ou la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Mais ces dernières années, cette technique s'est révélée pertinente et efficace pour l'étude d'autres biomolécules ayant un caractère polaire plus ou moins marqué. En effet, les expériences précédemment menées dans l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN avaient pour but de démontrer que la photoionisation à pression atmosphérique pouvait s'étendre à d'autres classes de composés que ceux peu polaires avec comme exemple étudié les oligonucléotides, les sucres, les acides nucléiques et même les peptides.

L'APPI est une technique unique et originale qui permet d'étudier les interactions d'un faisceau de photons irradiant dans l'ultraviolet grâce à un nébullisat, à pression atmosphérique, contenant un mélange de molécules organiques et/ou biologiques, de solvant et éventuellement de dopant. Cette technique est originale car elle permet d'obtenir ainsi des fragments qui ne sont pas observables avec les autres techniques de fragmentation en source et peut allier par ailleurs sur un même spectre des ions fragments provenant de CID, d'ECD/ETD en même temps que des transferts de charges et protons. L'APPI génère donc de nombreuses fragmentations en source ce qui permet d'obtenir d'emblée des informations structurales sur la molécule étudiée sans pour autant devoir effectuer une seconde expérience par MS/MS. Dans certains cas, pour confirmer la structure d'un fragment, une MS/MS est toutefois effectuée permettant d'obtenir des informations structurales plus approfondie.

Le but de ce travail a été d'étendre le champ d'application de l'APPI, après la démonstration encourageante faite les années précédentes sur les biomolécules à propriété amphiphile variée.

L'objectif final est d'approfondir l'élucidation des voies de fragmentations par la compréhension des mécanismes réactionnels mis en jeu avec ce nouveau jeu de biomolécules.

Pour cela, le projet a été effectué en trois temps. Une première partie considérée comme une introduction à l'étude des biomolécules d'origine naturelle avec l'acétogénine comme exemple. Cette molécule dans le cadre d'une étude future de sa métabolisation dans le corps humain nécessitait un travail à visée méthodologique. Ainsi, plusieurs techniques de spectrométrie de masse ont été utilisées (ESI, MALDI et APPI) et comparées afin d'obtenir la technique la plus appropriée pour faciliter l'étude postérieure de cette classe de biomolécules.

Dans un second temps, d'autres biomolécules (phospholipides, nucléotides, peptides) ont été choisies cette fois-ci dans le but véritable d'être étudiées uniquement par APPI et d'en retirer des informations sur les voies de fragmentations. Pour irradier ces molécules le travail a donc été effectué à l'aide d'une lampe au krypton générant des photons à une longueur fixe de 10,0 eV (et à 10,6 eV minoritairement). Après avoir obtenu ces résultats, la troisième et dernière étape a été mise en place, celle d'associer l'expérience d'APPI et l'installation de rayonnement synchrotron SOLEIL sur une ligne de lumière dans l'ultraviolet (DISCO) cette fois-ci non plus de longueur d'onde fixe mais de longueurs d'ondes variables et précises. Les avantages sont l'accordabilité en longueur d'onde puisque la gamme d'énergie large peut aller de 4 à 20 eV (300-60 nm) et la pureté spectrale qui permet d'éviter la seconde raie à 10,6 eV observée avec la lampe au krypton. La sensibilité est augmentée puisque les flux délivrés par le faisceau synchrotron sont environ 100 fois supérieur à ceux de la lampe au krypton.

Ainsi la mesure des énergies d'ionisation de composés non volatils, la photochimie de solvants et les seuils d'ionisation de réaction de transfert de proton de nouvelles petites biomolécules pourront être élucidées et répertoriées.

Première Partie

PROCEDES EXPERIMENTAUX

Chapitre 1 :

LES SPECTROMETRES DE MASSE

CHAPITRE 1 : LES SPECTROMETRES DE MASSE

1. Introduction à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est l'unique technique qui permet d'étudier, en phase gazeuse, la masse moléculaire d'espèces chargées grâce à l'obtention de leur rapport masse-sur-charge, noté m/z , où m est la masse du composé et z est sa charge. En phase gazeuse, les molécules sont majoritairement neutres, il est nécessaire de les ioniser c'est-à-dire leur apporter une charge positive ou négative en minimisant leur dégradation. Ce processus d'ionisation a lieu au niveau du premier bloc du spectromètre appelé la source (**Figure 1**). Au cours du temps de nombreux types de sources ont été développés permettant ainsi d'apporter des alternatives dans l'ionisation des molécules.

Après avoir formé des ions, il est ensuite nécessaire de les séparer en fonction de m/z . C'est le rôle de l'analyseur qui se trouve être le deuxième bloc du spectromètre de masse (**Figure 1**). L'originalité de la spectrométrie de masse est que la séparation des espèces se base sur les principes d'une espèce chargée en mouvement à laquelle une force magnétique et/ou électrique est appliquée. Le champ magnétique a pour effet de modifier la trajectoire d'un ion sans changer la norme du vecteur vitesse alors qu'un champ électrique permet de modifier la vitesse ainsi que la trajectoire. Il existe ainsi plusieurs types d'analyseur et dont certains utilisés lors de cette thèse seront décrits plus loin.

Enfin ces espèces chargées et séparées doivent être détectées afin d'être observable sur un spectre de masse sous forme de pic correspondant au signal de l'ion qui est détecté. Ceci se fait au niveau du troisième bloc du spectromètre de masse qui est le détecteur où les ions formés sont collectés, leurs intensités quantifiées et le signal amplifié (**Figure 1**). Chaque ion de valeur m/z donnée induit au niveau du détecteur une variation de courant ionique et permet de déterminer l'intensité de l'espèce analysée. Un spectre de masse est alors généré, l'information est retranscrite par un système informatique et qui permet de traiter les données.

La spectrométrie de masse ne permet pas seulement de déterminer la masse moléculaire d'une espèce donnée mais elle est de plus utile pour accéder à la composition élémentaire d'une molécule donnée et également pour déterminer la structure de ces molécules.

En effet chaque molécule a des mécanismes de fragmentation bien distincts qui permettent d'apporter une information structurale pour identifier le composé.

Un spectromètre de masse est donc une machine comportant obligatoirement les 3 blocs précédemment décrits (la source, l'analyseur, le détecteur) (*Figure 1*). Cet appareil possède des caractéristiques variées et peut être associé de façon variée permettant ainsi d'obtenir une panoplie importante de spectromètres de masse, avec chacun ses avantages et inconvénients.



Figure 1 : Schéma explicatif d'un spectromètre de masse.

Lors de cette thèse j'ai travaillé sur 3 différents spectromètres de masse qui sont complémentaires et qui possèdent des caractéristiques différentes qui vont être décrites ci-dessous.

2. Les spectromètres de masse

1. MALDI-ToF-ToF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight- time of flight)

1. L'instrument : le 4800 MALDI ToF-ToF



Figure 2 : Photographie du spectromètre de masse MALDI ToF-ToF 4800 par AB Sciex.

Il s'agit d'un spectromètre de masse de type MALDI ToF/ToF commercialisé par AB Sciex (**Figure 2**). Il est équipé d'un laser OptiBeam™ Nd:YAG délivrant des impulsions de photons de longueur d'onde 355 nm (3^{ème} harmonique) à une fréquence de 200 Hz. Le diamètre du faisceau laser est d'environ 50 µm. La source est équipée d'un dispositif d'extraction retardée. L'analyseur est composé d'un premier temps-de-vol linéaire, suivie d'une cellule de collision et d'un second temps-de-vol équipé d'un miroir électrostatique. En mode MS simple (avec reflectron), cet instrument présente une excellente sensibilité, de l'ordre de l'attomole pour des petits peptides, et une résolution en masse d'environ 15 000 (FWHM) à m/z 1500. En mode tandem (MS/MS), l'ion précurseur, après avoir été séparé par le premier temps-de-vol, est sélectionné par un dispositif appelé « *Time Ion Selector (TIS)* ». Dans la cellule de collision, où règne une pression en air de 3×10^{-4} hPa (le reste de l'instrument est à 10^{-7} hPa), les ions sont décélérés à une énergie cinétique de 1 ou 2 keV et se fragmentent par collision avec le gaz. Les ions fragments sont ensuite ré-accélérés à 20 keV et analysés par le second temps-de-vol. Le détecteur est constitué de galettes de micro-canaux.

2. *La source MALDI*

1. *Historique*

[Koichi Tanaka](#) [Tanaka, 1988] reçut le ¼ du Prix Nobel de chimie de 2002 pour l'utilisation de nanoparticules de cobalt et glycérol dans ce qui s'appelle la « ultra fine metal plus liquid matrix method » de l'ionisation par désorption laser. Avec cette approche, il fut capable de démontrer l'ionisation de protéines intactes. Cependant cette technique « moderne » MALDI fut démontrée en 1988 par Michael Karas, Doris Bachmann, and Franz Hillenkamp [Karas, 1985] mais les résultats obtenus pour l'ionisation des protéines par MALDI ne furent présentés qu'en 1988 juste après ceux de Tanaka.

2. *Généralités*

Le MALDI est devenu une technique incontournable et qui s'est imposée comme l'une des méthodes d'ionisation les plus efficaces en spectrométrie de masse particulièrement pour l'étude de molécules de hauts poids moléculaires (> 10 kDa) telles que les protéines et les peptides car elle présente une bonne précision de masse pour ces petites molécules, une préparation et une réalisation relativement faciles, une grande rapidité d'analyse et une relative tolérance aux tampons et aux sels.

Cette méthode est basée sur la désorption / ionisation douce par laser de molécules de faible (< 10 kDa) comme haut (> 10 kDa) poids moléculaire qui résultent de l'ionisation sans fragmentation. « Douce », dans le contexte de la formation d'ions, signifie former des ions sans rompre de liaisons covalentes. La désorption / ionisation est aidée par une matrice dont le rôle est décrit dans le paragraphe suivant.

3. Les différentes matrices

La matrice doit posséder les propriétés suivantes : elle doit former des cristaux incluant l'échantillon ; elle doit être soluble dans un solvant approprié aux molécules étudiées ; elle doit naturellement absorber à la longueur d'onde du laser (son coefficient d'extinction molaire doit y être maximum) (*Tableau 1*). Bien que le solide obtenu ne se dégrade pas il doit pouvoir ne pas s'évaporer sous vide afin de permettre d'enregistrer le spectre. Les matrices les plus utilisées sont l'[acide 2,5-DiHydroxyBenzoïque](#) (DHB) utilisé particulièrement pour les sucres et les chaînes carbonées telles que les acétogénines, la **Tri-Hydroxy-Acétophénone** (THAP) en mode négatif avec les oligonucléotides, l'[Acide \$\alpha\$ -Cyano-4-HydroxyCinnamique](#) (CHCA) utilisé pour les peptides ou petites molécules de moins de 10 kDa, l'**Acide Sinapinique** (SA) utilisé pour les protéines ou les molécules de plus de 10 kDa.

Matrices	Structure chimique	Masse (g/mol)	Coefficient d'extinction molaire (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
DHB		154,1	4.10 ³ [Strupat,1991]
CHCA		188,2	7.100 [Jaskolla, 2008]
SA		224,2	-
THAP		168,2	1297 [Yang, 2010]

Tableau 1 : Liste des matrices utilisées lors de la préparation des expériences sur les acétogénines avec leur structure, masse et coefficient d'extinction.

3. Principe du MALDI

Le principe du MALDI s'appuie sur différentes étapes qui brièvement commencent par la co-cristallisation de la matrice en excès et de l'échantillon séchés sur la plaque MALDI, puis le dépôt cristallin, mis sous vide, est irradié par des impulsions laser. Une désorption liée à l'irradiation se produit, ainsi que la désolvatation et l'ionisation des molécules du mélange. Cette partie peut être expliquée par le laser pulsé causant localement une augmentation de température du dépôt et des micro-explosions. Cette augmentation de température mène à des collisions et des transferts de protons de la matrice à l'échantillon. L'échantillon est alors ionisé principalement par transfert de protons à partir de la matrice ($MH^{++}A \rightarrow M+AH^{+}$).

Trois possibilités pour la formation de ces ions sont controversées : l'une met en jeu la réaction ion/neutre dans le nuage formé par la désorption de l'échantillon

[Knochenmuss, 2000] une autre met en jeu les espèces multichargées neutralisées capturant les électrons issus de la photoionisation de la matrice [Karas, 2000], une troisième plus récente montre que les électrons proviennent non pas de la matrice photo-ionisée mais du support métallique de l'échantillon [Frankevich, 2003].

Puis les ions formés sont accélérés vers l'analyseur grâce à une différence de potentiel appliquée dans la source du spectromètre de masse pour extraire les ions produits (**Figure 3**).

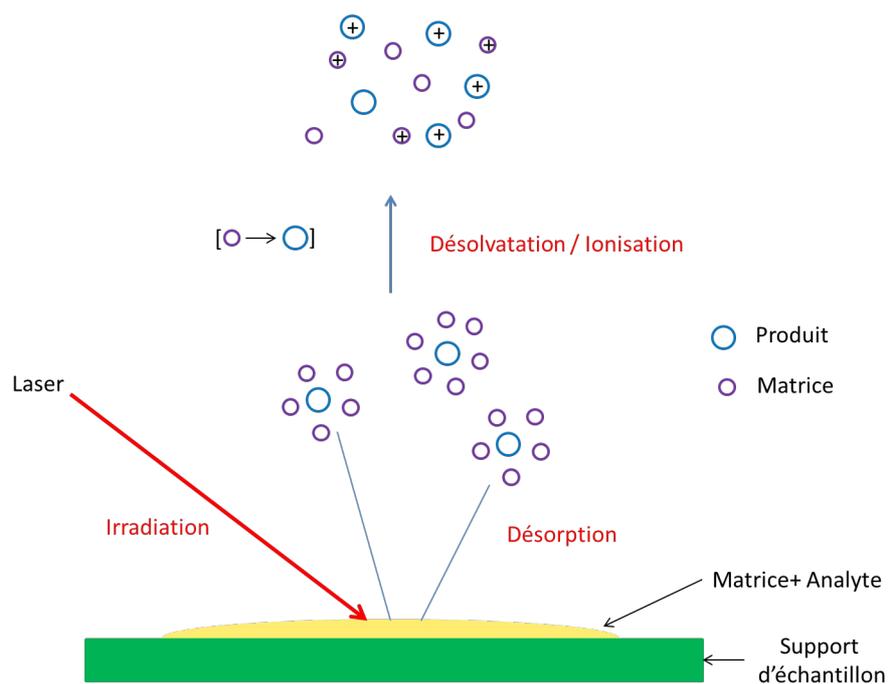


Figure 3 : Schéma de principe du mécanisme MALDI montrant l'irradiation, la désorption, la désolvatation et l'ionisation par laser pulsé sur le dépôt échantillon-matrice

4. Principe de l'analyseur ToF

Après avoir été extraits de la source, les ions sont séparés selon leur rapport m/z dans le tube de vol. L'analyseur temps-de-vol a, en principe, une gamme de masse illimitée. Les analyseurs de type temps de vol mesurent le temps qu'un ion, qui a été expulsé de la source

après avoir été accéléré par une différence de potentiel et focalisé vers l'entrée du tube de vol, prend pour voyager d'un côté à l'autre du tube de vol et atteindre le détecteur.

Cet analyseur peut être utilisé selon plusieurs modes.

1. Le mode linéaire

Si un potentiel V_0 est appliqué sur la plaque MALDI, une grille d'extraction est placée et reliée à la masse et qu'un ion situé à une distance x_{acc} de la grille d'extraction est soumis à un champ électrique alors : $E = V_0/x_{acc}$

Il existe donc une force découlant de ce champ électrique : $F = zeV_0 = m \frac{d^2x_{acc}}{dt^2}$

Par déduction des équations précédentes, le temps d'accélération qui est le temps mis pour atteindre la grille d'extraction est : $t_{acc} = \sqrt{2x_{acc} m / zeV_0}$

Or lorsque l'ion atteint le tube de vol, il n'est plus soumis à aucun champ électrique, l'énergie cinétique acquise dans la zone d'accélération est par conséquent : $E = \frac{1}{2} mv^2 = zeV_0$

Les ions vont de la source directement vers le tube de vol jusqu'au détecteur avec la vitesse qui est déterminée par leur valeur m/z selon l'équation suivante : $v = \sqrt{2zeV_0/m}$

En fixant L la longueur du tube de vol, alors le temps mis par l'ion pour atteindre le détecteur est défini par : $t = L/v = L \sqrt{m/2zeV_0}$

Le temps total mis par l'ion pour parcourir la distance comprise entre la zone d'accélération et le détecteur est donc : $t = \sqrt{2x_{acc} m / zeV_0} + L \sqrt{m/2zeV_0}$

Les ions les plus légers atteignent le détecteur avant les ions les plus lourds. Cette méthode est principalement utilisée dans le cas des macromolécules pour faire des mesures à basse résolution, ce qui signifie de 1 000 – 250 000 Da (*Figure 4*).

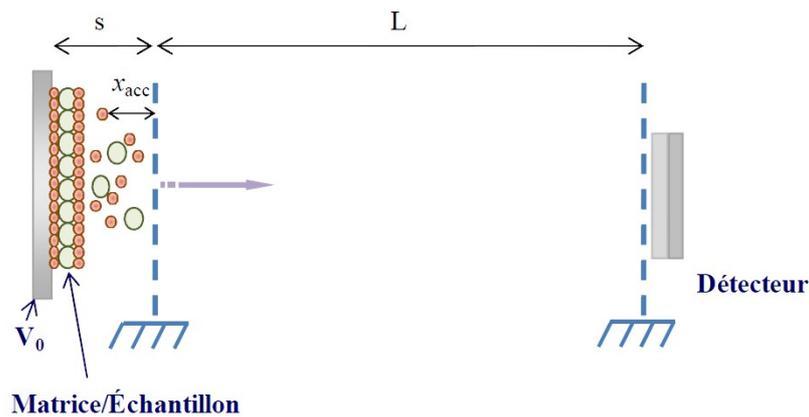


Figure 4 : Composants basiques d'un ToF/MS linéaire

Le principal problème de cette technique est le manque de résolution (1 500). La résolution en masse est le rapport $m/\Delta m$ où m est la masse d'un ion considéré et Δm largeur à mi-hauteur du pic de cet ion.

En effet, la dispersion énergétique des ions à l'entrée de l'analyseur entraîne une grande perte de résolution. Par ailleurs, il existe aussi une dispersion spatiale (surface plus ou moins régulière donc départ des ions à des distances différentes) et une autre dans le temps. En tout cas cette dispersion en énergie a pu être compensée par l'introduction d'un système qui permet la refocalisation temporelle de ces ions qui est le reflectron [Cotter, 1992] et l'extraction retardée [Vestal, 1995]. L'étalonnage en masse s'effectue à l'aide de calibrants dont la valeur en masse encadre les valeurs de m/z d'intérêt.

2. Le mode reflectron ou miroir électrostatique

Il existe un moyen de corriger la part de dispersion des temps d'arrivée au détecteur due à la dispersion des vitesses initiales des ions du même rapport m/z : l'utilisation du mode reflectron [Karataev, 1972 ; Mamyrin, 1973]. Ce dispositif se situe au niveau de l'analyseur ToF et est un miroir électrostatique composé d'une série d'électrodes annulaires qui réfléchit les ions dans un second tube de vol jusqu'à un second détecteur, étendant la longueur de trajet de vol sans augmenter la taille de l'instrument. Ceci a pour but de refocaliser en temps le faisceau d'ions et de regrouper les ions de masse similaire avant l'arrivée au détecteur. Pour des ions qui ont le même rapport m/z mais des énergies cinétiques différentes, l'ion avec la vitesse la plus élevée va entrer plus profondément dans le miroir électrostatique que celui possédant une plus petite vitesse. L'ion le plus rapide parcourra une plus grande distance et passera plus de temps dans le reflectron que l'ion lent. Ce phénomène conduit à une arrivée simultanée de ces deux ions de même rapport m/z au niveau du détecteur malgré leur différence de vitesse (**Figure 5**). La résolution grâce à ce mode reflectron en est hautement améliorée, de l'ordre de 20 000.

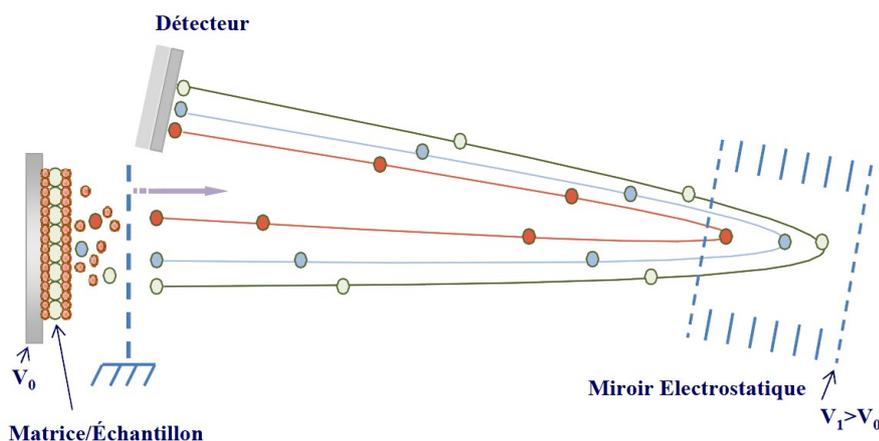


Figure 5 : Composants basiques d'un ToF/MS reflectron

3. Le mode extraction retardée (« Delayed Extraction », DE)

Un autre dispositif a été conçu pour améliorer la résolution et concerne la source d'ionisation MALDI [Brown and Lennon, 1998], [Vestal, 1995]. Il a été imaginé de retarder l'extraction des ions de la source vers l'analyseur de quelques centaines de nanosecondes à quelques microsecondes [Brown and Lennon, 1998], [Vestal, 1995], [Colby, 1994] en s'affranchissant de la distribution en vitesse initiale. Le principe de cette technique est représenté à la **Figure 6**.

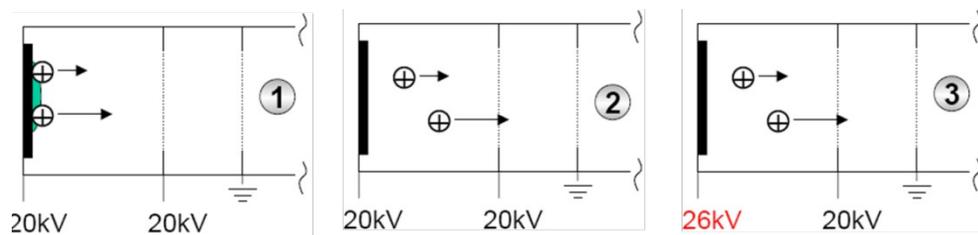


Figure 6 : Principe de l'extraction retardée [Salpin, 2003].

L'extraction retardée consiste à ajouter une grille entre la plaque MALDI et la grille d'extraction. A $t = t_0$ le laser est déclenché, dans une zone libre de champ ($V_{\text{plaque}} = V_{\text{grille}}$) afin de maintenir la zone d'ionisation à un champ nul, puis les ions sont accélérés grâce à une différence de potentiel entre la plaque et la grille. Plus les ions auront une vitesse initiale élevée, moins ils seront accélérés.

Ce système entraîne une diminution de la distribution en énergie cinétique, d'où un regroupement en temps des ions au niveau du détecteur, apportant en particulier une meilleure résolution.

5. Principe de l'analyseur ToF-ToF

Sur le 4800 MALDI ToF-ToF il est également possible de procéder à des analyses par MS/MS à haute énergie de collision (> 1 keV), ou spectrométrie de masse en tandem. Ce processus

consiste à induire un phénomène de fragmentation des ions qui sont stables (temps de vie $> 10^{-4}$ s). Comme le présente la **Figure 7** le ToF-ToF est constitué de trois parties. Une première partie comprenant un premier temps-de-vol permettant de sélectionner une valeur unique de m/z , une seconde partie comportant une cellule de collision contenant une certaine pression d'un gaz de collision inerte puis d'une dernière partie incluant le second temps-de-vol permettant d'analyser les ions fragments. La sélection de l'ion précurseur se fait avant la cellule de collision avec un système de déflection électrostatique.

En théorie, lors de la collision, une partie de l'énergie cinétique du gaz de collision E_{lab} (de masse m_G) peut être transférée à l'ion précurseur (de masse m). La quantité maximale d'énergie pouvant être convertie est appelée énergie au centre de masse E_{CM} .

$$E_{CM} = E_{lab} \times \frac{m_G}{m_G + m}$$

Il est alors évident que plus la masse de l'ion précurseur est grande, moins la collision sera efficace.

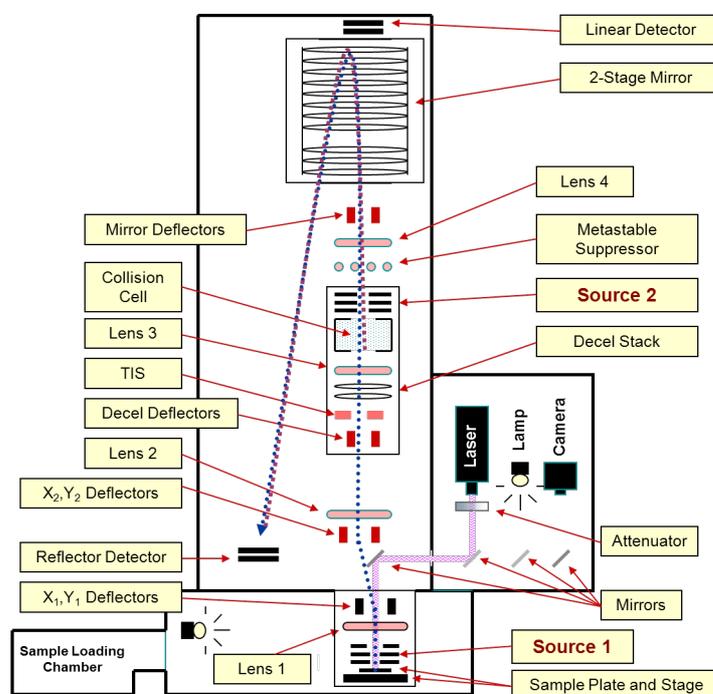


Figure 7 : Schéma du spectromètre de masse 4800 MALDI ToF-ToF (d'après AB Sciex).

Il existe différents phénomènes de fragmentation pouvant se produire à l'intérieur du spectromètre :

- En utilisant le ToF (basses énergies) :

- Si l'énergie interne de l'ion (τ) attribue à l'ion une durée de vie plus longue que son temps de vol (tof) : $\tau > \text{tof}$, aucune fragmentation n'aura eu le temps de se produire avant d'atteindre le détecteur.

- Si la durée de vie d'un ion (τ) est plus courte que son temps de séjour dans la source (temps d'accélération t_{acc}) : $\tau < t_{\text{acc}}$ la fragmentation se produit alors dans la source, ce phénomène est appelé « *In source decay* » ou ISD.

- En revanche si la durée de vie d'un ion (τ) est plus courte que son temps de vol (tof) et plus longue que son temps de résidence dans la source (t_{acc}) : $t_{\text{acc}} < \tau < \text{tof}$, la fragmentation se déroulera dans la zone libre de champ du ToF, après la source. Cet ion est appelé métastable, et ce phénomène est appelé « *post-source decay* » ou PSD.

- si la durée de vie de l'ion est plus grande que son séjour dans la source et plus petite que le temps nécessaire à l'extraire de cette source : $t_{\text{acc}} < \tau$, cet ion métastable se fragmente dans la source. Son énergie cinétique étant alors indéfinie, son temps de vol ne peut pas être corrélé à sa masse et il contribue au bruit de fond du spectre.

- En utilisant le ToF-ToF (hautes énergies) :

Ce mode de fragmentation inclut une cellule de collision permettant de générer des dissociations induites par collision, après un premier ToF permettant la sélection des ions :

- Les collisions peuvent se produire avec le gaz résiduel de la cellule de collision, ce mode est appelé *CID off* (pression à 10^{-7} mbar).

- Il est également possible d'introduire un gaz neutre afin de collisionner les ions précurseurs, on parle alors de *CID on*. Une façon facile d'augmenter l'efficacité de la collision est alors d'augmenter la masse du gaz de collision, en utilisant par exemple de l'argon à la place de l'air (pression à 10^{-6} mbar).

6. Détecteurs en mode linéaire et reflectron

Le MALDI-ToF-ToF 4800 est équipé d'un détecteur pour le mode linéaire et d'un détecteur identique pour le mode reflectron. Il s'agit d'un système de galettes de micro-canaux, ou MCP (Micro Channel Plate), qui permet de convertir des ions en électrons et de les multiplier.

Une galette de microcanaux (MCP) est une plaque percée de multitudes de canaux cylindriques parallèles. Il s'agit d'un dispositif amplificateur de charge électrique, la galette est donc polarisée. Quand une différence de potentiel (de l'ordre du kV) est appliquée entre les deux faces de la plaque, la surface interne de chaque canal devient une dynode continue. Les ions vont frapper la surface d'un des canaux, ce qui va provoquer l'émission d'un électron qui va être multiplié par collisions successives avec la surface des canaux présenté dans la **Figure 8**. Le gain en électrons est de l'ordre de 1 000 (soit 10^6 pour le montage des deux MCP).

La **Figure 8** présente le détecteur constitué d'un double MCP afin de doubler l'amplification du signal et est terminé par une anode qui permet de collecter ce signal amplifié couplée à un unique convertisseur temps-numérique. Ce détecteur est de plus particulièrement bien adapté aux mesures par temps de vol.

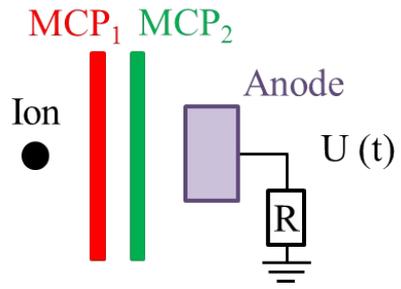


Figure 8 : Schéma de principe d'un détecteur composé de deux galettes de micro-canaux en série et d'une anode.

2. ESI-LTQ-Orbitrap (Electrospray Linear Triple Quadrupole Orbitrap)

1. L'instrument : le LTQ-XL-Orbitrap



Figure 9 : Photographie du spectromètre de masse LTQ-XL-Orbitrap par Thermo Scientific.

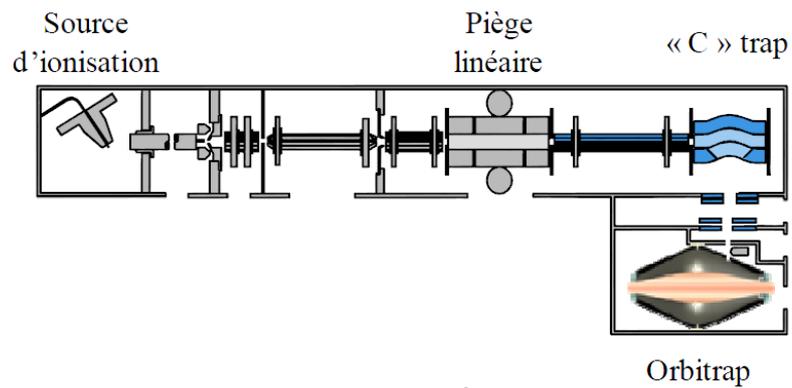


Figure 10 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap.

Ce spectromètre est un LTQ-XL-Orbitrap fabriqué par la société Thermo Scientific (**Figure 9**). Il est constitué d'une source d'ionisation electrospray, d'un piège linéaire, d'une C-trap et d'une Orbitrap qui sont décrits dans les paragraphes suivants (**Figure 10**).

2. La source d'ionisation electrospray

1. Historique

Le couplage de la source avec un spectromètre de masse a été conçu par le groupe de John Fenn à la fin des années 80 qui obtint le prix Nobel de chimie en 2002, à partir de travaux antérieurs menés par M. Dole [Dole, 1968] et J. Zeleny [Zeleny, 1917].

2. Principe de la source

L'electrospray est une technique d'ionisation à pression atmosphérique qui permet de former des ions en phase gazeuse par des mécanismes de désolvatation peu énergétiques qui n'induisent quasiment pas de fragmentation. C'est pourquoi il s'agit d'une technique que l'on appelle douce. Elle se déroule en plusieurs étapes comme présenté dans le schéma ci-dessous (**Figure 11**). Dans un premier temps les gouttelettes sont émises à l'extrémité d'un fin capillaire de silice métallisé qui est porté à un potentiel élevé (plusieurs kV). Lorsque la charge de la solution formant le cône de Taylor approche la [limite de Rayleigh](#), la pointe du cône de Taylor prend une forme allongée qui se détache puis se disperse sous forme des gouttelettes contenant un excès de charge et un diamètre de 1-2 μm . La limite de Rayleigh est le point où les répulsions coulombiennes entre les charges égalent les forces cohésives de la tension de surface du liquide :

$$q^2 = 8\pi^2 \epsilon_0 \gamma D^3$$

Où q = charge, ϵ_0 = permittivité du vide, γ = tension superficielle, D = diamètre d'une gouttelette supposée sphérique.

Ainsi le solvant s'évapore, favorisé par la température souvent élevée de la source d'ionisation (80-140°C) puis la densité de charge de ces gouttelettes augmente jusqu'à devenir trop élevée, et les gouttelettes explosent (explosion coulombienne) en induisant des ions non fragmentés et protonés issus des deux premières étapes selon différentes théories :

Dole *et al.* [Dole, 1968] propose que les gouttelettes subissent successivement des explosions jusqu'à ce que la dernière goutte ne contienne plus qu'un seul ion ce qui est appelé charge résiduelle, Iribarne et Thompson [Iribarne, 1976] proposent une théorie induisant également une succession d'explosions coulombiennes jusqu'à ce que la goutte devienne très petite (d'un diamètre de l'ordre de 10 nm) et la densité de charge très élevée ; le champ électrostatique à sa surface permet ainsi d'expulser directement les ions en phase gazeuse ce qui est appelé évaporation ionique.

Au final, les ions formés sont pseudo-moléculaires, et multichargés s'ils possèdent plusieurs sites ionisables par protonation. Si les molécules ne possèdent aucun site ionisable alors l'electrospray permet la cationisation avec du sodium, potassium... ou par perte de contre-anion. En mode négatif les ions sont formés par déprotonation ou anionisation par du chlorure par exemple ou par perte d'un contre-cation.

Les ions de faible masse seraient formés préférentiellement par le mécanisme d'évaporation tandis que les ions de plus haut poids moléculaire, seraient produits à travers le mécanisme de charges résiduelles.

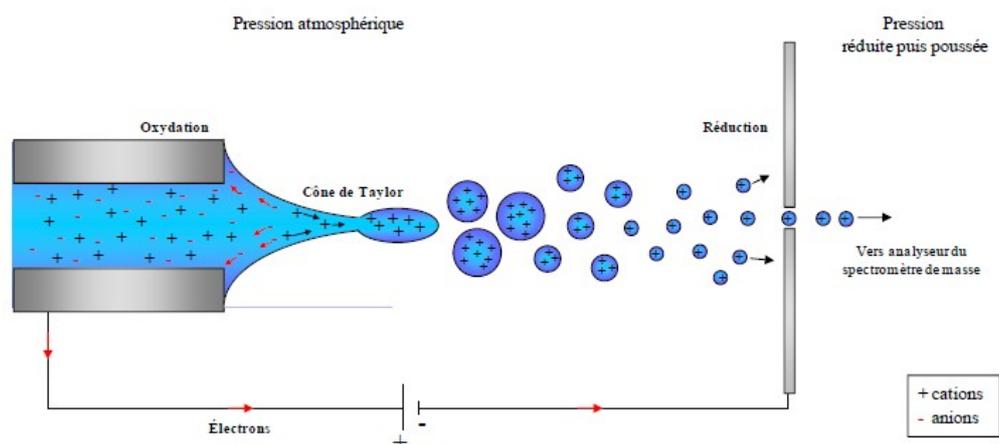


Figure 11 : Schéma de principe de l'ionisation electrospray, d'après [Kebarle, 2000].

L'ESI est une technique peu tolérante aux sels. Elle peut être couplée à des techniques de séparation appelée LC (*Chromatographie Liquide*). Cette technique permet de séparer les

composés selon différents critères : leur taille, leur polarité... Après séparation, l'échantillon arrive dans le spectromètre sous forme liquide, à des débits et des solvants compatibles avec la source ESI.

3. Principe de la trappe à ion et la C-trap

La trappe linéaire est constituée des quatre barres d'un quadripôle fermé à ses extrémités par des électrodes d'entrée et de sortie (**Figure 12**). Les tensions appliquées à ses électrodes vont permettre de repousser au centre du quadripôle les ions. Ces ions sont refroidis par un gaz inerte à faible pression, faisant des mouvements de va et vient sur l'axe z (longitudinal) entre les électrodes qui les repoussent. En plus des répulsions dues aux électrodes, une tension RF est appliquée aux 4 barres induisant une oscillation perpendiculairement à l'axe z [Douglas, 2005].

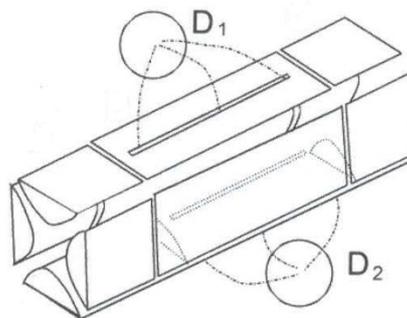


Figure 12 : Trappe linéaire ou 2D avec deux fentes dans deux barres opposées laissant passer les ions jusqu'aux détecteurs D_1 et D_2 .

Comme la trappe linéaire est constituée tel un quadripôle il va de soi que son diagramme de stabilité est le même que celui d'un quadripôle (**Figure 13**). Il utilise donc les mêmes équations de Mathieu qui sont décrites dans le paragraphe III. 2. de l'analyseur quadripolaire.

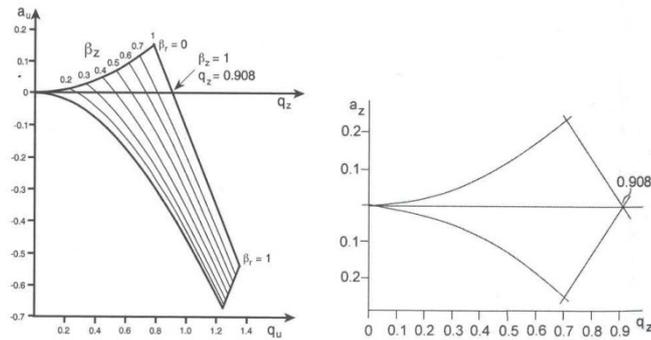


Figure 13 : Comparaison du diagramme de stabilité d'une trappe 3D (à gauche) et d'une trappe 2D (à droite) d'après [de Hoffmann, 2005].

En l'absence de tension continue ($U = 0$) c'est-à-dire que la trappe est utilisée en mode RF uniquement, le comportement des ions le long de l'axe q_z est identique à celui de la trappe de Paul (trappe 3D) (**Figure 13**).

Des tensions alternatives peuvent être appliquées pour l'excitation ou l'éjection radiale des ions, ou l'éjection peut se faire à la limite de stabilité en augmentant V .

La différence majeure entre la trappe 2D et la trappe 3D est la conformation de l'appareil. La trappe 2D est constituée de 4 barres d'un quadripôle alors que dans la trappe 3D ces 4 barres sont remplacées par une électrode annulaire recouverte de part et d'autre d'une anode.

L'avantage principal des trappes 2D par rapport aux 3D est de pouvoir stocker beaucoup plus d'ions avant d'obtenir un effet de charge d'espace dans la trappe. Ceci est dû au fait que le volume de la trappe 2D est plus grand que celui de la trappe 3D et que la focalisation se fait selon l'axe z avec une très bonne efficacité lors de l'introduction des ions alors qu'il se fait autour d'un unique point central dans le cas de la trappe 3D. Ces trois facteurs font de la trappe un appareil de plus forte sensibilité.

La différence notable également entre les deux trappes est que la trappe 2D possède 2 modes d'expulsions selon deux axes alors que la trappe 3D expulse les ions selon un unique axe z.

Avec la trappe linéaire, les ions sont expulsés :

- axialement suivant z par les effets de champs grâce à une tension alternative appliquée aux barres du quadripôle à l'électrode de sortie [Hager, 2002].
- radialement par les fentes creusées dans deux barres opposées du quadripôle grâce à une tension alternative appliquée sur les deux barres [Senko, 2002], [Schwartz, 2002].

L'extraction des ions sélective s'effectue en appliquant donc une tension alternative entre les deux barres, avec q_z fixe. Pour isoler un ion afin de le fragmenter, il suffit d'expulser les autres ions d'une masse différente grâce à une judicieuse valeur de tension alternative. Il est d'ailleurs possible de réitérer l'expérience n fois, en sélectionnant un ion à fragmenter puis en re-sélectionnant un des ions fragments obtenus lors de cette fragmentation et ainsi de suite jusqu'à ce que le signal ne soit plus suffisant et se confonde dans le bruit. Cette technique est appelée MSⁿ.

Ensuite, le transfert des ions est assuré depuis le LTQ, par un octopole, jusque dans un piège intermédiaire, la C-Trap. Cette trappe est capable de piéger les ions sur une large gamme de masse, sans effet temps de vol. Les ions sont ensuite expulsés vers l'Orbitrap.

C'est grâce à l'utilisation d'un vide très poussé (10^{-11} hPa) et d'une injection rapide des ions depuis la C-Trap que les ions restent stables pendant plusieurs secondes dans l'Orbitrap. Ce phénomène permet d'atteindre des résolutions très élevées (100 000), et une excellente précision de masse (< 1 ppm).

4. Principe de l'Orbitrap

L'orbitrap a été conçu par Makarov [Makarov, 2000] et se compose d'une électrode creuse externe à l'intérieur de laquelle se trouve coaxialement une électrode en forme de fuseau

(**Figure 14**). Ces 2 formes agencées ainsi induisent un champ électrostatique (selon z). Les ions sont injectés tangentiellement à ce champ. Ces ions se retrouvent piégés autour de l'électrode centrale. Ainsi le mouvement des ions est défini de deux manières : un mouvement circulaire autour de l'électrode interne (plan xy) et un mouvement que l'on appelle de « va-et-vient » selon l'axe z. La fréquence des harmoniques du mouvement des ions ne dépend ni de leur vitesse ni de leur énergie mais dépend de l'inverse de la racine du carré du rapport masse/charge et du temps d'acquisition ($1/2\pi\sqrt{(kmz)}$). Ce mouvement permet de générer un courant induit qui est basé sur le même principe que le FT-ICR, qui est amplifié et converti en spectre de masse par un algorithme de transformée de Fourier. Cette technologie présente l'avantage de ne pas utiliser d'aimant supra conducteur, contrairement à la technologie FT-ICR.

La précision de masse est particulièrement excellente de l'ordre de 1 ppm, la résolution en masse atteint 150 000, la gamme dynamique est élevée (1000) [Hu, 2005] et surtout la capacité de piégeage y est très bonne.

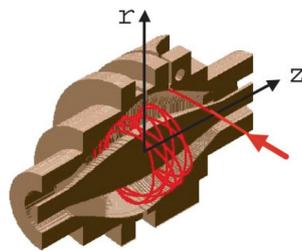


Figure 14 : Schéma de principe d'un analyseur Orbitrap.

3. L'APPI-Q-ToF

1. L'instrument : le Q-Star Pulsar i



Figure 15 : Le Q-Star Pulsar i par Applied Biosystems Sciex.

Le spectromètre de masse Q-Star Pulsar i est un spectromètre hybride de type quadripôle/temps de vol, commercialisé par la société Applied Biosystems Sciex (Les Ulis, France), couplé dans le cas de mes expériences à une source Atmospheric Pressure PhotoIonization (APPI) Photospray™ (**Figure 15, 16**). Il a été transféré sur la ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL le 22 novembre 2007 dans le but de remplacer la lampe UV de la source APPI par le rayonnement délivré par la ligne de lumière. En effet l'avantage du rayonnement synchrotron SOLEIL comme précisé au début du précédent chapitre est de pouvoir choisir grâce à un monochromateur n'importe quelle longueur d'onde entre 60 nm et 350 nm, au lieu d'une longueur d'onde unique avec une lampe monochromatique.

Le Q-Star Pulsar i peut aussi être associé à une source ESI, MALDI comme à une source APPI.

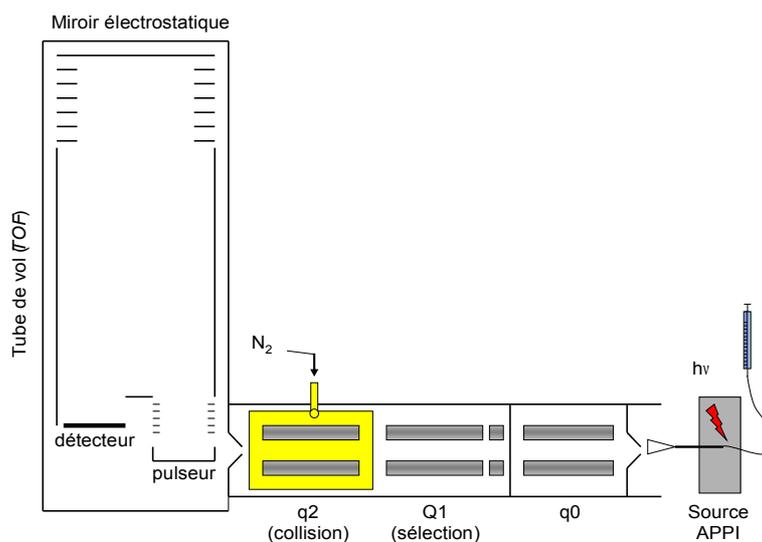


Figure 16 : Schéma de principe du spectromètre de masse Qstar pulsar i.

2. La source d'ionisation APPI

L'analyte est introduit à travers une boucle d'injection de 20 μL alors que le dopant est injecté à l'aide d'un pousse seringue avec un débit fixé selon la nécessité de l'expérience. Le solvant est introduit grâce à une pompe Agilent 1100 Series HPLC à un flux ajusté selon l'expérience désirée.

Des capillaires sont associés à deux entrées de gaz nébuliseur qui vont aider à la formation d'un nébulisat. Comme précédemment décrit dans le chapitre APPI, les échantillons sont nébulisés dans un tube en quartz chauffé entre 300 et 500°C. La vapeur ainsi formée se retrouve exposée aux photons UV provenant soit d'une lampe à décharge, dans notre cas une lampe à Krypton (émettant deux raies à 10,0 eV et 10,6 eV) [Robb, 2000], soit du rayonnement synchrotron [Giuliani, 2009]. Il a été spécialement conçu une boîte-source pour laisser entrer le faisceau à la place exacte où se situait la lampe à Krypton. C'est au niveau de cette région que va se produire la photoionisation.

Les ions formés sont transférés dans le spectromètre de masse par application d'une différence de potentiel entre le bloc source et la curtain plate du spectromètre. Comme dans

toute source à pression atmosphérique (ESI, APPI) pouvant être adaptée sur le spectromètre Q-Star, on utilise un gaz rideau afin de protéger le spectromètre d'une pollution et d'aider à la désolvatation.

3. L'analyseur de type quadripolaire

Les avantages du spectromètre quadripolaire sont sa facilité d'utilisation, sa résolution unitaire (séparation uniquement des ions distants d'une unité de masse) sur toute sa gamme de masse, sa vitesse de balayage très élevée, sa facilité de maintenance.

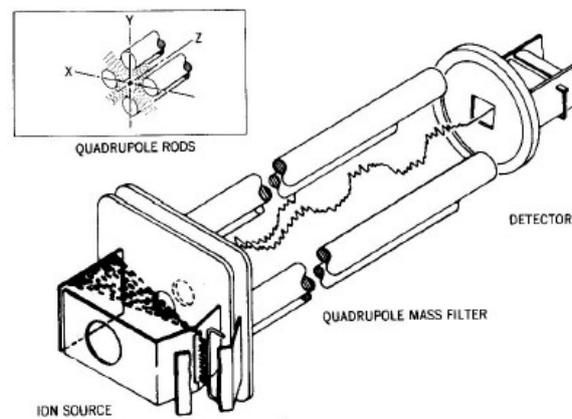


Figure 17 : Schéma d'un analyseur quadripolaire d'après [Watson, 1997].

L'analyseur quadripolaire utilise des champs électriques variables pour séparer des ions en fonction de leurs rapports masse-sur-charge. Le quadripôle est constitué de quatre électrodes métalliques de section idéalement hyperboliques parallèles [Dawson, 1986] (**Figure 17**), le plus souvent circulaires, et soumises deux à deux à un potentiel $\pm \Phi_0$ composé d'une tension continue U et d'une tension alternative du potentiel de radiofréquence $V \cdot \cos \omega t$. V et ω sont, respectivement, l'amplitude et la pulsation de la tension alternative. La valeur de ω est fixée par le constructeur. Les électrodes adjacentes distantes de $2r_0$ sont portées à des potentiels de même valeur, mais opposés de sorte que l'écart de potentiel soit égal à Φ_0 . Ainsi deux des

électrodes symétriques par rapport à l'axe central du quadripôle sont portées à un potentiel de type $\Phi_0 = U + V \cos \omega t$, les deux autres sont donc au même potentiel mais avec le signe opposé $\Phi_0 = (-U - V \cos \omega t)$. Les polarités des électrodes sont rapidement inversées, leur amplitude radiale dépend des paramètres U et V. Ce principe de fonctionnement est décrit par Paul et Steinwedel [Paul & Steinwedel, 1953] qui a intitulé ce système spectromètre de masse quelques années plus tard [Paul, 1958]. Un point de coordonnées (x,y,z) situé dans le champ électrique sera alors soumis au potentiel : $\Phi = \Phi_0 (x^2 - y^2) / r_0^2$

La trajectoire d'un ion pénétrant dans le quadripôle sera donc uniforme selon l'axe z et décrite par les équations de [Mathieu](#) selon les deux autres axes.

$$d^2u/d\xi^2 + a_u - 2q_u \cos 2\xi u = 0$$

$$u = x \text{ ou } y, \quad \xi = \omega t^2, \quad \text{et il y a : } a_u = 8zeU / m r_0^2 \omega^2 ; \quad q_u = 4zeV / m r_0^2 \omega^2$$

avec r_0 : le rayon du cercle inscrit entre les 4 barres

ω : la fréquence angulaire telle que $\omega = 2\pi f$ où f est la fréquence du champ alternatif

m : la masse de l'ion

ze : la charge de l'ion

a_u et q_u : les solutions de l'équation différentielle de Mathieu

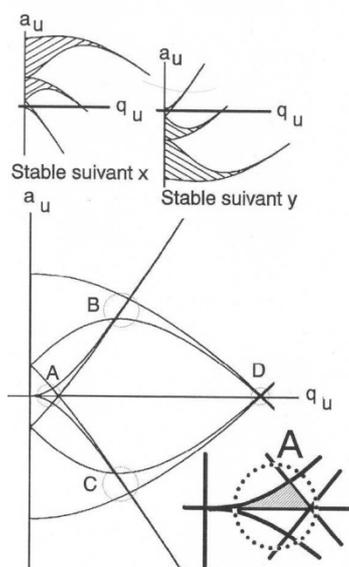


Figure 18 : Diagramme de stabilité d'un ion de masse m donnée selon x ou y dans un quadripôle. Les zones de stabilité sont entourées et notées A à D. La zone A (agrandie) est la zone couramment utilisée dans les spectromètres de masse. La partie hachurée correspond à U positif, d'après [March, 1989].

Selon les valeurs de U et V , que l'on fait varier, les ions adoptent des trajectoires stables (**Figure 18**). Ces ions peuvent être détectés, les autres ceux qui heurtent les électrodes ou les parois internes du spectromètre, ne peuvent donc pas être détectés ; ils se déchargent et sont entraînés par le système de pompage. A une valeur de U et de V données, ne sont détectés que les ions d'un m/z donné.

Il est permis de détecter les masses grâce à un balayage de U et V avec U/V constant. Plus la pente est élevée et meilleure est la résolution (résolution unitaire avec séparation des ions distants d'une unité de masse). Ce phénomène est traduit dans la figure ci-dessous (**Figure 18 et 19**).

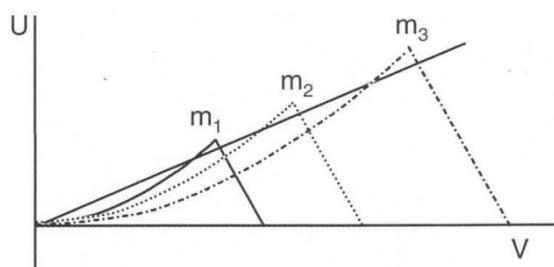


Figure 19 : Droite de fonctionnement. La résolution entre ces ions est d'autant plus grande que la pente de la droite est élevée.

4. Le temps de vol orthogonal (o-ToF)

Il faut noter que les sources d'ionisation MALDI sont particulièrement bien adaptées aux analyseurs à temps-de-vol car ce sont des sources pulsées qui permettent de donner un départ simple de la mesure des temps. Les sources electrospray sont, quant à elles, des sources d'ions continues. Ce type de source est plus souvent associé à des analyseurs quadripolaires qui offrent une analyse par balayage et ont une gamme de masse limitée. En effet, l'analyse par balayage a pour inconvénient de transmettre un seul type d'ion à la fois d'un rapport m/z donné, ce qui a pour effet de réduire la sensibilité. Ainsi le couplage des sources electrospray avec des analyseurs ToF [Dodonov, 1987] a pour but de contrer ce désavantage et d'aboutir à une gamme de masse très étendue et une grande sensibilité. Afin de pouvoir coupler ces sources continues avec un analyseur ToF, il a fallu modifier le système d'entrée des ions.

La **Figure 20** montre qu'un spectromètre muni d'un analyseur ToF orthogonal est constitué d'un modulateur ou pulseur qui permet de stocker puis d'injecter de façon pulsée les ions dans un analyseur ToF muni d'un miroir électrostatique.

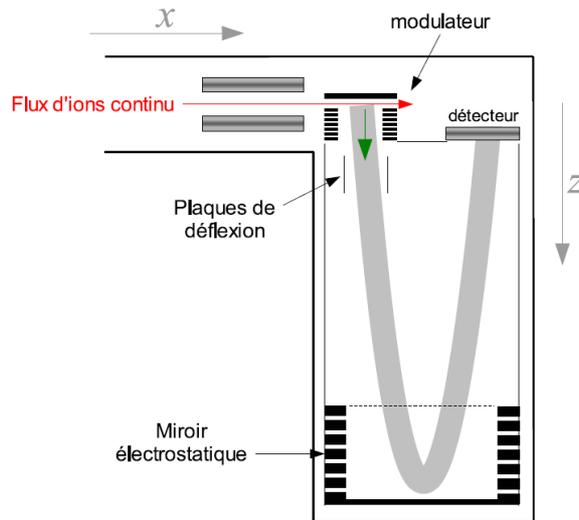


Figure 20 : Schéma de principe d'un analyseur temps-de-vol à injection orthogonale

Les analyseurs ToF ont l'avantage de s'affranchir de la dispersion longitudinale en énergie et en temps du faisceau initial injecté dans le pulseur selon l'axe orthogonal [O'Halloran, 1964]. Cette configuration permet d'obtenir une haute résolution.

5. L'analyseur hybride Q-ToF

Comme indiqué dans son intitulé l'analyseur hybride Q-ToF est composé d'un double quadripôle, séparés par une cellule de collision qui est généralement un quadripôle plus court et d'un deuxième analyseur qui est le temps de vol (**Figure 21**).

q_2 est considéré comme une cellule de collision et permet par ailleurs de refocaliser et de thermaliser les ions avant de les injecter dans le temps de vol (ToF) en les accélérant à travers le modulateur ionique seul. Q_1 sert d'analyseur de masse et peut à la fois être balayé sur toute la gamme de masse ce qui a pour effet de différencier la totalité des ions ou filtrer un ion précurseur pour le quadripôle suivant. q_0 permet de guider les ions formés. La cellule de collision est remplie d'un gaz inerte à haute pression (10^{-5} hPa) afin de focaliser les ions au centre des quadripôles.

Cet agencement d'un quadripôle puis d'un ToF permet de conjuguer des avantages par rapport à un ordinaire triple quadripôle [Morris, 1996], [Shevchenko, 1997]. En effet, le quadripôle apporte une grande efficacité au niveau de la MS/MS, tandis que le ToF avec son pulseur, son mode réflectron, extraction retardée et o-ToF (**Figure 21**), apporte son excellente sensibilité, une grande rapidité d'analyse, une résolution (10 000) et précision en masse bien meilleure sur les ions produits (2-4 ppm en MS/MS), par rapport à une configuration triple quadripôle. La gamme de masse de Q_1 se limite à 3 000.

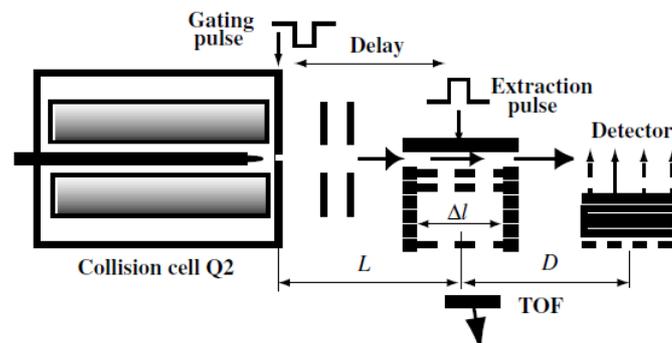


Figure 21 : Schéma agrandi sur la zone du couplage du quadripôle avec la cellule de collision q_2 et du ToF (pulseur, extraction retardée) illustrant les impulsions d'ions par la cellule de collision [Chernushevich, 2001].

Ce spectromètre hybride peut travailler dans divers modes :

- Q_1 -scan : comme son nom l'indique l'analyse en masse se fait à travers le quadripôle, et le temps-de-vol n'a donc aucun rôle de séparation des ions.
- ToF-MS : c'est le mode le plus couramment utilisé. L'analyseur ToF va séparer les ions en fonction de leur rapport m/z , selon le temps nécessaire pour qu'ils atteignent le détecteur. Dans ce mode, les quadripôles ne servent qu'à focaliser les ions avant l'injection dans le temps-de-vol.

- *Product ion* : c'est le mode MS/MS classique. Le quadripôle Q_1 sélectionne un ion de m/z fixé par l'utilisateur. L'ion sélectionné est ensuite fragmenté dans q_2 , par collisions avec des molécules d'azote (N_2) ou d'Argon (Ar). Les ions fragments alors obtenus sont injectés et analysés dans le tube de vol (ToF).
- *Precursor ion* : pendant qu'il y a balayage du quadripôle Q_1 , le ToF fonctionne de manière classique. A un ion fragment m/z donné dans le ToF, est lié un ou plusieurs précurseurs d'une valeur de m/z au niveau de Q_1 . La valeur du rapport m/z de tous les ions qui ont fragmenté pour arriver à cet ion fragment de m/z donnée est alors aisée.

6. Paramètres instrumentaux caractérisant l'interface

Sur le Q-Star il est possible de modifier certains paramètres comme la différence de potentiel entre lentilles, afin d'optimiser le spectre et le rapport signal/bruit (**Figure 22 et Tableau 2**).

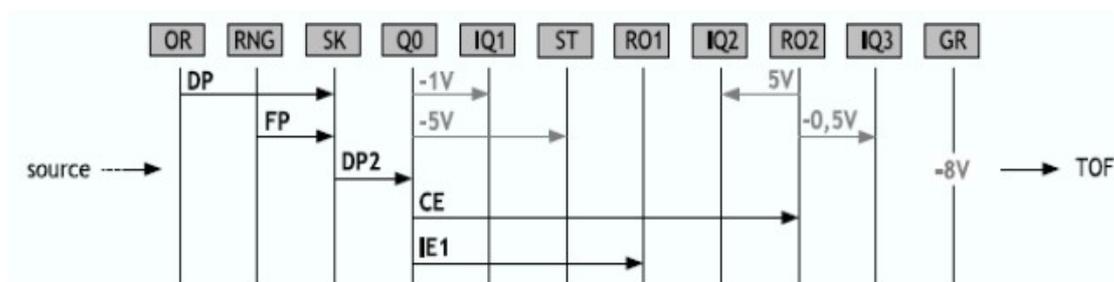


Figure 22 : Schéma des différences de potentiel appliquées entre les différentes lentilles du Qstar (OR : orifice, SK : skimmer, Q_0 : quadripôle 0, IQ_1 : interface quadripôle 1, RO_1 : quadripôle 1, IQ_2 : interface quadripôle 2, RO_2 : quadripôle 2) [Bagag, 2008]

Paramètres	Signification
GS1	Gaz nébuliseur (en psi)
GS2	Gaz nébuliseur 2 (TurboSpray et Photospray uniquement) (psi)
CUR	Gaz rideau empêche toute pollution d'interagir entre l'analyseur et l'échantillon
CAD	Gaz dans le quadripôle q2 (gaz de collision MS/MS ou de focalisation en MS) (unités arbitraires)
ISV	<i>Ion Source Voltage</i> , potentiel appliqué sur le capillaire electrospray (en IonSpray, NanoSpray ou TurboSpray) ou sur le bloc source (en Photospray) (V)
TEM	Température de la source (TurboSpray et Photospray uniquement) (°C)
DP1	<i>Declustering potential</i> (V) différence de potentiels entre le skimmer et l'orifice
FP	<i>Focusing potential</i> (V) potentiel difference entre le skimmer et le focusing ring
DP2	<i>Declustering potential 2</i> (V) différence de potentiel entre le quadripôle Q ₀ et le skimmer
IE1	Ion energy (V)
CE	<i>Collision energy</i> (en MS/MS uniquement) (V)
MCP	Tension appliquée aux bornes du détecteur (V)
IRD a	<i>Ion release width</i>
IRW b	<i>Ion release delay</i>

a, b Ces paramètres sont généralement fixés automatiquement par le logiciel en fonction de la gamme de m/z choisi

Tableau 2 : Les paramètres instrumentaux que l'utilisateur peut modifier à partir de

[Bagag, 2008].

7. Le détecteur du Q-Star i Pulsar

Le détecteur du Q-Star est composé de deux galettes de micro-canaux montées en chevron avec l'anode de collection qui est dans ce cas précis séparée en quatre quadrants indépendants (**Figure 23**). En effet ce système est particulièrement efficace lorsqu'il est couplé avec quatre convertisseurs temps-numérique. Ce genre de détecteur permet une plus grande dynamique de l'appareil, c'est-à-dire le rapport du signal maximal sur le signal minimal mesurables sur un même spectre, et une meilleure détection des signaux ioniques de très faible amplitude, ce qui est très important afin de détecter les ions fragments minoritaires mais d'intérêt.

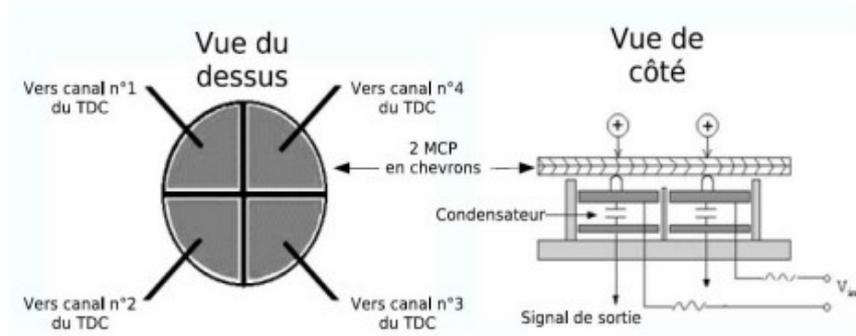


Figure 23 : Schémas du détecteur à double MCP (Multiple Channel Plate, Galette de micro-canaux) en chevron avec anode séparée en quatre quadrants (d'après la documentation IonWerks).

REFERENCES

B

[Brown and Lennon, 1998] R. S. Brown, J. J. Lennon, Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer, *Anal. Chem.*, 67, 1995, 1998.

C

[Chernushevich, 2001] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B. A. Thomson, An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 36, 2001, 849.

[Cotter, 1992] R. J. Cotter, Time of flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules, *Anal. Chem.*, 64, 1992, 1027A.

[Colby, 1994] S. M. Colby, T. B. King, J. P. Reilly, D. M. Lubman, Improving the resolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry by exploiting the correlation between ion position and velocity, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 8, 1994, 865.

D

[Dawson, 1986] P. H. Dawson, Quadrupole mass analysers : performance, design and some recent applications, *Mass Spectrom. Rev.*, 5, 1986, 1.

[Dole, 1968] M. Dole, R. L. Hines, R. C. Mack, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* 5, 1968, 2240.

[Douglas, 2005] D. J. Douglas, A. J. Frank, D. Mao, Linear ion traps in mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, 24, 2005, 1.

F

[Frankevich, 2003] V. E. Frankevich, J. Zhang, S. D. Friess, M. Dashtiev, R. Zenobi, Role of electrons in laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 75, 2003, 6063.

G

[Giuliani, 2009] A. Giuliani, F. Jamme, V. Rouam, F. Wien, J.L. Giorgetta, B. Lagarde, O. Chubar, S. Bac, I. Yao, S. Rey, C. Herbeaux, J. L. Marlats, D. Zerbib, F. Polack, M. Réfrégiers, DISCO: a low-energy multipurpose beamline at synchrotron SOLEIL, *Synchrotron Rad.*, 16, 2009, 835.

H

[Hager, 2002] J. W. Hager, A new linear trap mass spectrometer, *Rapid. Comm. Mass Spectrom.*, 16, 2002, 512.

[de Hoffmann, 2005] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Spectrométrie de masse*, 3ed., Dunod, 2005.

[Hu, 2005] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 4, 2005, 430.

I

[Iribarne, 1976] J. V. Iribarne, B. A. Thompson. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* 6, 1976, 2287.

J

[Jaskolla, 2008] T. W. Jaskolla, W. D. Lehmann, M. Karas, 4-Chloro-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix, *PNAS*, 105, 2008, 12200.

K

[Karas, 1985] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet-laser desorption mass-spectrometry of organic-molecules, *Anal. Chem.*, 14, 1985, 2935.

[Karas, 2000] M. Karas, M. Gluckmann, J. Schafer, Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom.* 35, 2000, 1.

[Karataev, 1972] V. I. Karataev, B. A. Mamyrin, D. V. Shmikk, New method for focusing ion bunches in time-of-flight mass spectrometers, *Soviet Phys.-Tech. Phys.*, 16, 1972, 1177.

[Kebarle, 2000] P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 7, 2000, 804.

[Knochenmuss, 2006] R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi, Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Mass Spectrom.*, 35, 2000, 1237.

M

[Makarov, 2000] A. Makarov, Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* 6, 2000, 1156.

[Mamyrin, 1973] B. A Mamyrin, V. I Karataev, D. V Shmikk, V. A. Zagulin, The mass reflection, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution, *Sov. Phys.-JETP*, 37, 1973, 45.

[March, 1989] R. E. March, A. W. McMahon, F. A. Londry R. L. Alfred, J. F. J. Todd, F. Vedel, Resonance excitation of ions stored in a quadrupole ion trap. part 1. a simulation study, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 95, 1989, 119.

[Morris, 1996] H. R. Morris, T. Paxton, A. Dell, J. Langhorne, M. Berg, R. S. Bordoli, J. Hoyes, R. H. Bateman, High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a Novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 11, 1996, 1055.

O

[O'Halloran, 1964] G. J. O'Halloran, R. A. Fluegge, J. F. Betts, W. L. Everett, *Technical Documentary Report ASD-TDR-62-644*, The Bendix Corporation, Research Laboratory Division : Southfield, MI, 1964.

P

[Paul & Steinwedel, 1953] W. Paul, S. Steinwedel, Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld, *Z. Naturforsch.*, 8a, 1953, 448.

[Paul, 1958] W. Paul, P. Reinhard, U. von Zahn, [Das elektrische massenfilter als massenspektrometer und isotopentrenner](#) *Z. Phys.*, 152, 1958, 143.

R

[Rayleigh, 1882] Lord Rayleigh, On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity, *Philosophical Magazine*, 1882, 14, 184.

[Robb, 2000] D. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, [Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry](#), *Anal. Chem.*, 72, 2000, 3653.

S

[Salpin, 2003] J. Y. Salpin, *Spectrométrie de masse à temps de vol*. 8ème rencontres du CJSM, La Bresse, 24-28 mars 2003.

[Schwartz, 2002] J. C. Schwartz, M. W. Senko, J. E. P. Syka, A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer, proceedings of the 50th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, Orlando, Florida, June 2-6 2002.

[Senko, 2002] M. W. Senko, J. C. Schwartz, Trapping efficiency measured in a 2D ion trap mass spectrometer, proceedings of the 50th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, Orlando, Florida, June 2-6.

[Shevchenko, 1997] A. I. [Chernushevich](#), W. [Ens](#), K. G. [Standing](#), B. [Thomson](#), M. [Wilm](#), M. [Mann](#), Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer, *Rapid. Comm. Mass Spectrom.*, 11, 1997, 1015.

[Strupat, 1991] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, 2, 5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 111, 1991, 89.

T

[Tanaka, 1988] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido., S. Akita, T. Yoshida, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2, 1988, 151.

V

[Vestal, 1995] M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin, Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 9, 1995, 1044.

W

[Watson, 1997] J. T. Watson, Introduction to mass spectrometry, 1997.

Y

[Yang, 2010] C. H. Yang, Detection and sequencing of microrna using maldi time-of-flight mass spectrometry, A Thesis Submitted to the Faculty of The Graduate School at The University of North Carolina at Greensboro, 2010.

Z

[Zeleny, 1917] J. Zeleny. Instability of electrified liquid surfaces. *Phys. Rev.* 1, 1917, 1.

Chapitre 2 :

L'APPI

(Photo-Ionisation à Pression Atmosphérique)

CHAPITRE 2 : L'APPI (Photo-Ionisation à Pression Atmosphérique)

3. Introduction et historique

La photoionisation peut être définie comme l'interaction du rayonnement électromagnétique avec la matière résultant, en la dissociation de cette matière en des particules électriquement chargées. L'approche de la photoionisation par les scientifiques se fait sous deux angles différents ; l'un physique (1) et l'autre chimique (2).

1) Approche physique

L'étude des interactions des photons à partir d'une source accordable UV avec un faisceau moléculaire à une température fixée, a pour but de déterminer précisément quelques paramètres physiques comme par exemple les énergies d'ionisation (EIs) adiabatiques ou verticales [Gaie Levrel, 2011] [Lam, 2011] [Kostko, 2008]. Ces expériences sont effectuées sous vide dans le but de générer des molécules isolées en phase gazeuse et des clusters.

L'énergie d'ionisation est par définition l'énergie à fournir au système afin de lui arracher un électron. Lors de la photoionisation, il y a changement de l'état électronique de la molécule. Il y a deux façons de définir l'énergie d'ionisation, adiabatique ou verticale, selon le principe de Franck-Condon (*Figure 1*).

, E
, r
E_{Iv}
E_{Ia}
 $v'' = 0$
 $v' = 0$

Figure 1: Diagramme énergétique de la distance interatomique d'une molécule en fonction de l'énergie. P_{Iv} indique la transition verticale et P_{Ia} la transition adiabatique.

2) Approche chimique

Elle consiste en la production de faisceaux intenses de molécules ou de fragments chimiques pour la spectrométrie quantitative ou structurale. Dans ce cas, les ions sont générés par l'interaction de photons UV à partir de la lampe à décharge avec un faisceau contenant le solvant, l'analyte et le dopant dans la phase gazeuse et à pression atmosphérique (APPI) [Syage, 2004], [Robb,2008], [Bagag, 2008a], [Bagag, 2007], [Debois, 2006], [Delobel, 2003], [Bagag, 2011], [Giuliani, 2011].

La photoionisation nécessite une source générant des photons telle qu'une lampe à décharge dans le domaine de l'UV ou un faisceau synchrotron. L'ionisation simple photon n'est possible que si un des photons généré par la source est absorbé par une espèce possédant une énergie de première ionisation (EI) inférieure à l'énergie des photons. En conséquence afin d'ioniser l'analyte sélectivement et non pas le gaz porteur, la lampe de photoionisation doit être choisie pour que l'énergie des photons soit comprise entre l'énergie de première ionisation de l'analyte et celui du gaz porteur comme décrit ci-dessous :

$$EI(\text{analyte}) < h\nu_{\text{lampe à décharge}} < EI(\text{gaz porteur})$$



1. Photoionisation couplée à la chromatographie en phase gazeuse (PID/GC)

L'utilisation de la photoionisation comme méthode de détection (PID) en chromatographie en phase gazeuse (GC) a été introduite par Lovelock en 1960 [Lovelock, 1960 et 1961]. Ce fut Driscoll le premier qui développa puis commercialisa un dispositif d'électrodes conçu spécialement pour la détection des ions au sein d'une PID [Driscoll, 1976]. Cette technique

couplée à la GC est basée sur la mesure du courant électrique au niveau d'une électrode de collecte des ions générés par la lampe. C'est la configuration annulaire de l'anode directement exposée à l'énergie radiante et la cathode à l'abri de la source d'énergie soit derrière un métal ou un matériau plastique qui permet de réduire la création de photoélectrons non désirés en faisant écran. C'est cette diminution des photoélectrons provenant de la radiation UV frappant la cathode qui permet de minimiser le bruit de fond. Driscoll fut suivi par Davenport en 1984 qui discuta des détecteurs photoioniques [Davenport, 1984] et de Patterson qui compara et lista différentes méthodes sur les éluants GC ionisants [Patterson, 1986]. L'ionisation sélective des analytes est possible en PID/GC puisque la plupart des molécules organiques ont des potentiels d'ionisation compris entre 8 et 11 eV [Butcher, 1999] et les gaz porteurs courants en GC ont des valeurs plus élevées (**Tableau 1**).

2. Détection par photoionisation couplée à la chromatographie en phase liquide (PI/LC)

Comme pour la PID/GC, la PI/LC repose sur la détection du courant des photoions. [Schmermund, 1975], [Locke, 1982] sans analyse de masse consécutive mais avec une étape de vaporisation à la sortie de LC pour la majorité des expériences. De même que pour la PID/GC la majorité des solvants ont des potentiels élevés (**Tableau 1**) et une photoionisation sélective est possible. A part une expérience de photoionisation sur un éluant liquide [Locke, 1982] toutes les autres expériences ont un principe proche de la PID/GC.

Solvant ou gaz	Energie d'ionisation (eV)
Diazote	15,58
Dioxyde de carbone	13,78
Eau	12,62
Acétonitrile	12,20
Dioxygène	12,07
Méthanol	10,80
Isopropanol	10,17
n-hexane	10,13
Ammoniaque	10,07

Heptane	9,93
Hexafluorobenzène	9,90
Acétone	9,70
Benzène	9,24
Toluène	8,83
Anisole	8,20

Tableau : Energies d'ionisation de divers composés organiques (valeurs obtenues sur le NIST Webbook, [http : //webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov)).

3. Photoionisation à pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse

Les premières expériences de PI couplées à la spectrométrie de masse sont liées à la spectrométrie à mobilité ionique (IMS) [Baim, 1983], [Leasure, 1986]. C'est ensuite en 1991 que Revel'skii associa une lampe à décharge Vacuum Ultra Violet (VUV) à la place d'une source ^{63}Ni d'un nébuleur avec un analyseur de masse, quadripôle [Revel'skii, 1986, 1989 a et b]. Le nébuleur en ^{63}Ni a le sérieux désavantage d'être un matériel radioactif et donc d'engendrer de nombreuses contraintes [Horning, 1974]. Lors de ces expériences, l'ionisation était effectuée avec l'hélium comme gaz porteur qui amène le mélange d'analytes jusqu'à la source de photons, une lampe à hydrogène ($h\nu = 10,2 \text{ eV}$). Les ions ainsi produits pouvaient être analysés par le quadripôle.

Il résulte de ces expériences que l'abondance relative des ions dépend de la concentration de l'échantillon. A forte concentration, les réactions ion-molécules, dont les transferts de charges, ont pour effet de modifier l'allure du spectre et de transférer la majorité des charges sur les espèces de plus faible IP. Les auteurs ont également observé que des espèces moléculaires ou pseudo-moléculaires étaient formées par APPI indiquant que peu de fragmentations se déroulent pendant la phase d'ionisation. Leur dernière observation porte sur le fait que l'augmentation de la concentration de la vapeur des solvants étudiés (eau et méthanol) induit une perte de sensibilité. DeWit a décrit que les solvants vaporisés en absorbant les photons diminuent le flux disponible pour créer des photoions à partir de l'analyte [DeWit, 1987].

De nombreux instruments de spectrométrie de masse reposent sur le principe de décharge corona pour obtenir une ionisation telle que l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Dans une source de ce type, un fort potentiel est nécessaire pour créer et maintenir la décharge. Afin que la source à décharge corona fonctionne, un fort champ électrique doit se situer à la pointe de l'aiguille et le champ électrique maintenu grâce à un potentiel appliqué entre l'aiguille et le tube transportant les ions vers l'analyseur, accélérés par ce champ. Inversement, si le potentiel du tube est maintenu à une valeur proche de celle de l'aiguille, une perte importante d'ions se produira en plus de la diminution de la quantité d'ions formés en raison de l'absence d'un champ suffisamment élevé aux environs de l'aiguille.

Forts de ces résultats Bruins *et al.* développèrent leur propre source d'ions APPI, la source Photospray™ [Robb , 2000]. Il s'agit d'une source APCI dont l'aiguille générant une décharge corona a été remplacée par une lampe UV. Plusieurs types de lampes pour photoionisation sont adaptables à cette source, des lampes à débit pulsé comme des lampes à débit continu, cependant le montage utilise une lampe à débit continu. Le but de cette source est de pouvoir étendre le domaine d'application de la chromatographie liquide à des molécules difficilement ionisables par electrospray (ESI) ou ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

C'est cette source qui a été utilisée lors des expériences faites au cours de cette thèse. La source utilisée se compose et fonctionne de la façon suivante (**Figure 2**) : Il existe trois capillaires afin d'introduire les composés à analyser. L'analyte est introduit par une boucle d'injection de 20 µL. Il est possible d'ajouter, selon la nécessité de l'expérience, le dopant à l'aide d'un pousse seringue à un débit fixé au préalable. Le solvant est introduit grâce à une pompe Agilent 1100 Series HPLC à un flux ajusté selon l'expérience désirée.

Ces capillaires sont associés à deux entrées de gaz nébuliseur qui vont aider à la formation d'un nébulisat. Les échantillons sont nébulisés dans un tube en quartz chauffé entre 300 et

500 °C pour y être vaporisés. La vapeur ainsi formée se retrouve exposée aux photons UV provenant d'une lampe à décharge dans notre cas une lampe à Krypton (à 10,0 eV et 10,6 eV) [Robb, 2000] ou du rayonnement synchrotron [Giuliani, 2009]. Dans le cas du rayonnement synchrotron, un bloc source a été spécialement conçu pour recevoir le faisceau, en remplacement du bloc source recevant la lampe au Krypton. C'est au niveau de cette région, libre de champ, que va se produire la photoionisation.

Les ions formés sont transférés dans le spectromètre de masse par application d'une différence de potentiel entre le bloc source et la curtain plate du spectromètre. Comme dans toute source à pression atmosphérique (ESI, APPI) adaptable au spectromètre Q-Star, on utilise un gaz rideau à contre-courant des ions afin de protéger le spectromètre d'une pollution et d'aider à la désolvatation.

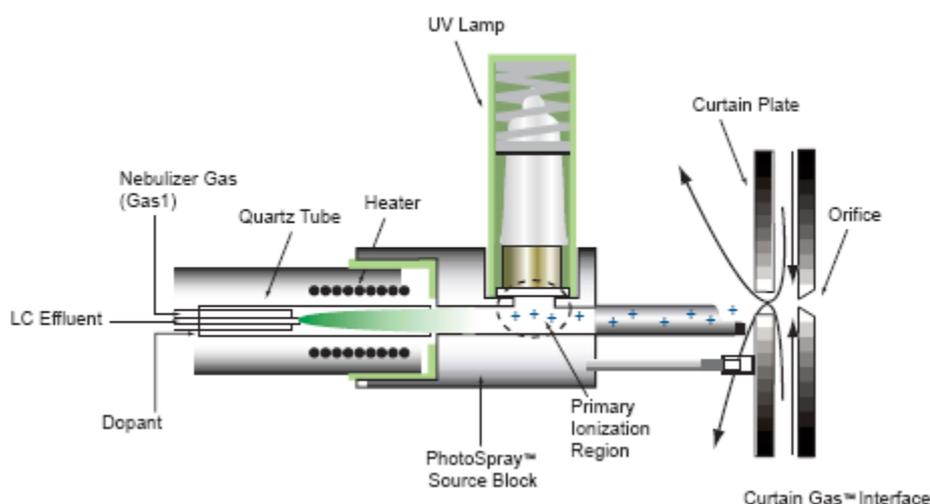


Figure 2 : Schéma de la source Photospray™ commercialisée par AB Sciex.

A la même période, Syage *et al.* ont développé également une source basée sur la source APCI de Agilent [Syage, 2001] (**Figure 3**). A la différence de la source Photospray™, cette source a été spécialement conçue afin qu'aucun dopant ne soit nécessaire. Cependant différentes études ont démontré [Hanold, 2004] que la photoionisation directe des analytes se produisait beaucoup plus fréquemment avec la source Photospray™.

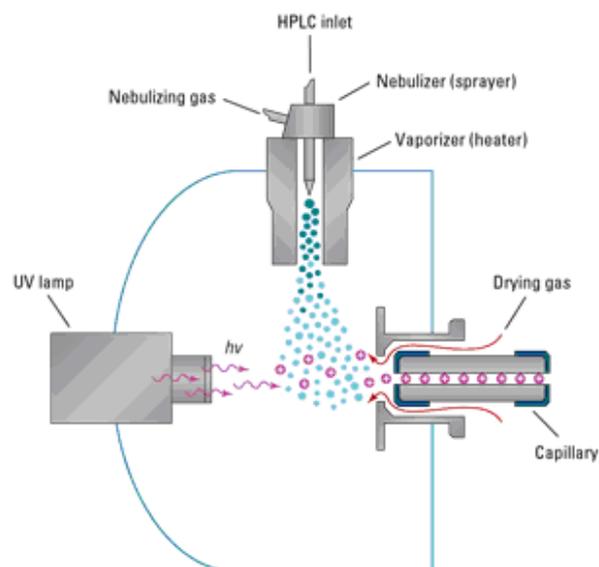


Figure 3: Schéma de principe de la source Photomate™ par Sygen Technologies inc., d'après les documents Agilent (<http://www.chem.agilent.com>)

L'avantage de l'APPI est que le potentiel dans le tube peut être contrôlé indépendamment afin d'optimiser le transport des ions. De plus aucun matériel radioactif, du genre ^{63}Ni , n'est employé.

4. Le thermospray

La source Photospray™ est basée sur la vaporisation des analytes en solution grâce à un thermospray. L'ionisation thermospray est un procédé où les ions présents dans le flux liquide de l'échantillon sont libérés dans la phase gazeuse. L'évaporation des ions se déroule à partir des gouttelettes. Lors de leur diminution, pendant la vaporisation chauffée, la densité de charge à leur surface augmente, générant des ions pseudo-moléculaires en phase gazeuse sans fragmentation [Vestal, 1983]. Sakairi *et al.* avec une LC/API-MS en utilisant une interface avec un nébuliseur chauffé et un vaporisateur observèrent les premiers les ions $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à partir d'un peptide [Sakairi, 1988] comme notre laboratoire en utilisant une source

Photospray™ avec la lampe éteinte ou encore appelé mode « *lamp off* ». Le mode thermospray permet d'obtenir des fragmentations mineures, et les composés ionisés subissent très peu voire quasi jamais de dégradation thermique [Giuliani, 2006] et [Bagag, 2007]. Pour confirmer cela, des études par thermospray, à partir de trois mélanges de sels de benzylpyridinium substitués et préparés dans le méthanol, ont été menés au sein du laboratoire [Bagag, 2008b]. Les conclusions sont les suivantes :

- Le chauffage de la source n'induit pas d'effet sur la distribution en énergie interne des ions.
- L'influence de la température dans deux systèmes de solvants a permis d'obtenir les résultats suivants : la stabilité au niveau de l'énergie interne lors du chauffage du spray et le rôle de protection lors de la formation des ions grâce à la solvation par des microgouttelettes du solvant.
- le débit de solvant n'a pas d'effet sur l'énergie interne des ions formés dans la source d'ion.
- Contrairement à la tension de cône DP (Declustering Potential), on observe que plus la tension FP (Focusing Potential) appliquée aux ions diminue, plus les courbes retraçant la DP en fonction de la FP s'affinent. Ces courbes sont toutes centrées sur la même valeur d'énergie qui est d'environ 1,67 eV.
- Il y a refroidissement des ions avec l'augmentation du potentiel d'extraction (“ cooling effect ”).

4. Sources de raies : les lampes à décharges

1. Historique

L'histoire des lampes à décharge de gaz a commencé en 1675 grâce à l'astronome français [Picard](#) qui observa que l'espace vide [dans un baromètre](#) brillait dès qu'il secouait ce baromètre contenant du mercure. C'est Hauksbee qui, le premier, en 1705, décrivit une lampe à décharge. Il montra qu'un globe de verre, dans lequel régnait un vide partiel ou complet et chargé d'électricité statique, peut produire une lumière suffisante pour lire. Puis le phénomène de l'arc électrique a été décrit par [Petrov](#), en 1802 en Russie et en même temps par Sir [Davy](#) au Royal Institute de Grande-Bretagne. Dès lors, de nombreuses recherches ont été effectuées sur les sources de lumière à décharge, car elles produisent de la lumière à partir de l'électricité de manière beaucoup plus efficace que les ampoules à incandescence. Plus tard, l'arc de décharge a été optimisé à l'aide d'un gaz inerte en remplacement de l'air. C'est ainsi que ce sont développées des lampes employant des gaz nobles tels que le néon, l'argon, le krypton, le xénon, ou encore le dioxyde de carbone. Par la suite fut introduite la lampe à vapeur métallique, comprenant également divers métaux à l'intérieur du tube à décharge. La température du gaz permet de vaporiser une partie du métal qui produit ainsi une décharge. Les métaux usuels sont [le sodium](#) et le [mercure](#) à haute [pression de vapeur](#) ce qui augmente l'efficacité de l'émission électromagnétique dans le spectre visible. Cent ans plus tard, sont apparues les lampes sans électrodes alimentées par des sources de fréquence micro-ondes ou radio fréquence. Les lampes à décharge peuvent être sous haute pression (les [lampes aux halogénures métalliques](#), les [lampes à vapeur de sodium haute pression](#), les [lampes à vapeur de mercure](#)) et basse pression (les [tubes fluorescents](#), les [lampes à vapeur de sodium basse pression](#)).

2. Les lampes appliquées à l'ionisation des molécules

Comme précédemment décrite, la source Photospray™ peut supporter plusieurs types de lampes pour photoionisation. En effet, dernièrement de nouvelles sources VUV ont été développées. Des lampes à faible pression avec des gaz nobles et excitées par des microondes ou décharge à radio-fréquences permettant d'obtenir des sources continues [Northway, 2007]. Les nouveaux spectromètres de masse sont maintenant pourvus de lampe-sources avec des intensités de photon de l'ordre de 10^{13} - 10^{14} photons.sec⁻¹ [Hanold, 2004] [Kurabayashi, 2005]. D'autres études utilisent également des lampes à gaz rare pompées avec des électrons [Mühlberger, 2005].

3. Principe de fonctionnement

Les lampes à décharge de gaz sont une famille de sources de lumière artificielle qui génèrent de la lumière en envoyant une [décharge électrique](#) à travers un gaz [ionisé](#) appelé [plasma](#). Lorsqu'une différence de potentiel est créée entre les électrodes situées de chaque côté de la lampe, les molécules du gaz s'ionisent. Les ions positifs sont attirés par une des électrodes et les électrons par l'autre. La décharge de gaz dépend de la fréquence ou modulation du courant. La plupart des lampes utilisent un [gaz rare](#) ([argon](#), [néon](#), [krypton](#), [xénon](#) ou deutérium) ou un mélange de ces gaz. Elles peuvent être remplies avec d'autres matériaux, comme [le mercure](#), [le sodium](#), et/ou [un halogénure](#). Un fort flux d'électrons traverse l'ampoule quand le gaz est ionisé. C'est grâce au passage de ce flux que se produisent de nombreuses collisions entre les atomes de gaz et de métal présents dans la lampe et les électrons libres, accélérés par le [champ électrique](#) dans le tube. Certains électrons dans les [orbitales atomiques](#) des atomes sont [excités](#) par les collisions inélastiques à une énergie à l'état supérieur. Lorsque l'[excitation](#) atomique se relaxe, il y a émission d'un [photon](#) dont la longueur d'onde dépend de la nature du gaz et des conditions de décharge. La lumière résultante se situe dans [l'infrarouge](#), [la lumière visible](#) ou l'[ultraviolet](#). Les lampes à décharge

de gaz offrent une longue durée de vie mais sont plus compliquées à fabriquer et nécessitent l'apport de l'électronique afin de fournir un flux de courant correct dans le gaz.

4. Cas des lampes de photoionisation (PID)

Les lampes à décharge commercialisées pour les sources de photoionisation utilisent différents gaz de remplissage avec une très grande pureté pour une durée de vie supérieure à 3000 heures à température ambiante. Une maintenance régulière du système permet de prolonger cette durée. L'excitation des lampes à photoionisation se fait en courant continu ou alternatif et la gamme des énergies d'ionisation avec ce type de lampe varie entre 8,4 à 11,8 eV (**Tableau 2**). Une lampe à décharge n'est pas constituée de filament mais d'un capillaire. Ainsi, l'atome de gaz se relaxe en réémettant de la lumière qui produit dans 99,9 % des cas une seule raie.



Figure 4 : Lampe de photoionisation Cathodeon™ utilisée avec la source d'ions APPI

Différents matériaux de fenêtres peuvent être utilisés avec des longueurs d'onde différentes. Les lampes PID Cathodeon™ (**Figure 4**) sont commercialisées avec des fenêtres MgF₂, LiF, en saphir ou encore des fenêtres en silice synthétique (Spectrosil). Les lampes Cathodeon™ utilisent le fluorure de magnésium en épaisseur fine car ce matériau permet d'améliorer la transmission de la fenêtre et la durée de vie de la lampe du fait de la réduction de la densité de

lumière absorbée par les centres de couleur. La **Figure 5** montre le pouvoir de transmission supérieur du fluorure de magnésium sur les autres types de composés.

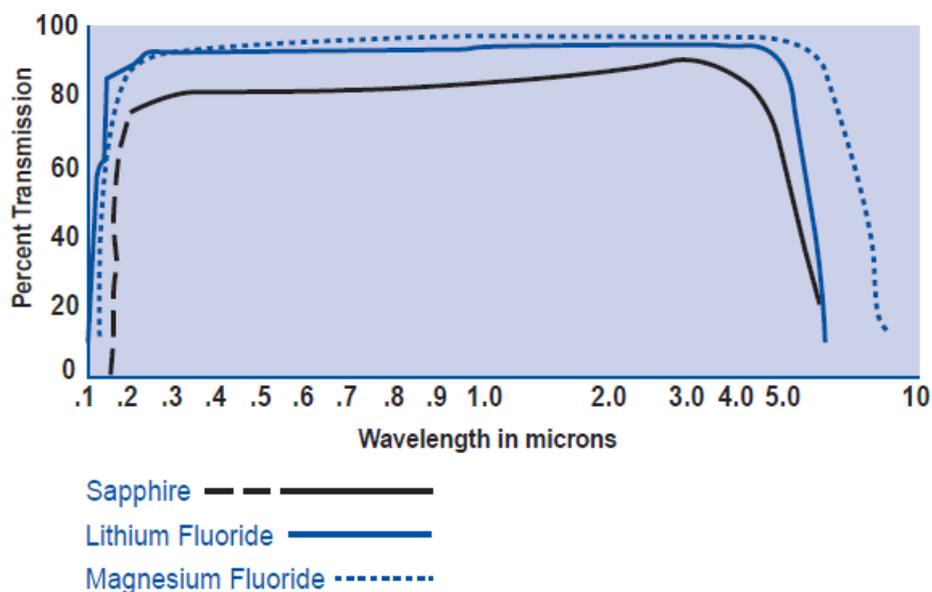


Figure 5 : Fenêtre de transmission à travers le saphir, LiF et MgF₂.

La lampe à krypton a deux raies à 123,6 et 116,5 nm, soit 10,0 et 10,6 eV respectivement. Différents types de lampes commercialisées par Cathodeon™ et leurs caractéristiques sont présentées sur le **Tableau 2**.

FILL GAS	PHOTON ENERGY (eV)	ORDERING CODE
Xenon	8.4	PXR 084
Xenon	9.6	PXR 096
Krypton	10.0	PKR 100
Deuterium	10.2	PDR 102
Krypton	10.6	PKR 106
Argon	11.8	PAR 118

Tableau 2 : Quelques données concernant les lampes de photoionisation Cathodeon™

(http://www.alphalight.co.kr/web_data/down/Specialist.pdf)

5. Les sources accordables : le rayonnement synchrotron

D'après les équations de Maxwell, toute particule chargée se déplaçant de façon non uniforme (par exemple sur une trajectoire circulaire) émet un rayonnement électromagnétique. Le rayonnement synchrotron est un rayonnement électromagnétique émis par une particule chargée qui se déplace dans un champ magnétique et dont la trajectoire est déviée par ce champ magnétique. Ce rayonnement est émis en particulier par des électrons accélérés à des vitesses proches de celle de la lumière (électrons relativistes) qui tournent dans un anneau de stockage (anneau circulaire, le synchrotron). Puisque ces particules modifient régulièrement leur trajectoire, leur vitesse change régulièrement, elles émettent alors de l'énergie (sous forme de photons) qui correspond à l'accélération subie.

1. Mode de fonctionnement de SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire de LURE)

Les électrons sont produits par un canon puis sont accélérés à 100 MeV dans un accélérateur linéaire, le LINAC, où ils restent groupés en paquet, passent dans un second accélérateur circulaire, le booster de 157 m, et portés à 2,75 GeV. Ayant atteint cette énergie, ils sont injectés dans un anneau de stockage de 354 m qui comporte un certain nombre de secteurs magnétiques (aimants de courbure ou dipôles), qui courbent la trajectoire des électrons, raccordés par des sections droites. Ce sont de ces aimants de courbure que les photons sont émis tangentiellement à la trajectoire du faisceau d'électrons. Le rayonnement polychromatique de photons émis possède un spectre large qui s'étend de l'infrarouge lointain aux rayons X durs donc de l'ordre de 10^{-2} eV à 50 keV (10^5 nm à $3 \cdot 10^{-2}$ nm).

Il existe aussi des dispositifs, appelés onduleurs, composés d'aimants permanents disposés sur les sections droites de l'anneau, qui permettent de produire des faisceaux de photons composés de raies.

2. La tête de ligne de DISCO (Dichroism, Imaging and mass Spectrometry for Chemical and biOlogical systems)

DISCO est une ligne de lumière qui a été installée au niveau d'un aimant de courbure (**Figure 6**). Elle nécessite une interface appelée tête de ligne (TDL) qui permet de gérer la distribution du faisceau dans des conditions optimales de radioprotection pour le personnel et de vide pour l'anneau de stockage. Elle possède des propriétés caractéristiques comme des ouvertures angulaires et des paramètres d'ultra-vide (HUV) spécifiques aux besoins que requiert la ligne DISCO. La tête de ligne de DISCO récupère 40 mrad dans le plan horizontal et 10 mrad dans le plan vertical de l'émission du rayonnement du dipôle qui dévie le faisceau de $11,25^\circ$ puisqu'il y a 32 dipôles au total ($360^\circ/32$). Le centre de la nappe étant trop énergétique il a été décidé de s'en affranchir au moyen d'un absorbeur, appelé doigt froid. L'ombre du doigt froid divise donc le faisceau de la ligne en deux nappes.

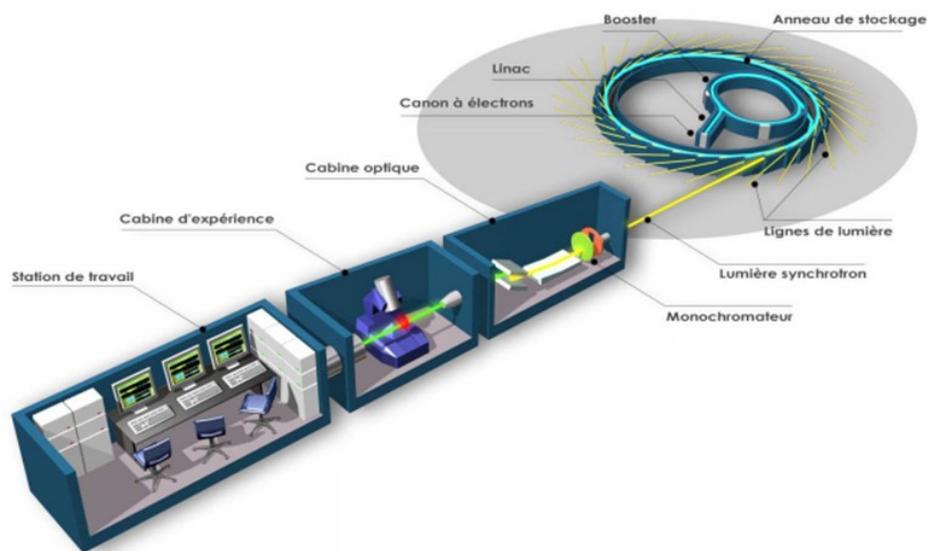


Figure 6 : Schéma d'une ligne de lumière

(http://www.epsim.fr/IMG/pdf_machine_Fiche_prof.pdf).

3. Ligne de lumière DISCO

Une ligne de lumière est un dispositif mécanique, optique et de vide permettant de focaliser et recueillir le faisceau lumineux produit dans l'anneau de stockage au niveau de la cabane optique expérimentale. DISCO est une des 27 lignes de lumière actuellement en activité sur

les 40 que peut recevoir SOLEIL. Son domaine spectral s'étend de 1 à 20 eV (60 à 1200 nm) avec la conservation de la polarisation naturelle de la lumière [Giuliani, 2009].

La plupart des lignes de faisceau de synchrotrons de 3^{ème} génération permettant le dichroïsme circulaire et la spectroscopie ont une gamme de travail de 3 à 7 eV [Sutherland, 1980], [Gekko, 2001], [Tao, 2001], [Clarke & Jones, 2004], [Matsuo, 2005], [Hoffmann, 2007]. DISCO est la seule ligne de SOLEIL pouvant couvrir le domaine du VUV jusqu'au visible. Le VUV qui est l'abréviation de Vacuum Ultra Violet est la portion du spectre électromagnétique où la lumière UV doit être transportée et manipulée sous vide [Giuliani, 2011]. Les photons ultraviolets y sont de haute énergie (180-30 nm, soit 5-40 eV) et sont absorbés par l'air et particulièrement les molécules d'O₂ vers 180 nm, ce qui a pour effet de couper la partie du spectre des VUV [Ladenburg & Vanhooris, 1933], [Watanabe, 1953].

1. Les éléments d'optique

L'ensemble des éléments optiques de DISCO (**Figure 7**) permet de distribuer le rayonnement synchrotron aux différentes expériences. Les éléments d'optique ont été séparés en deux groupes principaux : les éléments communs aux trois stations (APEX, SRCD, microscopy) et les éléments propres aux stations dont les éléments sont choisis en fonctions des besoins de chacune de ces stations.

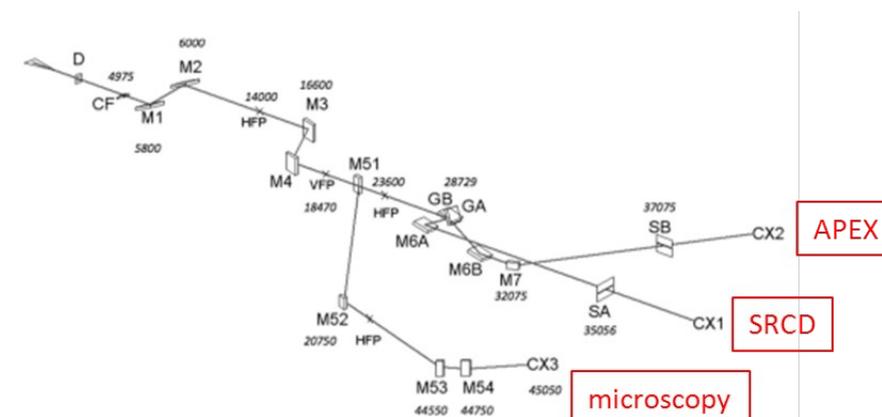


Figure 7 : Représentation schématique des éléments optiques de la ligne DISCO, D : diaphragme; CF : doigt froid; Mx : miroirs; Gx : réseaux; HFP : point focal horizontal; VFP : point focal vertical; CX1 : station expérimentale, SRCD; CX2 : station expérimentale APEX; CX3 : station expérimentale Microscopie. Les distances du point de source sont indiquées en mm pour certains éléments [Giuliani, 2009]

Les miroirs M1-M2 sont imposés par la divergence et M3-M4 sont des éléments imposés par la radioprotection. M1-M2 dévient le faisceau verticalement pour sortir du plan du Brehmsstrahlung. Le rayonnement appelé « *brehmstrahlung* » est le rayonnement émis lorsque des particules chargées sont accélérées à une vitesse relativiste. Le doigt froid permet d'exclure le centre de la nappe énergétique vers M1. M2 redirige le faisceau afin de passer à travers le mur de l'anneau de stockage. Le couple M3-M4 dévie le faisceau horizontalement hors de l'axe de l'émission [Bagag, 2008b]. L'ensemble M3-M4 est donc placé dans la « cabane de radioprotection » qui est blindée en plomb contre l'émission de rayons.

2. Le faisceau

En provenance de la tête de ligne, le rayonnement synchrotron est polychromatique. Sa principale utilisation est pourtant comme source monochromatique, grâce à l'installation entre le dispositif expérimental et la source de lumière synchrotron, d'un monochromateur. Il s'agit d'un cristal diffracteur qui rend possible la dispersion du rayonnement. Selon l'angle d'incidence du faisceau sur ce cristal, un faisceau d'une longueur d'onde désirée est obtenu. La longueur d'onde obtenue peut être variée ainsi très précisément et aussi fréquemment que l'expérience le nécessite. Le défilement des longueurs d'onde sur la fente de sortie est assuré par la rotation du réseau GB du monochromateur dont le déplacement est assuré par un moteur électrique.

3. *Station expérimentale APEX (expériences d'ionisation à pression atmosphérique pouvant être couplées avec la spectrométrie de masse : APPI)*

Cette branche délivre des photons VUV entre 350 et 60 nm (4 à 20 eV) à pression atmosphérique sous une atmosphère de gaz N₂ (argon ou néon) ce qui signifie que cette branche permet d'ioniser à pression atmosphérique les biomolécules. Il est ensuite possible de coupler cette ionisation avec un spectromètre de masse, dans notre cas il s'agit d'un QStar pulsar i de la société AB Sciex. La gamme de masse accessible va jusqu'à m/z 10 000 avec une résolution en masse de 9 000 dans les deux modes d'ionisation, négatif comme positif. La résolution en masse est le rapport $m/\Delta m$ où m est masse nominale du premier pic (ou moyenne des masses des deux pics) et Δm la différence minimale entre le pic considéré et son voisin le plus proche dont il peut être distingué.

1. *Le vide et le pompage différentiel*

Bien que n'ayant pas eu recours au pompage différentiel dans cette thèse, il est nécessaire que ce dispositif soit décrit afin de comprendre sa nécessité dans la branche APEX de DISCO.

Toutes les collisions avec des cibles (telles que des molécules de gaz) créent une déperdition d'énergie. Il est donc nécessaire d'éviter toute interaction et absorption par les molécules d'O₂ dans l'ensemble de la machine, c'est pourquoi il y règne un vide ultra-haut (UHV) de l'ordre de 10⁻¹⁰ mbar. Toute la ligne DISCO est donc aussi sous vide, et ce vide est assuré par des pompes ioniques et contrôlé par des jauges ioniques. Des vannes permettent d'isoler différents secteurs de la ligne, afin d'intervenir sur une zone tout en conservant le reste de la ligne sous vide. Cependant, l'étude d'échantillons biologiques et particulièrement sous forme liquide n'est pas compatible avec de si basses pressions. De plus, aucun matériau ne permet de réaliser des fenêtres transparentes aux VUV et donc empêche de travailler en-dessous de 110 nm (à la coupure ou « cut off » du LiF et MgF₂) [Giuliani, 2009] donc d'atteindre la valeur de 60 nm que la ligne DISCO délivre. Cela empêche d'utiliser les photons au-dessous de 110 nm pour des matériaux qui peuvent eux supporter un fort vide. Il doit être précisé que le libre

parcours moyen (la distance moyenne que parcourt une particule entre deux collisions) des ions est uniquement 65 nm à pression atmosphérique (10^3 mbar ou hPa), signifiant qu'une large quantité de collisions se déroule entre la région de la photoionisation et l'entrée du spectromètre qui est à une pression intermédiaire (10^{-3} mbar ou hPa).

En effet, pour concilier l'ultra-vide régnant dans l'anneau de stockage (10^{-10} mbar ou hPa), qui est la chambre à vide dans l'aimant de courbure, et la pression atmosphérique de la source APPI où se situe l'échantillon (10^3 mbar ou hPa), soit un écart de 13 ordres de grandeurs de pression, un système de pompage différentiel est mis au point.

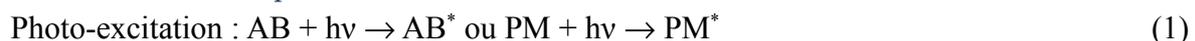
Le pompage différentiel permet de travailler sans fenêtre entre le monochromateur et la chambre expérimentale à pression atmosphérique. Il est à noter que le pompage différentiel agit comme un filtre à gaz faisant écran aux radiations à forte pression. Afin de décroître la pression du monochromateur à la source on utilise un gaz qu'il faut pomper régulièrement. L'air de l'atmosphère absorbant fortement les UV, il est donc déconseillé d'utiliser ce gaz. C'est en revanche un gaz rare, comme l'argon, transparents aux UV qui a été utilisé.

Le pompage différentiel consiste à guider les photons produits par l'aimant de courbure de lumière de la ligne [DISCO](#) jusqu'à la source APPI en traversant quatre chambres en série dans lesquelles règnent une pression de plus en plus élevée, jusqu'à la pression atmosphérique.

6. Propriétés et mécanismes de la photoionisation

1. Photoionisation en mode positif

1. Principe de base



où AB est la molécule d'analyte, PM est la phase mobile et les espèces AB^* et PM^* sont leurs espèces excitées respectives.

Suite au phénomène de photoexcitation, plusieurs processus peuvent être observés. Les processus décrits pour la molécule d'analyte notée AB, sont également valables avec la phase mobile PM.



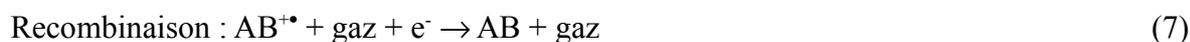
où « gaz » correspond aux molécules de gaz présentes dans la source, qui dans le cas d'une source d'ion APPI peut être l'air (l'ionisation a lieu à pression atmosphérique) ou l'azote N₂.

L'absorption d'un photon dont l'énergie est supérieure au seuil d'ionisation peut conduire à l'ionisation ou à la formation d'une espèce neutre excitée. La probabilité de former une espèce neutre décroît avec l'énergie des photons. Lorsque l'énergie des photons $h\nu$ est supérieure à l'énergie d'ionisation (EI) d'un des composés, l'espèce photoexcitée peut se relaxer comme décrit ci-dessus, mais aussi s'autoioniser. Les deux processus sont compétitifs.

Une ionisation selon l'équation suivante peut être observée :



L'ion formé, s'ensuit une recombinaison qui peut se présenter sous plusieurs formes :



Pour produire sélectivement des ions de l'analyte sans ioniser le solvant, et donc réduire considérablement le bruit de fond, il faut choisir une source UV dont l'énergie des photons

émis est supérieure au potentiel d'ionisation des analytes et inférieure à celui des constituants de l'air et des solvants utilisés.

$$\text{PI (analytes)} < \text{EI (hv)} < \text{PI (air, solvants)}$$

Sachant que les solvants les plus courants ont des PI supérieurs à 10 eV, et que beaucoup de molécules organiques ont des PI inférieurs à 10 eV (*Tableau 3*), la lampe la mieux adaptée comme le présentent les données de la *Figure 8*, est une lampe à décharge dans le Krypton qui fournit des photons majoritairement de 10,0 eV et de 10,6 eV minoritairement (*Figure 9*). Les autres lampes généralement utilisées sont des lampes à Argon (Ar) ou à Xénon (Xe) qui génèrent des photons de 11,2 pour l'Argon et de 8,4 eV et 9,6 eV pour le Xénon et ne sont par conséquent pas adéquates pour les expériences menées dans cette thèse.

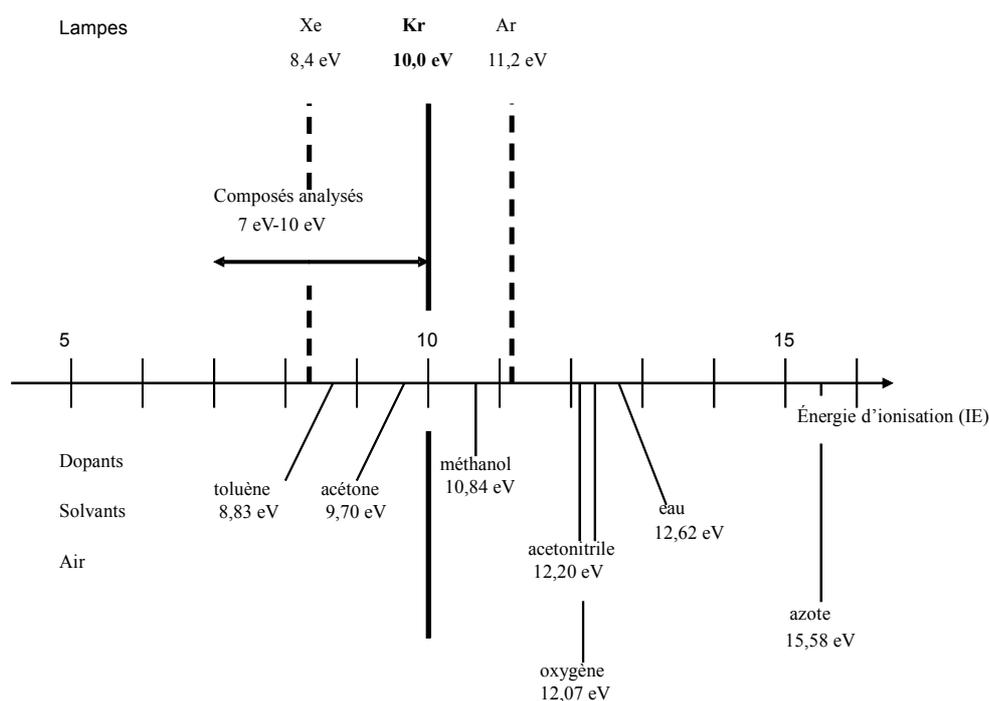


Figure 8 : Schéma présentant les énergies d'ionisation des molécules présentes dans la source d'ion APPI (solvants, dopants, composants de l'air).

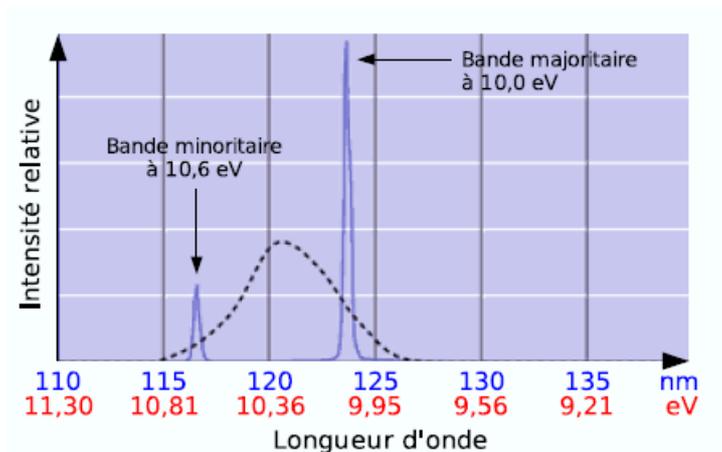


Figure 9 : Spectre d'émission de la lampe au Krypton de la source Photospray™, d'après les documents Cathodeon (<http://www.cathodeon.com>).

Lampes	Composés	EI (eV)	AP (kJ/mol)
	diazote	15,58	493,8
	eau	12,62	691,0
	acetonitrile	12,20	779,2
	dioxygène	12,07	421,0
	chloroforme	11,37	
	dichlorométhane	11,32	628,0 ± 8.0
Ar : 11,2 eV			
	méthanol	10,84	754,3
	isopropanol	10,17	793,0
	hexane	10,13	
Kr : 10,0 eV			
	heptane	9,93	
	hexafluorobenzène	9,90	648,0
	isooctane	9,80	
	acétone	9,70	812,0
	pyridine	9,26	930,0
	benzène	9,24	750,4
	furane	8,88	803,4
	toluène	8,83	784,0
Xe : 8,4 eV			
Et 9,6 eV			
	anisole	8,20	839,6
	naphthalène	8,14	802,9
	triéthylamine	7,53	981,8

Tableau 3 : Energies d'ionisation de divers composés organiques, présentés par rapport à l'énergie des photons fournis par les lampes à Ar, Kr et Xe (valeurs obtenues sur le NIST Webbook, [http : //webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov)).

2. Photoionisation directe

Le principe de base de l'APPI est la formation d'un cation radicalaire obtenu grâce à l'absorption d'un photon par une molécule d'analyte, suivi par l'éjection d'un électron.



Cette ionisation (réaction 10) est possible si l'énergie des photons (hv) est supérieure au potentiel d'ionisation de la molécule (PI). La photoionisation directe d'une molécule d'analyte est statistiquement peu probable car le solvant peut absorber une partie des photons produits par la lampe [Bagag, 2008b]. La quantité d'analyte n'est pas suffisante par rapport à la quantité de solvant pour être photoionisée.

3. Photoionisation « assistée »

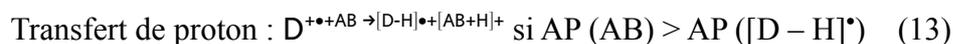
Afin d'augmenter le rendement d'ionisation de l'analyte, dans la source Photospray™, il est possible d'augmenter le nombre de molécules potentiellement ionisables dans l'éluant LC, sous forme liquide ou vapeur. Une quantité assez importante par rapport à l'analyte, et déterminée expérimentalement, peut être ajoutée à l'aide d'un composé que l'on appelle « dopant ». L'ajout du dopant a donc pour effet d'augmenter la quantité d'ions via sa photoionisation (réaction 11),



Si on choisit le dopant de telle façon que ses photoions aient une grande énergie de recombinaison, ou une faible affinité protonique, alors les photoions vont réagir par transfert de charge avec les autres molécules présentes dans la zone d'ionisation. Comme cette zone est à pression atmosphérique, le nombre élevé de collision va permettre un transfert de la charge du photoion vers l'analyte (si toutefois la réaction est thermodynamiquement favorisée) (réaction 12).



L'ionisation peut se faire également par transfert de proton.



De plus, si l'affinité protonique (AP) de l'analyte est supérieure à celle de l'ion dopant déprotoné, le solvant ou le cluster de solvant peut agir comme intermédiaire entre l'ion dopant (réaction 14) et l'analyte par transfert de proton de l'ion dopant à l'analyte (réaction 15).



1. Choix du dopant

Lors de l'utilisation d'une source de photoionisation ou mode « lamp on », un dopant peut être associé. Le dopant est une substance dont l'énergie d'ionisation (IE) est inférieure à l'énergie des photons et qui peut donc être utilisée pour améliorer l'efficacité de l'ionisation, vu que les photons perdent facilement leur énergie en collisions avec des surfaces ou particules en phase gazeuse. L'idée d'utiliser un dopant afin d'augmenter l'efficacité de la formation d'ions par ionisation par pression atmosphérique (API) a déjà été développée lors

d'expériences en PI-IMS pour augmenter sa sensibilité à l'aide du dopant toluène et acétone. De même, des réactions d'échange de charges impliquant le benzène ont permis d'augmenter la sensibilité de l'ionisation à décharge corona sur des échantillons de faible affinité protonique [Ketkar, 1991]. Cependant l'évolution apportée par Bruins *et al.* a été d'amplifier la production de photoions à partir de l'éluant provenant d'une chromatographie liquide.

Le toluène (EI = 8,83 eV) utilisé pour l'ionisation de composés possédant de faibles affinités protoniques mène à des réactions faisant intervenir des transferts de charge. En revanche, il réagit par transfert de proton avec les molécules de solvant de fortes AP comme l'acétonitrile ou le méthanol utilisées en chromatographie à polarité de phase inverse en LCMS [Kauppila, 2002]. L'acétone (EI = 9,7 eV), de même, et ses clusters [Puton, 2008], agissent comme un dopant uniquement pour les molécules ayant des AP élevées : $AP_{\text{solvant}} > AP_{\text{radical dopant déprotoné}}$.

L'hexafluorobenzène selon les molécules étudiées apporte des résultats similaires à celui du toluène [Giuliani, 2006], il est apparu intéressant d'étudier l'efficacité de ce dopant sur les molécules étudiées lors de cette thèse afin de voir si ce composé réagit pour toutes les molécules de la même manière que le toluène et éventuellement déterminer ses limitations ou avantages.

L'anisole (EI = 8,20 eV) a été introduit par Bruins *et al.* comme le solvant de choix pour la photoionisation de composés de faibles EI et AP car ils peuvent être ionisés efficacement avec l'utilisation d'une lampe au krypton par transfert de charge avec le cation radical de l'anisole [Kauppila, 2004a]. En effet, la formation de l'ion moléculaire D^{+} est possible même en présence de solvants utilisés en chromatographie de phase inverse, ce qui n'est pas le cas avec le toluène.

Dopants	Formule chimique	Structure
Anisole	C_7H_8O	
Toluène	C_7H_8	
Acétone	C_3H_6O	
Hexafluorobenzène	C_6F_6	

Tableau 4 : Récapitulatif des dopants usuels et utilisés lors de cette thèse avec leur formule chimique et structure.

Avec une lampe au xénon, l'anisole peut aussi être utilisé. Traldi *et al.* ont observé que l'irradiation d'acétonitrile par les photons menait à des isomères d'IE < 10 eV et ainsi permettaient d'ioniser l'analyte [Marotta, 2003]. Lorsque le solvant a une énergie d'ionisation inférieure à l'énergie des photons alors il joue le rôle de dopant. Les exemples de solvant les plus communs d'autoprotonation par leur photoions sont l'éthanol (EI = 10,48 eV), l'isooctane (EI = 9,80 eV), l'heptane (EI = 9,93 eV) et l'isopropanol (IE = 10,17 eV) [Bagag, 2011].

4. Transfert de proton

L'ion prédominant observé en APPI est l'espèce protonée $[M+H]^+$, indiquant l'implication d'une réaction chimique après le phénomène de photoionisation (réaction 14). Le mécanisme possible pour la formation de l'espèce protonée $[M+H]^+$ est le suivant :



En 2004, Syage a montré que le mécanisme prédominant de la formation de l'espèce $[M+H]^+$ par photoionisation s'effectue par l'arrachement d'un hydrogène à partir d'un solvant protique. Notons que les résultats ont été obtenus avec une source de photoionisation à pression réduite travaillant à 1-4 Torr [Syage, 2004a].

Un modèle thermodynamique simple a été proposé par Syage afin d'obtenir l'enthalpie réaction de ce transfert d'hydrogène ΔH (équation 15):

$$\Delta H = EI(H) - EI(M) - AP(M) + D_H(S) \quad (16)$$



où $EI(H)$ et $EI(M)$ sont les énergies d'ionisation respectives de l'atome d'hydrogène et de l'analyte, $AP(M)$ est l'affinité protonique de l'analyte et $D_H(S)$ est l'énergie de dissociation de la liaison de l'atome d'hydrogène dans la molécule de solvant.

Cette réaction de transfert d'hydrogène, bien que thermodynamiquement défavorisée, est possible grâce au déplacement cinétique par excès de solvant présent dans la source d'ion. Ce modèle est rudimentaire car il n'explique ni l'importance de l'affinité protonique comparée à l'enthalpie de réaction sur le rendement de formation de l'espèce protonée $[M+H]^+$ ni

l'efficacité de formation de cette espèce en présence d'eau. En effet, l'eau possède une énergie de dissociation D_H très élevée [$D_H(H_2O) = 5,16 \text{ eV}$].

Le transfert de proton entre l'ion moléculaire du dopant et le solvant (équation 14) n'est possible que si la différence des AP est favorable. La formation de clusters de solvant, ayant des affinités protoniques différentes de celle de la molécule de solvant seule [Meot-Ner, 1986 et Grimsrud, 1973] il est alors possible au cluster après excitation par la radiation des photons et si son $IE < 10 \text{ eV}$ de participer à un transfert de proton (équation 15). Bruins *et al.* ont étudié les réactions entre les photoions du toluène ($C_7H_8^{+\bullet}$) et le méthanol ou l'acétonitrile [Koster, 2001]. Ils ont montré qu'il peut y avoir interaction entre le méthanol et l'ion moléculaire du toluène pour former un cluster contenant trois molécules de méthanol. Ce cluster peut perdre un atome d'hydrogène ou un radical benzyle $C_7H_7^\bullet$ ce qui conduit à un cluster de méthanol protoné pouvant ainsi protoner l'analyte. Dans le cas de l'acétonitrile, le mécanisme est globalement le même mais le cluster ne contient que deux molécules d'acétonitrile.

La formation et ionisation de monomère, dimère ou trimère de méthanol dépend de la température du nébuliseur. Quand la température passe de 200 à 500 °C, l'abondance relative du monomère augmente alors que celle des dimères et trimères diminue [Kauppila, 2002].

Les solvants méthanol et acétonitrile s'ionisent et génèrent auprès de l'analyte un transfert de proton [Kauppila, 2002].

Quand l'acétone est utilisé comme dopant, en revanche, il s'autoprotone selon l'équation suivante :



5. *Transfert de charge*

L'ionisation par échange de charge est une autre caractéristique de l'APPI. Le transfert de charge est basé sur le transfert d'un électron à partir du cation radical du dopant (équation 12) et requiert que l'EI de l'analyte soit inférieur à celle du dopant. Il est nécessaire que les photoions du dopant aient une grande énergie de recombinaison, ou faible affinité protonique pour réagir par transfert de charge avec les autres molécules présentes dans la zone d'ionisation. Le transfert de charge du photoion vers l'analyte est d'autant plus favorisé que le milieu n'est pas sous vide (à P_{atm}) et donc le nombre de collisions y est élevé. Le toluène utilisé lors d'expériences en phase inverse n'est pas un dopant favorable car ses photoions sont rapidement utilisés dans la réaction avec le solvant sauf dans le cas de solvants à faible AP où le toluène [Robb, 2008] et le benzène [Bos, 2006] sont au contraire fortement efficaces. L'anisole a, au contraire, des photoions stables dans le méthanol et chloroforme en raison de sa faible EI de 8,20 eV.

2. Photoionisation en mode négatif

L'ionisation en mode négatif (tableau 5) commence avec la libération d'électrons de faible énergie pendant la photoionisation du dopant (réaction 1). Ces électrons peuvent être capturés par des espèces possédant des affinités électroniques (AE) positives, telles que l'analyte (réaction 7), les solvants (réaction 2) ou le gaz. Comme le dioxygène est omniprésent dans les sources APPI et a une forte affinité électronique, il capture des photoélectrons et libère des ions superoxide $O_2^{\bullet-}$ (équation 3).



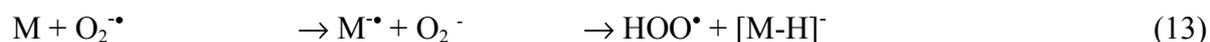
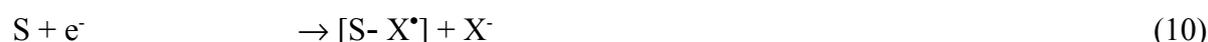
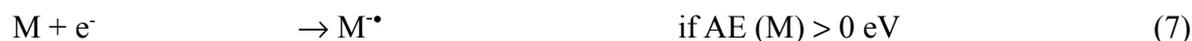


Tableau 5 : Réactions observées en photoionisation à pression atmosphérique en mode d'ionisation négatif d'après [Kauppila, 2004b].

Le procédé classique d'ionisation en mode négatif sur des composés de forte acidité en phase gazeuse est le transfert de proton (réactions 4, 5 et 6). Les ions superoxide $O_2^{\bullet-}$ servent à déprotoner l'analyte pour obtenir un composé relativement acide : HO_2^{\bullet} ($GB(HO_2^{\bullet}) = 1451$ kJ/mol (réactions 4 et 5). Cependant Song *et al.* ont amélioré l'efficacité de la déprotonation grâce à l'anion $C_6H_5CH_2^-$ qui résulte de l'addition d'un peroxyde de di-*tert*-butyl avec le dopant toluène [Song, 2007]. Par contre, l'efficacité de la déprotonation d'un analyte sera réduite si des solvants plus acides sont utilisés tels que l'acide formique, acide acétique et trifluoroacétique.

Un autre procédé est la capture d'électrons qui peut se révéler être une ionisation efficace en APPI pour les composés ayant une forte AE positive. Les espèces $M^{\bullet-}$ se forment via capture de photo-électron (réaction 7) ou transfert de charge (réaction 8).

Un autre processus moins fréquent, vu que la source tend à ce que le dioxygène piège les électrons, est la capture d'électron dissociative. Ce processus peut se dérouler après une capture ou transfert d'un électron par le composé (réaction 9) ou par le solvant (réaction 10) et ces composés ainsi peuvent être utilisés comme réactifs pour l'attachement d'anions [Song, 2007].

De plus, la dissociation par capture d'électron et le transfert de proton peuvent être combinés pour générer les ions $[M-H]^-$ [Song, 2007b]. Par ailleurs, ils ont également démontré qu'il peut se dérouler alternativement transfert de proton et transfert d'hydrogène à la place d'un simple transfert de proton (équation 13), impliquant à la fois une acidité en phase gazeuse et une AE positive du composé [Song, 2007].

De nombreux composés comportant en particulier des halogènes mènent à des produits de substitution en compétition avec les transferts d'électron de dioxygène (réaction 11). Ce mécanisme n'a pas été confirmé par voie directe ou passant par une étape intermédiaire (équation 9) puis suivie par la réaction entre un $[M-X]^-$ et un dioxygène neutre (réaction 12).

1. Effet de la nature du solvant et dopant

Le dopant a un effet sur l'efficacité d'ionisation de l'analyte puisque c'est lui qui permet la libération d'électrons ou d'atomes d'hydrogène H^{\bullet} [Hanold, 2004]. En mode négatif, les composés avec une forte AE sont ionisés par capture d'électrons ou par transfert de charge au contraire des composés ayant une forte acidité en phase gazeuse qui sont ionisés par transfert de proton. Pour le toluène majoritairement utilisé dans les expérience en mode négatif toutes

les réactions menant à l'ionisation des analytes sont initiées par des électrons thermiquement formés par photoionisation.

Le solvant peut avoir une influence sur l'ionisation de l'analyte et affecter son efficacité [Hanold, 2004] et ainsi affecter ses limites de détection [Raffaelli, 2003].

En présence de solvants halogénés, l'ionisation de l'analyte ne se déroule pas car ces solvants sont capables de neutraliser la formation d'ions superoxyde par transfert d'électron, le chloroforme ayant une affinité électronique supérieure à celle du dioxygène [Song, 2007]. Ainsi l'ion superoxyde ne pourra pas réagir par transfert de charge avec les analytes possédant des AE élevées (réaction 8).

Dans le cas de l'acide formique, acétique, trifluoroacétique et des sels d'ammonium, c'est principalement un transfert de proton sur $O_2^{\bullet-}$ qui empêche la déprotonation des analytes de faible acidité en phase gazeuse. En effet l'AP (affinité protonique) d' $O_2^{\bullet-}$ est plus élevée que celle de $[CF_3COO]^-$, $[HCOO]^-$ et $[CF_3COO]^-$ qui sont des espèces très stables [Kauppila, 2002, 2004 et 2006]. De plus la formation de $M^{\bullet-}$ est également affectée puisque l'ion superoxyde ne peut être formé. Ce sont les transferts de charge et proton qui sont donc inhibés impliquant une perte de sensibilité.

Cependant, l'étude de peptides en solution en présence d'acide trifluoroacétique [Bagag, 2011] a permis d'obtenir des ions $[M-H]^-$ abondants, conduisant de plus à la formation particulièrement de nombreux ions de type *c* par fragmentation de type ECD (Dissociation par Capture d'Electron).

3. Applications de l'APPI

Vu que l'APPI est une technique permettant d'étudier des composés de polaires à non-polaires, cette technique est de plus en plus développée pour de nombreux composés tels que les drogues, les lipides, les composés naturels, les pesticides, les composés organiques synthétiques et les dérivés pétrochimiques. Décrire chacune des expériences menées par chacun des laboratoires serait fastidieux, par conséquent un tableau récapitulatif a été inséré avec les publications associées. Ce tableau présente les molécules étudiées et leur polarité, la source utilisée et le type de dopant utilisé lors de ces expériences (*Tableau 6*).

Pharmaceutiques	Source	Dopant	Polarité
drogues confisquées [Kauppila, 2011]	PS (DAPPI)	Toluène	P/N
alcools polyisoprénoïques [Kania, 2011]	x	Aucun	P/N
substances dopantes [Schappler, 2008] [Poza, 2012]	x	x	x
cyclodextrine et pharmaceutiques [Short, 2008]	PM	Toluène	P/N
drogues illicites [Kauppila, 2008]	PS (DAPPI)	x	P/N
oméprazole [Martens-Lobenhoffer, 2007]	PM	Aucun	P
composés pharmaceutiques basiques [Schappler, 2007]	x	x	x
composés pharmaceutiques [Himmelsbach, 2007]	PM	Toluène/acétone	P
composés pharmaceutiques [Cai, 2007a]	PM	Aucun	P/N
médicaments [Hommerson, 2007a]	x	x	P/N
cladribine, clofarabine, ketoconazole [Hsieh, 2007]	PS	Aucun/Acétone/Toluène	P
venlafaxine [Theron, 2007]	PS	Toluène	P
isosorbide-5-mononitrate [Silva, 2006]	PS	Acétone	N
mélatonine, sérotonine et auxine [Cao, 2006]	PM	Aucun	P
neurotransmetteurs [Kauppila, 2006]	PS	Toluène	P
salsolinol et catécholamines [Starkey, 2006]	PM	Acétone	P
ivermectin, doramectin du lait de vache [Turnipseed, 2005]	PM (APCI/APPI)	Acétone	P/N
médicaments [Cai, 2005]	PS	Toluène	P/N
betaméthasone [Pereira, 2005]	PS	Toluène	N
composés pharmaceutiques [Chen, 2005]	x	Toluène	P/N
cyclosporine A dans le plasma de rat [Wang, 2005]	PS	Toluène	P
lévonorgestrel dans le plasma humain [Theron, 2004]	PS	Toluène	N
ménaquinones et ubiquinones [Geyer, 2004]	PS	Toluène/Acétone	P
molécules à visée pharmaceutiques [Hsieh, 2003]	PS	Toluène	P/N
métabolites dans l'urine de rat [Keski-Hynnily, 2002]	x	x	P/N
naphtalènes [Kauppila, 2002]	PS	Toluène	N
Environnement & Polluants			
Pesticides dans les tomates [Kruve, 2011]	PS (μ APPI)	Toluène/Anisole/Acétone	P/N
HAP [Hollosi, 2011]	PM	Toluène/isopropanol/anisole	P/N
Huiles de schiste [Bae, 2010]	x	x	P/N

HBCD [Ross, 2010]	PS	Toluène	N
retardateurs de flamme bromés [Bacaloni, 2009]	PM	Toluène	N
tétrabromobisphénol A [Riu, 2008]	PM (APCI/APPI)	Toluène	N
PCB [Luosujärvi, 2008]	PS (DAPPI)	Toluène/Anisole/Acétone	P/N
DDT [Moriwaki, 2007]	PS	Toluène	P/N
composés perfluorés [Song, 2007a]	PS	Toluène	P/N
huile pétrolière [Purcell, 2007b]	PM	Toluène	N
pétrole [Purcell, 2007a]	PM	Aucun	P/N
HAP cancérigènes [Ding, 2007]	PS	Toluène	P
composés nitroaromatiques [Purcell, 2007b]	PM	Toluène	P
explosifs [Crescenzi, 2007]	PM	Aucun	P/N
benzidine et chloroaniline [Bacaloni, 2007]	PS	Toluène	P/N
composés nitroaromatiques [Song, 2007]	PS	Toluène	N
HAP [Short, 2007]	PM	Aucun	P/N
HAP oxydés [Grosse, 2007]	PM	Acétone	P/N
HAP [Itoh, 2006]	Shimadzu	Toluène/Anisole	P/N
métolachlore [Kabler, 2006]	PS	Toluène	P
benzopyrène [Zheng, 2006]	PM	Aucun	P
mélange pétrochimiques [Purcell, 2006]	PM	Toluène	P/N
hexabromocyclodécane [Davis, 2006]	PM	Aucun	N
retardateurs de flamme bromés [Riu, 2006]	PM	Toluène	P/N
Alkanox P24 [Papanastasiou, 2006]	PS	Toluène	P/N
HAP [Borsdorf, 2006]	x	Aucun	P/N
stilbènes dans les feuilles de vigne [Jean-Denis, 2006]	PM	Acétone	N
retardateurs de flamme bromés [Debrauwer, 2005]	PM	Toluène	N
dinitropyrène et aminonitropyrène [Straube, 2004]	PS	Toluène	N
mutagènes dans eau de rivière [Moriwaki, 2004a]	PS	Toluène	N
HAP dans les sédiments [Moriwaki, 2004b]	PS	Toluène	N
sulfonates dans l'eau de rivière [Takino, 2003a]	PM	Toluène/Acétone	P
urée et pesticides [Meng, 2002]	PM	Toluène	P/N
flavonoïdes [Rauha, 2001]	PS	Toluène	N
Composés dans les matrices alimentaires			
budénoside [do Carmo Borges, 2011]	PS	Toluène	P
caroténoïdes [Rivera, 2011]	x	x	P
sulfonamide dans le miel [Mohamed, 2007]	PS	Toluène	P
acrylamide dans le café et le chocolat [Pardo, 2007a]	x	x	P
acide domoïque dans les fruits de mer [Pardo, 2007b]	PM (APCI/APPI)	Aucun	P
mycotoxines dans les matrices alimentaires [Zöllner, 2006]	x	x	N
huile d'olive et vin rouge [Gomez-Ariza, 2006a et 2006c]	PS	Toluène	P
anthocyanines dans le vin [Gomez-Ariza, 2006b]	PS	Toluène	P
l'ergostérol dans le blé infecté [Varga, 2006]	PM	Toluène	P
aflatoxines dans le lait de vache [Cavaliere, 2006]	PS	Aucun	P
avermectine et moxidectine dans le lait [Turnipseed, 2005]	PM	Acétone	P
carbamates dans les fruits et légumes [Takino, 2004a]	PM	Toluène/Acétone	P/N
aflatoxines dans l'alimentation [Takino, 2004b]	PM	Toluène/Acétone	N
fongicides dans les agrumes [Yoshioka, 2004]	x	x	P

"cocktail dosed caco-2 samples" [Hakala, 2003]	x	x	P/N
patuline dans le jus de pomme [Takino, 2003a]	PM	Toluène/Acétone	P
chloramphénicol dans le poisson [Takino, 2003b]	PM	Toluène/Acétone	P
Stéroïdes			
phytoestrogène flavones lignans [Parker, 2012]	x	x	x
stéroïdes anaboliques [Hintikka, 2010]	PS (μAPPI)	Toluène	N
androgène du cancer de la prostate [Lih, 2010]	x	x	x
stéroïdes anaboliques de l'urine [Ahonen, 2010]	PS (μAPPI)	Toluène	N
stéroïdes [Lien, 2009]	PM	Aucun	N
stéroïdes [Hommerson, 2007b]	x	x	P/N
testostérone [Streit, 2007]	x	x	N
hormones [Yamamoto, 2006]	PS	Toluène	P/N
phytostérol [Lembcke, 2005]	PS	Toluène	P
lanostérol [Trosken, 2004]	PS	Toluène	N
cortisone [Kushnir, 2004]	PS	Toluène	P/N
stéroïdes [Guo, 2004]	x	x	N
corticostéroïdes [Greig, 2003]	x	x	N
stéroïdes [Zavitsanos, 2003]	x	x	N
idoxifène [Yang, 2002]	PS	Toluène	N
Biomolécules			
Peptides substance P [Robb, 2012]	PS	Aucun	P
peptides [Robb, 2009 et 2010] [Bagag, 2011]	PS	Aucun	P
Acides aminés [Bagag, 2007]	PS	isopropanol	P
sphingolipides [Muñoz-Garcia, 2008]	PS	Toluène	P/N
8-hydroxydeoxyguanosine [Zhang, 2007]	PS	Toluène	P
lipides triacylglycérol [Cai, 2007b]	PM	Aucun	N
peptides [Delobel, 2003 et Debois, 2006]	PS	Acétone/Toluène/Anisole	P/N
sphingolipides [Munoz-Garcia, 2006]	PS	Toluène	P/N
acide linoléique [Muller, 2006]	PS	Acétone	P
glycosphingolipides [Roy, 2006]	PS	Acetone	P/N
acides gras [Cai, 2006a]	PM	Aucun	P/N
lipides [Cai, 2006b]	PM	Aucun	P/N
globotriaosylcéramides [Delobel, 2006]	PS	Acétone/None	P/N
phosphatidylcholines [Delobel, 2005]	PS	Aucun	N
Autres applications			
Teintures indigo [Papanastasiou, 2012]	x	Toluène	N
Anthracène [Haapala, 2010]	PS (μAPPI)	Aucun	N
Ambre [Tonidandel, 2008]	PM (APCI/APPI)	Aucun	P
Sels ammonium bisquaternaires [Giuliani, 2006]	PS	Toluène	P
aldéhydes et cétones [van Leeuwen, 2004]	x	x	x
composés organométalliques [Dorcier, 2003]	x	x	x
Polymères			
PIB [Kéki, 2008]	PM	Toluène	P
polymères [Banoub, 2007]	PS	Toluène	P/N
PEG [Song, 2007]	PM	Toluène	N

Tableau 6 : Champ d'application de l'APPI avec les sources utilisées, le dopant utilisé et la polarité des molécules étudiées (PS : source Photospray et PM : source Photomate).

7. Développements de la source et différents couplages

En se basant sur les avantages qu'apporte l'APPI pour l'étude des composés à la fois polaires et apolaires, de nombreux chercheurs ont voulu étendre le domaine d'application de cette technique. Les instruments ont été ainsi développés, modifiés et les sources APPI couplées à différents systèmes de séparation et de spectrométrie de masse.

1. Couplage de l'APPI aux spectromètres de type FT-ICR

N'existant pas, en 2003 Greig *et al.* ont construit leur propre interface de photoionisation en montant une lampe UV (Cathodeon PKS100) sur une source d'ions APCI à la place de l'aiguille corona couplée avec un spectromètre de masse de type FTICR (Résonance Cyclotronique Ionique à Transformée de Fourier), [Greig, 2003].

Le groupe de Marshall a mis en évidence la formation simultanée d'espèces protonées, déprotonées et radicalaires dans la source d'ion APPI. Le très haut pouvoir résolutif et la précision en masse de la FTICR permettent des attributions précises des compositions élémentaires des composés étudiés [Purcell, 2006 et Purcell, 2007a]. Ce groupe a montré que seule une étude en APPI/FT-ICR est adaptée pour l'analyse de mélange complexe pétrochimique, contenant naturellement une large proportion de composés aromatiques hydrocarbonés faiblement polaires ou apolaires et que les fragmentations peuvent être contrôlées voire supprimées en ajustant convenablement les paramètres instrumentaux de la

source d'ion APPI. Cette technique est tout particulièrement utilisée pour les huiles de schiste [Bae, 2010].

2. Attachement d'anions par photoionisation à pression atmosphérique (AA-APPI)

Cette technique a été suggérée comme moyen d'étendre la gamme de composés qui peuvent être analysés par MS, et a eu en effet l'effet escompté puisqu'elle a permis d'améliorer l'ionisation de macromolécules (peptides, polymères) à faible polarité et qui peuvent être thermo-labiles et donc difficiles à ioniser par d'autres techniques comme la capture d'électrons, ou l'ionisation par transfert de proton. L'attachement d'anion peut donner des liaisons hydrogène et des attractions dipôle-dipôle [Song, 2007]. Initialement, ce sont les ions halogénures qui ont été utilisés comme réactifs. Tannenbaum *et al.* [Tannenbaum, 1975] ont travaillé sur des composés carboxyliques, des amides, des acides aminés, des amines aromatiques et des phénols en y attachant des chlorures. En mode négatif, les solvants halogénés sont évidemment inappropriés car leur EA est positive et peut capter des électrons thermiques et donc prévenir l'ionisation des analytes. Cependant de nombreux composés ont quand même pu être identifiés, grâce à cette technique qu'est l'AA-APPI, en ajoutant par exemple du chlore sur du PEG [Song, 2007] ou du brome sur des énantiomères d'échantillons environnementaux à quantifier [Ross, 2010].

3. Les sources « duales »

Le but de coupler différentes sources est de combiner les capacités que peuvent apporter chacun des systèmes et ainsi d'étendre la gamme des composés pouvant être simultanément ionisés à la fois en mode positif comme en négatif.

Le groupe de McIndou a développé une source d'ionisation appelée «l'electrospray photoassisté» (PAESI) [Dorcier, 2003] qui est la combinaison d'une lampe PI et d'une source ESI. Par conséquent, dans ce montage, les molécules d'analyte sont encore en solution durant le phénomène de photoionisation. Les composés pouvant être analysés par *electrospray* peuvent donc aussi être analysés par PAESI-MS. L'effet positif de la photoionisation sur l'ionisation est principalement observé pour des composés organométalliques (ou de coordination) chargés positivement ou négativement, qui donnent lieu à des courants ioniques élevés, améliorant ainsi les rapports S/N.

Syage *et al.* ont couplé une source APPI à une source APCI et une source ESI [Syage, 2004b]. Trois modes d'opérations sont proposés : l'utilisation d'une seule source, l'utilisation simultanée de deux sources d'ionisation (ESI/APPI et APCI/APPI) et enfin, un passage rapide entre les deux sources pendant la même acquisition chromatographique. Cependant les résultats ne se sont pas avérés très probants car le couplage ne fournit pas totalement la somme des signaux de deux sources individuelles et au contraire peut apporter des interférences et résultats inattendus [Syage, 2004b].

En revanche, ils ont démontré la faisabilité des sources ESPI (abréviation de ESI/APPI) sur les sources ESI et APCI, se révélant ainsi être un outil supplémentaire pour l'étude de système à polarité mixte à travers des mesures simultanées de composés au sein d'une solution à polarité variée contenant des composés pharmaceutiques (non polaires), un substrat (polaire) et un substrat lié (polaire) en ESPI-LC/MS [Short, 2008].

4. La micro – APPI (μ APPI)

Le but de la miniaturisation, qui est le sujet actuel récurrent de nombreuses investigations, est de réaliser des analyses rapides avec une consommation très faible en solvant et à analyser de très petite quantité d'échantillon sans perte de sensibilité [Huikko, 2003]. On ne peut plus automatiser les analyses, avec toutes les étapes de préparation de l'échantillon, séparation et

détection intégrées sur la même puce utilisable pendant plusieurs semaines, dans le but d'alléger le temps d'expérience.

Parmi les nombreux développements de la source APPI dans le groupe de Kostianen, Kauppila *et al.* ont fabriqué une puce [Kauppila, 2004c]. Cette puce est constituée d'un nébuliseur miniaturisé, contenant les entrées de fluides de l'échantillon liquide et du gaz nébuliseur, une chambre de mélange, un microchauffage intégré et une buse de sortie sur un disque de silicium qui est lié à l'anode par un disque de verre [Kauppila, 2004c]. Ce système est positionné à proximité d'une lampe à décharge dans le Krypton qui est le plus près possible de l'entrée du spectromètre de masse (**Figure 10**). Le repousseur dit "repeller" permet de diriger efficacement les ions formés vers le spectromètre de masse. Les mécanismes d'ionisation sont les mêmes que ceux observés avec une source d'ions APPI classique avec des débits 20 à 2 000 fois plus faibles (allant de 0,05 à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ au lieu de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$) [Kauppila, 2004c].

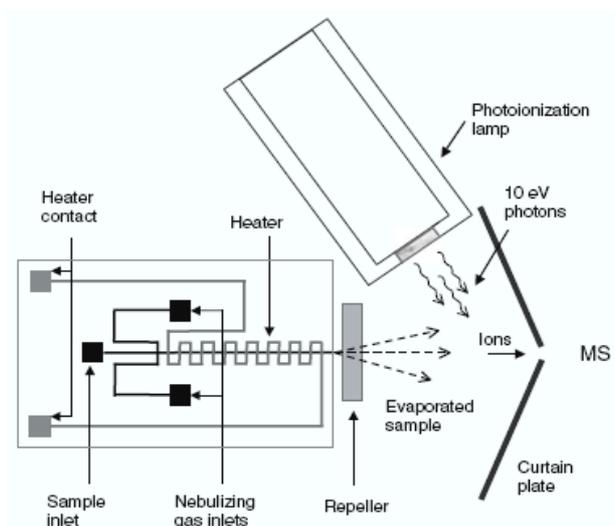


Figure 10 : Représentation schématique de la μAPPI [Kauppila, 2004c]

Haapala *et al.* ont fabriqué une micropuce couplant la photoionisation à pression atmosphérique (APPI) avec la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie

liquide capillaire (capLC) [Haapala, 2007a]. Elle est constituée d'un capillaire d'introduction pour l'échantillon, un gaz auxiliaire, une entrée de dopant, une zone de vaporisation, une buse et un tube de platine chauffé. De nombreuses applications ont été effectuées grâce à cette micropuce comme les composés hydrocarbonés polyaromatiques (PAH), des amphétamines, des pesticides [Kruve, 2011] et des stéroïdes dans les urines en LC/ μ APPI [Haapala, 2007a et 2010] [Ahonen, 2010] et en GC/ μ APPI [Hintikka, 2010]. Ces micropuces peuvent être utilisées avec n'importe quel spectromètre de masse équipé de sources d'ions à pression atmosphérique.

Luosujärvi *et al.* ont combiné la chromatographie en phase gazeuse et la trappe ionique avec les sources μ APCI et μ APPI. L'analyse a porté sur une série de composés biphényls polychlorés (PCB) par GC/ μ APCI-MS et GC/ μ APPI-MS. Ils ont ainsi démontré la pertinence des sources d'ions miniaturisées en μ APPI avec une forte sensibilité et répétabilité, par rapport aux sources μ APCI lors d'analyses en mode négatif [Luosujärvi, 2008].

Dernièrement, la micropuce a même été utilisée comme source d'ionisation thermospray à pression atmosphérique (ATPSI) [Rahkonen, 2009].

5. Couplage de l'APPI avec d'autres méthodes séparatives

Différents couplages ont été développés ces dernières années comme le couplage de l'APPI-MS à la micro, la nano-LC et à certains dispositifs microfluidiques. La flexibilité des systèmes de chromatographie en fluide supercritique (SFC/MS) a aussi été révélée grâce à l'APPI pour l'analyse de composés non polaires où le rapport S/N a été augmenté [Bolaños, 2004]. Dernièrement, l'optimisation a été poussée jusqu'à travailler avec un système UPLC-APPI-MS/MS [Hsieh, 2007] [Lien, 2009].

Le couplage de l'APPI avec électrophorèse capillaire (CE/MS) est particulièrement intéressant du fait de sa compatibilité avec les débits faibles et sa tolérance aux sels non

volatils tels que les tampons phosphate qui sont généralement utilisés pour des séparations en électrophorèse capillaire [Nilsson, 2003] ou le SDS [Mol, 2005a et b] sans suppression de signal comme avec l'ESI. Le groupe de Somsen [Mol, 2005a et b] a couplé la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) à la photoionisation à pression atmosphérique (MEKC-APPI-MS), ce qui donne une technique séparative et d'ionisation de molécules polaires/chargées et de molécules neutres/apolaires efficace. Dernièrement la photoionisation à pression atmosphérique capillaire (cAPPI) qui associe une lampe miniature à décharge avec un capillaire de transfert des ions a permis d'étudier *in situ* des produits de dégradation de composés atmosphériques [Kersten, 2011].

6. L'ionisation laser à pression atmosphérique (APLI)

L'APLI est une technique proche de l'APPI et a été introduite par le groupe de Benter pour le couplage LC/APLI [Constapel, 2005] et ESI/GC/APLI [Brockmann, 2008] permettant d'ouvrir un vaste champ d'applications. La source APLI est constituée d'une source APCI mais sans aiguille corona (**Figure 11**), et l'ionisation se déroule à $p = 1$ atm.

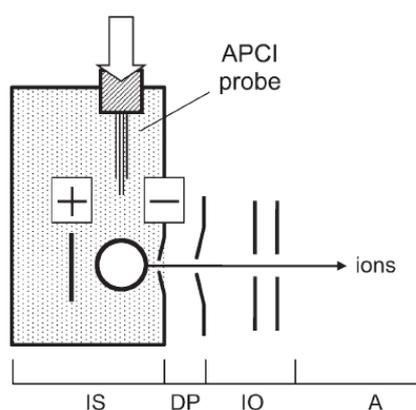


Figure 11 : Vue schématique d'une source APLI. Le laser est représenté par le cercle relié à la flèche présentant la formation d'ions. PV=valve pulsée; DP=étape de pompage différentiel; IS= source d'ion; IO= optiques pour les ions; A=analyseur; +/-_fort potentiel de tension

d'électrode répulsif / extraction. Les zones en pointillées indiquent les régions à la valeur ou au-dessus de la valeur de la pression atmosphérique [Constapel, 2005].

Cette technique emploie une ionisation multiphotonique fixe (2 photons), alors que l'APPI repose sur une approche monophotonique. La technique d'ionisation multiphotonique résonante (REMPI) implique généralement une résonance d'absorption de photons unique ou multiples à un état électroniquement excité intermédiaire suivie par un autre photon qui ionise l'atome ou la molécule. L'intensité lumineuse pour réaliser une transition multiphotonique typique est généralement beaucoup plus importante que l'intensité lumineuse pour parvenir à une photoabsorption de photon unique. En raison de cela, une photoabsorption ultérieure est souvent très probable. Un ion et un électron libre sont engendrés si les photons ont communiqué assez d'énergie pour dépasser le seuil d'énergie d'ionisation du système. Cette ionisation multiphotonique résonante (REMPI) est donc performante pour augmenter de manière significative la sélectivité du processus d'ionisation et la sensibilité des mesures de masse. Par ailleurs, comme le laser délivre un flux de photons beaucoup plus intense que celui délivré par une lampe à photoionisation, cela entraîne des limites de détection de l'ordre de la femtomole [Constapel, 2005]. Les sources APLI peuvent être couplées avec des spectromètres de masse à pression atmosphérique et l'utilisation de dopant donne des processus d'ionisation similaire à ceux en DA-APPI. En APLI, on peut obtenir une ionisation efficace de composés apolaires. Panda *et al.* ont même associé l'APLI au FT-ICR afin d'effectuer des analyses performantes sur l'étude de composés aromatiques [Panda, 2011]. Parmi les nombreuses réactions possibles, l'APLI permet l'attachement d'électron à pression atmosphérique. Les électrons thermiques sont générés par interaction entre le faisceau laser et les surfaces métalliques. La capture d'électron résonnante et/ou dissociative conduit alors à l'ionisation de l'analyte [Constapel, 2005]. Le défaut majeur de la technique de l'APLI est qu'elle nécessite

la présence d'un chromophore qui absorbe l'énergie à la longueur d'onde du chromophore. L'APPI en revanche est une technique que l'on peut dire universelle puisque qu'elle peut ioniser à n'importe quelle longueur d'onde sélectionnée.

7. La photo-ionisation à pression atmosphérique par désorption (DAPPI)

C'est le groupe de Kostianen [Haapala, 2007b] qui a mis au point cette technique d'ionisation à pression atmosphérique qui consiste en l'analyse par désorption thermique d'un échantillon sous forme de goutte liquide directement sur plaque. La DAPPI offre de nouvelles possibilités pour l'ionisation de surface à pression atmosphérique, elle élargit la gamme des composés apolaires pouvant être analysés par des techniques directes d'ionisation en spectrométrie de masse. La **Figure 12** présente une vue schématique du montage DAPPI.

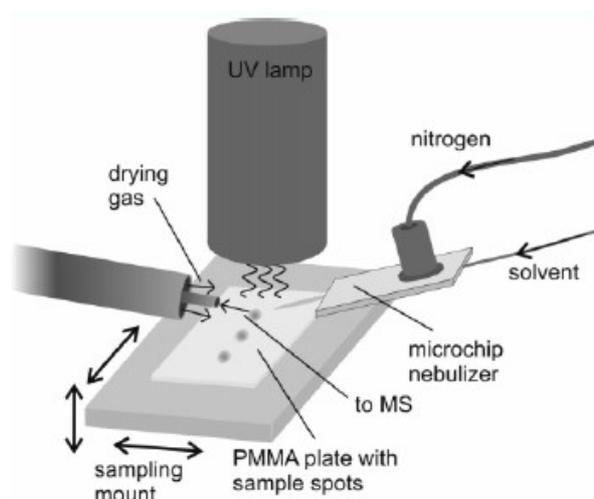


Figure 12 : Vue schématique de la source DAPPI

Le principe est basé sur un micro-nébuliseur polyvalent qui fournit un jet de vapeur confiné générant un réchauffement très localisé de la surface. Les plaques de polymère permettent le chauffage local de l'échantillon sur la plaque. Les photons sont émis par une lampe à décharge dans le Krypton et en direction de l'échantillon (**Figure 10**). Le jet de vapeur permet d'obtenir une désorption thermique et la photoionisation de l'analyte à la surface se produit :

les ions ainsi formés sont transférés vers le spectromètre de masse par le biais d'une différence de potentiel. Les réactions en phase gazeuse qui se produisent sont équivalentes à celles observées en APPI et mènent aux ions $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, M^\bullet , $M^{+\bullet}$ [Luosujärvi, 2008].

Cette technique est rapide, sensible et stable sans préparation ni purification préalable de l'échantillon. La sélectivité de l'ionisation s'effectue par le choix du solvant et du dopant.

La DAPPI a fait ses preuves et est de nos jours utilisée dans les sciences criminelles en routine afin d'analyser des drogues confisquées [Kauppila, 2011].

8. Conclusion sur l'APPI

Initialement, la source APPI était conçue dans l'idée d'étendre la gamme de polarité des analytes étudiés par LC/MS. [Raffaelli, 2003], [Kauppila, 2002], [Robb, 2000]. La gamme de composés qui peuvent être ionisés se rapproche de celle utilisant la technique d'APCI à décharge corona. De nombreuses études de comparaison des trois techniques APPI, APCI et ESI [Cai, 2006], [Ross, 2010] ont permis de déduire que l'APPI est une technique particulièrement sensible, due à un faible phénomène de suppression d'ions [Bos, 2006]. Par ailleurs, l'APPI par rapport à l'APCI exige moins de chaleur pour la désolvatation donnant lieu ainsi à moins de dégradation thermique des molécules [Greig, 2003]. La question se pose même dans la communauté scientifique de savoir si l'APPI ne serait pas devenue la deuxième source d'ionisation couplable à la LC-MS après l'ESI, et supplanterait l'APCI [Syage, 2007]. En effet, le développement des diverses techniques décrites dans ce chapitre utilisant comme base l'APPI, démontre que l'APPI est une technique de plus en plus adéquate pour l'étude de composés polaires et apolaires en mode d'ionisation positif comme négatif.

9. Limitation de ces sources de lumière à énergie d'ionisation fixe

Les sources de lumière, que sont les lampes, présentent le désavantage de ne retranscrire qu'un certain type de propriétés de la molécule, à une longueur d'onde donnée et non tous les mécanismes mis en jeu en fonction de la gamme d'énergie. Il est important de savoir si les décompositions, qui ont lieu en source, sont dépendantes de la longueur d'onde. L'utilisation d'une source accordable où les longueurs d'ondes peuvent être sélectionnées et balayées à volonté est donc une alternative judicieuse pour étudier les mécanismes d'ionisation et de réaction, la photochimie et les propriétés des solvants et des gaz utilisés dans toute la gamme spectrale. Les phénomènes d'absorption de la lumière par les solvants peuvent être étudiés et en particulier par l'eau qui possède une EI élevée de 12,62 eV ne pouvant donc pas être photoionisé par les lampes dont nous disposons actuellement. Ceci pourrait encore résoudre la question de savoir si la réaction de transfert d'hydrogène à partir des molécules de solvants protiques présentes dans le milieu [Syage, 2004] possède un seuil énergétique. Dernièrement une source accordable dans le VUV a été couplée à un ToFMS pour étudier des aérosols et déterminer expérimentalement l'EI des trois composés initialement calculés ab initio: la benzophénone (EI = 9,07 eV), l'acide salicylique (EI = 8,72 eV), et l'urée (EI = 9,85 eV) [Fang, 2011].

10. Conclusions sur la source accordable

Cette source accordable, couplée au Q-Star, a été utilisée dans cette thèse pour permettre d'étudier les mécanismes d'ionisation et réactionnels des analytes selon le dopant et le solvant. En faisant varier la longueur d'onde, il a donc été possible d'étudier les seuils d'ionisation de dichlorocarbènes, de phospholipides, de la guanine et de peptides, mais également des dopants et solvants utilisés. En deçà de 110 nm (11,28 eV) le pompage différentiel est nécessaire. Cependant, les expériences menées ont été réalisées sans pompage différentiel et ont donné des informations suffisantes sur les mécanismes réactionnels qui se

déroulaient en solution, mais il est nécessaire de poursuivre ces expériences pour étudier la réactivité de solvant comme l'eau (IE = 12,62 eV). Par ailleurs, la possibilité d'un balayage continu du monochromateur durant une acquisition chromatographique semble particulièrement intéressante. En effet, faire balayer les longueurs d'ondes au cours de l'élution des composés permettrait de comprendre les mécanismes mis en jeu à chaque étape du chromatogramme, c'est-à-dire à chaque composé élué on pourrait étudier les mécanismes présents à une longueur d'onde donnée. Ceci offrirait des possibilités de LC/MS résolues en longueur d'onde.

REFERENCES

A

[Ahonen, 2010] L. L. [Ahonen](#), M. [Haapala](#), V. [Saarela](#), S. [Franssila](#), T. [Kotiaho](#), R. [Kostiainen](#), Feasibility of capillary liquid chromatography/microchip atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in analyzing anabolic steroids in urine samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24, 2010, 958.

B

[Bacaloni, 2007] A. Bacaloni, C. Cavaliere, A. Faberi, P. Foglia, A. Marino, R. Samperi, A. Laganà, Evaluation of the atmospheric pressure photoionization source for the determination of benzidines and chloroanilines in water and industrial effluents by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta*, 72, 2007, 419.

[Bacaloni, 2009] A. Bacaloni, L. [Callipo](#), E. [Corradini](#), P. [Giansanti](#), R. [Gubbiotti](#), R. [Samperi](#), A. [Laganà](#), Liquid chromatography-negative ion atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry for the determination of brominated flame retardants in environmental water and industrial effluents, *J Chromatogr A*, 1216, 2009, 6400.

- [Bae, 2010] E. J. G [Na](#), S. H. [Chung](#), H. S. [Kim](#), S. [Kim](#), [Identification of about 30 000 Chemical Components in Shale Oils by Electrospray Ionization \(ESI\) and Atmospheric Pressure Photoionization \(APPI\) Coupled with 15 T Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry \(FT-ICR MS\) and a Comparison to Conventional Oil](#), *Energy Fuels*, 24, 2010, 2563.
- [Bagag, 2007] A. Bagag, A. Giuliani, O. Lapr evote, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of nucleic bases, ribonucleosides and ribonucleotides, *Int. J. Mass spectrom.*, 264, 2007, 1.
- [Bagag, 2008a] A. Bagag, A. Giuliani, O. Laprevote, [Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of oligodeoxyribonucleotides](#), *Eur. J. Mass Spectrom.*, 14, 2008, 71.
- [Bagag, 2008b] A. Bagag, Photoionisation et spectrom trie de masse : un nouvel outil pour l'identification, En vue de l'obtention du grade de docteur en sciences de l'universit  d'Evry Val d'Essonne, 2008.
- [Bagag, 2011] A. Bagag; A. Giuliani; O. Laprevote, Atmospheric pressure photoionization of peptides, *Int. J. Mass spectrom.*, 299, 2011, 1.
- [Baim, 1983] M. A. Baim, R. L. Eatherton, H. H. Hill, Ion mobility detector for gas chromatography with a direct photoionization source, *Anal. Chem.*, 55, 1983, 1761.
- [Baldwin, 1975] G.C. Baldwin, Origin of synchrotron radiation, *Phys. Today*, 28, 1975, 9.
- [Banoub, 2007] J. H. Banoub, B. Benjelloun-Mlayah, F. Ziarelli, N. Joly, M. Delmas, Elucidation of the complex molecular structure of wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure Photoionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2007, 2867.

[Bos, 2006] S. J. Bos, S. M. van Leeuwen, U. Karst, From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 2006, 85.

[Borsdorf, 2006] H. Borsdorf, E. G. Nazarov, R. A. Miller, Atmospheric pressure ionization studies and field dependence of ion mobilities of isomeric hydrocarbons using a miniature differential mobility spectrometer, *Anal. Chim. Acta*, 575, 2006, 76.

[Brochmann, 2008] K. J. [Brockmann](#), T. [Benter](#), M. [Lorenz](#), A. L. M. [Suarez](#), S. [Gab](#), O. [Schmitz](#), R. [Schiewek](#), R. [Monnikes](#), Analytical innovations: development and applications of atmospheric pressure laser ionization (APLI), *Environ. Security*, 2008, 219.

C

[Caldwell, 1989] G. W. Caldwell, J. A. Masucci, M. G. Ikonomou, Negative-ion chemical ionization mass-spectrometry binding of molecules to bromide and iodide anions, *Org. Mass Spectrom.*, 24, 1989, 8.

[Cai, 2005] Y. X. Cai, D. Kingery, O. McConnell, A.C. Bach II, Advantages of atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in support of drug discovery, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 2005, 1717.

[Cai, 2006a] S. S. Cai, J. A. Syage, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for analysis of fatty acid and acylglycerol lipids, *J. Chrom. A*, 1110, 2006, 15.

[Cai, 2006b] S. S. Cai, J. A. Syage, Comparison of atmospheric pressure photoionization, atmospheric pressure chemical ionization and électrospray ionization mass spectrometry for analysis of lipids, *Anal. Chem.*, 78, 2006, 1191.

[Cai, 2007a] S. S. Cai, K. A. Hanold, J. A. Syage, Comparison of atmospheric pressure photoionization and atmospheric pressure chemical ionization for normal-phase LC/MS chiral analysis of pharmaceuticals, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 2491.

[Cai, 2007b] S. S. Cai, L. C. Short, J. A. Syage, M. Potvin, J.M. Curtis, Liquid chromatography atmospheric pressure Photoionization mass spectrometry analysis of triacylglycerol lipids. Effects of mobile phases on sensitivity, *J. Chrom. A*, 1173, 2007, 88.

[Cao, 2006] J. Cao, S. J. Murch, R. O'Brien, P. K. Saxena, Rapid method for accurate analysis of melatonin, serotonin and auxin by liquid chromatography atmospheric pressure ionisation mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1134, 2006, 333.

[Cavaliere, 2006] C. Cavaliere, P. Foglia, E. Pastorini, R. Samperi, A. Laganà, Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk. Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources, *J. Chrom. A*, 1101, 2006, 69.

[Chen, 2005] J. W. Chen, W. A. Korfmacher, Y. Hsieh, Chiral liquid chromatography tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations, *J. Chrom. A*, 820, 2005, 1.

[Clarke & Jones, 2004] A. Procopiou, N. M. [Allinson](#), G. R. [Jones](#), D. T. [Clarke](#), Estimation of protein secondary structure from synchrotron radiation circular dichroism spectra, [*Conf Proc. IEEE Eng Med Biol Soc.*](#), 4, 2004, 2893.

[Constapel, 2005] M. Constapel, M. Schellenträger, O. J. Schmitz, S. Gäb, K. J. Brockmann, R. Giese, T. Benter, Atmospheric pressure laser ionization : a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 2005, 326.

[Crescenzi, 2007] C. Crescenzi, J. Albinana, H. Carlsson, E. Holmgren, R. Battle, On-line strategies for determining trace levels of nitroaromatics explosives and related compounds in water, *J. Chrom. A*, 1153, 2007, 186.

D

[Davenport, 1984] J. N. Davenport, E. R. Adlard, Photoionization detectors for gas chromatography, *J. Chrom. A*, 290, 1984, 13.

[Davis, 2006] J. W. Davis, S. J. Gonsior, D. A. Markham, U. Friederich, R. W. Hunziker, J. M. Ariano, Biodegradation and product identification of [C-14]hexabromocyclododecane in wastewater sludge and freshwater aquatic sediment, *Environ. Sci. Technol.*, 40, 2006, 5395.

[Debois, 2006] D. Debois, A. Giuliani, O. Laprévotte, Fragmentation induced in atmospheric pressure photoionization of peptides, *J. Mass Spectrom.*, 41, 2006, 1554.

[Debrauwer, 2005] L. Debrauwer, A. Riu, M. Jouahri, E. Rathahao, I. Jouanin, J. P. Antignac, R. Cariou, B. Le Bizec, D. Zalco, Probing new approaches using atmospheric pressure photoionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1082, 2005, 98.

[Delobel, 2003] A. Delobel, F. Halgand, B. Laffranchisse-Gosse, H. Snijders, O. Laprévotte, Characterization of hydrophobic peptides by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 75, 2003, 5961.

[Delobel, 2005] A. Delobel, D. Touboul, O. Laprévotte, Structural characterization of phosphatidylcholines by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 11, 2005, 409.

[Delobel, 2006] A. Delobel, S. Roy, D. Touboul, K. Gaudin, D. P. Germain, A. Baillet, F. Brion, P. Prognon P. Chaminade, O. Laprévotte, Atmospheric pressure photoionization

coupled to porous graphitic carbon liquid chromatography for the analysis of globotriaosylceramides. Application to Fabry disease, *J. Mass Spectrom.*, 41, 2006, 50.

[Dewit, 1987] J. S. M. DeWit, J. W. Jorgenson, [Photoionization detector for open-tubular liquid chromatography](#), *J. Chromatogr.*, 411, 1987, 201.

[Ding, 2007] Y. S. Ding, D. L. Ashley, C. H. Watson, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 2007, 5966.

[Dorcier, 2003] A. Dorcier, P. J. Dyson, J. S. McIndoe, Analysis of coordination and organometallic compounds using photoionisation mass spectrometric techniques, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 24, 2003, 4294.

[do Carmo Borges, 2011] N. C. do Carmo Borges, R. B. Astigarraga, C. E. Sverdloff, B. C. Borges, T. R. Paiva, Paulo R. Galvinas, R. A. Moreno, Budesonide quantification by HPLC coupled to atmospheric pressure photoionization (APPI) tandem mass spectrometry, Application to a comparative systemic bioavailability of two budesonide formulations in healthy volunteers, *J. Chromat. B*, 879, 2011, 236.

[Fang, 2011] W. Fang, G. Lei, X. Shan, F. Liu, Z. Wang, L. Sheng, A VUV photoionization aerosol mass spectrometric study with synchrotron, *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.*, 184, 2011, 129.

G

[Gekko, 2001] K. Gekko, N. Ojima, K. Sakai, K. Matsuo, T. Matsui, T. Fukazawa, H. Namatame, M. Taniguchi, *Chem. Lett.*, 6, 2001, 522.

[Geyer, 2004] R. Geyer, A. D. Peacock, D. C. White, C. Lytle, C. J. Van Berkel, Atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for simultaneous mass spectrometric analysis of microbial respiratory ubiquinones and menaquinones, *J. Mass Spectrom.*, 39, 2004, 922.

[Giuliani, 2006] A. Giuliani, D. Debois, O. Lapr evote, Study of a bisquaternary ammonium salt by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 12, 2006, 189.

[Giuliani, 2009] A. Giuliani, F. Jamme, V. Rouam, F. Wien, J.L. Giorgetta, B. Lagarde, O. Chubar, S. Bac, I. Yao, S. Rey, C. Herbeaux, J.L. Marlats, D. Zerbib, F. Polack, M. r efr egiers, DISCO: a low-energy multipurpose beamline at synchrotron SOLEIL, *Synchrotron Rad.*, 16, 2009, 835.

[Giuliani, 2011] [A. Giuliani](#), [I. Yao](#), [B. Lagarde](#), [S. Rey](#), [J. P. Duval](#), [P. Rommeluere](#), [F. Jamme](#), [V. Rouam](#), [F. Wein](#), [C. De Oliveira](#), [M. Ros](#), [A. Lestrade](#), [K. Desjardins](#), [J.-L. Giorgetta](#), [O. Laprevote](#), [C. Herbeaux](#), [M. Refregiers](#), A differential pumping system to deliver windowless VUV photons at atmospheric pressure, *J. Synchrotron Rad.*, 18, 2011, 546.

[G omez-Ariza, 2006a] J. L. Gomez-Ariza, A. Arias-Borrego, T. Garcia-Barrera, R. Beltran, Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication, *Talanta*, 70, 2006, 859.

[G omez-Ariza, 2006b] J. L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, Anthocyanins profile as fingerprint of wines using atmospheric pressure photoionization coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 570, 2006, 101.

[G omez-Ariza, 2006c] J. L. Gomez-Ariza, A. Arias-Borrego, T. Garcia-Barrera, Use of flow injection atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for fast olive oil fingerprinting, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 2006, 1181.

[Greig, 2003] M. J. Greig, B. Bola nos, T. Quenzer, J. M. R. Bylund, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization for high-resolution analyses of corticosteroids, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, 2763.

[Grimsrud, 1973] E. P. Grimsrud, P. Kebarle, Gas-phase ion equilibria studies of solvation of hydrogen-ion by methanol, dimethyl ether, and water - effect of hydrogen-bonding, *J. Am. Soc. Mass Spec.*, 95, 1973, 7939.

[Greig, 2003] M. J. Greig, B. Bolaños, T. Quenzer, J. M. R. Bylund, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization for high-resolution analyses of corticosteroids, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, 2763.

[Grosse, 2007] S. Grosse, T. Letzel, Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry with post-column liquid mixing for the efficient determination of partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Chrom. A*, 1139, 2007, 75.

[Guo, 2004] T. Guo, M. Chan, S. J. Soldin, Steroid profiles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure photoionization source, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 128, 2004, 469.

H

[Haapala, 2010] M. Haapala, V. [Saarela](#), J. [Pol](#), K. [Kolari](#), T. [Kotiaho](#), S. [Franssila](#), R. [Kostiainen](#), Integrated liquid chromatography-heated nebulizer microchip for mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 662, 2010, 163

[Hanold, 2004] K. A. Hanold, S. M. Fisher, P. H. Cormia, C. E. Miller, J. A. Syage, Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS. *Anal. Chem.*, 76, 2004, 2842.

[Haapala, 2007a] M. Haapala, L. Luosujärvi, V. Saarela, T. Kotiaho, R. A. Ketola, S. Franssila, R. Kostiainen, Microchip for combining gas chromatography or capillary liquid chromatography with atmospheric pressure Photoionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 4994.

[Haapala, 2007b] M. Haapala, J. Pól, V. Saarela, V. Arvola, T. Kotiaho, R. A. Ketola, S. Franssila, T. J. Kauppila, R. Kostiainen, Desorption Atmospheric Pressure Photoionization, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 7867.

[Hakala, 2003] K. S. Hakala, L. Laitinen, A. M. Kaukonen, J. Hirvonen, R. Kostiainen, T. Kotiaho, Development of LC/MS/MS methods for cocktail dosed Caco-2-samples using atmospheric pressure Photoionization and electrospray ionization, *Anal. Chem.*, 75, 2003, 5969.

[Himmelsbach, 2007] M. Himmelsbach, M Haunschmidt, W. Burchberger, C. W. Klampfl, Microemulsion electrokinetic chromatography with on-line atmospheric pressure Photoionization mass spectrometric detection of medium polarity compounds, *J. Chrom. A*, 1159, 2007, 58.

[Hintikka, 2010] L. Hintikka, M. Haapala, S. [Franssila](#), T [Kuورانne](#), A [Leinonen](#), R Kostiainen, Feasibility of gas chromatography-microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry in analysis of anabolic steroids, *J. Chrom. A*, 1217, 2010, 8290.

[Hoffman, 2007] A. Hoffmann, A. Kane, D. Nettels, D. E. Hertzog, P. Baumgärtel, J. Legenfeld, G. Reichardt, D. A. Horsley, R. Seckler, O. Bakajin, B.Schuler, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 2007, 105.

[Hollosi, 2011] L. Hollosi, T. [Wenzl](#), Development and optimisation of a dopant assisted liquid chromatographic-atmospheric pressure photo ionisation-tandem mass spectrometric method for the determination of 15+1 EU priority PAHs in edible oils, *J. Chrom. A*, 1218, 2011.

[Hommerson, 2007a] P. Hommerson, A. M. Khan, G. J. De Jong, G. W. Somsen, Comparison of atmospheric pressure photoionization and ESI for CZE-MS of drugs, *Electrophoresis*, 28, 2007, 1444.

[Hommerson, 2007b] P. Hommerson, A. M. Khan, T. Bristow, W. Niessen, G. J. De Jong, G. W. Somsen, Photon independent gas phase ion formation in capillary electrophoresis mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 5351.

[Horning, 1974] E. C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, K. D. Haegele, Horning, M. G. Stillwell, R. N., *J. Chromatogr. Science*, 121974, 725.

[Hsieh, 2003] Y. S Hsieh, K. Merkle, G. F. Wang, Zirconia-based column high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure Photoionization tandem mass spectrometric analyses of drug molecules in rat plasma, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, 1775.

[Huikko, 2003] K. Huikko, R. Kostianen, R. Kotiaho, Introduction to micro-analytical systems: bioanalytical and pharmaceutical applications, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 20, 2003, 149.

I

[Itoh, 2006] N. Itoh, Y. Aoyagi, T. YAruta, Optimization of the dopant for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography/dopant assisted atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1131, 2006, 285.

J

[Jean-Denis, 2006] J. B. Jean-Denis, R. Pezet, R. Tabacchi, Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1112, 2006, 263.

K

- [Kabler, 2006] A. K. Kabler, S. M. Chen, Determination of the 1 ' S and 1 ' R diastereomers of metolachlor and S-metolachlor in water by chiral liquid chromatography - Mass spectrometry/mass spectrometry (LC/MS/MS), *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2006, 6153.
- [Kania, 2011] M. Kania, G. Spolnik, A. Jozwiak, M. Ples, E. Swiezewska, W. Danikiewicz, Identification of polyisoprenoid alcohols and their derivatives in natural samples by HPLC method coupled with atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Chem. Phys. Lipids*, 164, 2011, 38.
- [Kauppila, 2002] T. J. [Kauppila](#), T. Kuuranne, E. C. Meurer, M. N. [Eberlin](#), T. [Kotiaho](#), R. [Kostiainen](#), Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes. *Anal Chem.*, 21, 2002, 54.
- [Kauppila, 2004a] T. J. Kauppila, R. Kostiainen, A. P Bruins, Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 2004, 808.
- [Kauppila, 2004b] T. J. Kauppila, T. Kotiaho, R. Kostiainen, A. P Bruins, Negative ion-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 2004, 203.
- [Kauppila, 2004c] T. J. Kauppila, P. Östman, S. Marttila, A. Ketola, R. T. Kotiaho, S. Franssila, R. Kostiainen, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry with a microchip heated nebulizer, *Anal. Chem.*, 76, 2004, 6797.
- [Kauppila, 2006] T. J. Kauppila, A. Flink, M. Haapala, U. M. Laakkonen, L. Aalberg, R. A. Ketola, R. Kostiainen, Desorption atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in routine analysis of confiscated drugs, *Forensic Sci. Int.*, 210, 2011, 206.

[Kauppila, 2008] T. J. Kauppila, V. Arvola, M. Haapala, J. Pól, L. Aalberg, V. Saarela, S. Franssila, T. Kotiaho, R. Kostiainen, Direct analysis of illicit drugs by desorption atmospheric pressure Photoionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 2008, 979.

[Kauppila, 2011] T. J. Kauppila, A. Flink, M. Haapala, U. M. Laakkonen, L. Aalberg, R. A. Ketola, R. Kostiainen, Desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry in routine analysis of confiscated drugs, *Forensic Sci. Int.*, 210, 2011, 206.

[Kéki, 2008] S. Kéki, J. Török, L. Nagy, M. Zsuga, Atmospheric pressure Photoionization mass spectrometry of polyisobutylene derivatives, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19, 2008, 656.

[Kersten, 2011] H. [Kersten](#), V. [Derpmann](#), I. [Barnes](#), K. J. [Brockmann](#), R. [O'Brien](#), T. [Benter](#), A Novel APPI-MS Setup for In Situ Degradation Product Studies of Atmospherically Relevant Compounds: Capillary Atmospheric Pressure Photo Ionization (cAPPI), *J. Am. Soc. Mass Spec.*, 22, 2011, 2070.

[Keski-Hynnily, 2002] H. Keski-Hynnily, M. Kurkela, E. Elovaara, J. Antonio, J. Magdalou, L. Luukkanen, J Taskinen, R. Kostiainen, Comparison of electrospray, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure Photoionization in the identification of apomorphine, dobutamine and entacapone phase II metabolites in biological samples, *Anal. Chem.*, 74, 2002, 3449.

[Ketkar, 1991] S. N. Ketkar, J. G. Dulak, S. Dheandhanoo, W. L.Fite, [Benzene charge-exchange at atmospheric-pressure for low-level detection of pollutants in ambient air](#), *Anal. Chim. Acta.* 245, 1991, 267.

[Koster, 2001] G. Koster, A. P Bruins, Mechanisms for ion formation in LC/MS by atmospheric presusre photoionization, *Proceeding of the 49th ASMS Conference on Mass spectrometry and Allied Topics*, Chicago, IL, 2001.

[Kruve, 2011] A. Kruve, M. Haapala, V. Saarela, S. Franssila, R. Kostiainen, T. Kotiaho, R. A. Ketola, Feasibility of capillary liquid chromatography–microchip-atmospheric pressure photoionization–mass spectrometry for pesticide analysis in tomato, *Analytica Chimica Acta*, 696, 2011, 77.

[Kulipanov , 1988] G. N. Kulipanov, A. N. Shrinky, Early work on synchrotron radiation, *Synchr. Radiat. News*, 1, 1988, 32.

[Kushnir, 2004] M. M. Kushnir, R. Neilson, W. L. Roberts, A.L. Rockwood, Cortisol and cortisone analysis in serum and plasma by atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.*, 37, 2004, 357.

L

[Ladenburg & Van Vhooris, 1933] R. Ladenburg, C. C. Van Vhooris, The Continuous Absorption of Oxygen Between 1750 and 1300A and Its Bearing Upon the Dispersion, *Phys. Rev.*, 43, 1933, 315.

[Leasure, 1986] C. S. Leasure, M. E. Fleischer, G. K. Anderson, G. A. Eiceman, Photoionization in air with ion mobility spectrometry using a hydrogen discharge lamp, *Anal. Chem.*, 58, 1986, 2142.

[Lembeck, 2005] J. Lembeck, U. Ceglarek, G. M. Fiedler, S. Baumann, A. Leichtle, J. Thierry, Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS, *J. Lipid Res.*, 46, 2005, 21.

[Lien, 2009] G. W. Lien, C. Y. Chen, G. S. Wang, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations, *J. Chromat. A.*, 1216, 2009, 956.

[Lih, 2010] F. B. Lih, M. A. Titus, J. L. Mohler, K. B. Tomer, Atmospheric Pressure Photoionization Tandem Mass Spectrometry of Androgens in Prostate Cancer, *Anal. Chem.*, 82, 2010, 6000.

[Locke, 1982] D. C. Locke, B. S. Dhingra, A. D. Baker, Liquid-phase photoionization detector for liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 54, 1982, 447.

[Lovelock, 1960] J. E. Lovelock, A photoionization detector for gases and vapors, *Nature*, 188, 1960, 401.

[Lovelock, 1961] J. E. Lovelock, Ionization Methods for the Analysis of Gases and Vapors, *Anal. Chem.*, 33, 1961, 162.

[Luosujärvi, 2008] L. Luosujärvi, V. Arvola, M. Haapala, J. Pol, V. Saarela, S. Franssila, R. [Kostiainen](#), T. [Kotiaho](#), T. J. [Kauppila](#), Desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry in drug analysis, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 34S, 2008, S25.

M

[Marotta, 2003] E. Marotta, R. Seraglia, F. Fabris, P. Traldi, Atmospheric Pressure Photoionization Mechanisms 1. The Case of Acetonitrile, *Int. J. Mass Spectrom.*, 228, 2003, 841.

[Martens-Lobenhoffer, 2007] J. Martens-Lobenhoffer, I. Reiche, U. Tröger, K. Mönkemüller, P. Malfertheiner, S. M. Bode-Böger, Enantioselective quantification of omeprazole and its main metabolites in human serum by chiral HPLC-atmospheric pressure Photoionization tandem mass spectrometry, *J. Chrom. B*, 857, 2007, 301.

[Matsuo, 2005] K. Matsuo, R. Yonehara, K. J. Gekko, Improved estimation of the secondary structures of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy, *Biochem.*, 138, 2005, 79.

[Meng, 2002] C.K. Meng, Analyzing phenyl ureas and carbamate pesticides using ESI-, APPI- and APCI-LC/MSD. Agilent Technologies publication, 5988.

[Meot-Ner, 1986] M. [Meot-Ner](#), L. W. [Sieck](#), The ionic hydrogen bond and ion solvation. 5-OH.cntdot..cntdot..cntdot.O- bonds. Gas-phase solvation and clustering of alkoxide and carboxylate anions, *J Am Chem Soc.*, 108, 1986, 7525.

[Mohamed, 2007] R. Mohamed, Y. A. Hammel, M. H. LeBreton, J. C. Tabet, L. Jullien, P. A. Guy, Evaluation of atmospheric pressure interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques, *J. Chrom. A*, 1160, 2007, 194.

[Mol, 2005a] R. Mol, G. J. de Jong, G. W. Somsen, On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: Setup and system performance, *Electrophoresis*, 26, 2005, 146.

[Mol, 2005b] R. Mol, G. J. De Jong, G. W. Somsen, Atmospheric pressure photoionization for enhanced compatibility in on-line micellar electrokinetic chromatography - Mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 77, 2005, 5277.

[Moriwaki, 2004a] H. Moriwaki, H. Harino, T. Yoshikura, T. Ohe, H. Nukaya, Y. Tereao, H. Swanishi, K. Wakabayashi, H. Miyakoda, J. F Alary, Simultaneous determination of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens, PBTA-1 through -8, in river water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Environ. Monit.*, 6, 2004, 897.

[Moriwaki, 2004b] H. Moriwaki, M. Ishitake, S. Yoshikawa, H. Miyakoda, J.F. Alary, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Anal. Sci.*, 20, 2004, 375.

[Moriwaki, 2007] H. Moriwaki, H. Miyakoda, Analysis of p,p'-dichlorodiphenyl-trichloroethane (p,p'-DDT) by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spec.*, 21, 2007, 1090.

[Müller, 2006] A. Müller, M. B. Markus, R. Geyer, R. Ringseis, K. Eder, H. Steinhart, Identification of conjugated linoleic acid elongation and beta-oxidation products by coupled silver-ion HPLC APPI-MS, *J. Chrom. B*, 837, 2006, 147.

[Muñoz-Garcia, 2006] A. Muñoz-Garcia, J. Ro, J. C. Brown, J. B. Williams, Identification of complex mixtures of sphingolipids in the stratum corneum by reversed-phase high-performance liquid chromatography and atmospheric pressure photospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1133, 2006, 58.

[Muñoz-Garcia, 2008] A. Muñoz-Garcia, J. Ro, J. C. Brown, J. B. Williams, Cutaneous water loss and sphingolipids in the stratum corneum of house sparrows, *Passer domesticus* L., from desert and mesic environments as determined by reversed phase high pressure Photospray ionization mass spectrometry, *J. Exp. Biol.*, 211, 2008, 447.

N

[Northway, 2007] M. J. Northway, J. T. Jayne, D. W. Toohey, M. R. Canagaratna, A. Trimborn, K. I. Akiyama, A. Shimono, J. L. Jimenez, P. F. DeCarlo, K. R. Wilson, D. R. Worsnop, Demonstration of a VUV Lamp Photoionization Source for Improved Organic Speciation in an Aerosol Mass Spectrometer, *Aerosol Sci. Tech.*, 41, 2007, 828.

P

[Panda, 2011] S. K. Panda, K. J. Brockmann, T. Benter, W. Schrader, Atmospheric pressure laser ionization (APLI) coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry applied to petroleum samples analysis: comparison with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization methods, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25, 2011, 2317.

[Papanastasiou, 2006] M. Papanastasiou, A. W. McMahon, N. S. Allen, A. M. Doyle, B. J. Johnson, K. Keck-Antoine, The hydrolysis mechanism of bis (2,4-di-tert-butyl)pentaerythritol diphosphite (Alkanox P24): An atmospheric pressure photoionisation mass spectrometric study, *Polym. Degrad. Stab.*, 91, 2006, 2675.

[Papanastasiou, 2012] M. Papanastasiou, N. S. Allen, A. McMahon, L. C.A. Naegel, M. Edge, S. Protopappas, Analysis of Indigo-type compounds in natural dyes by negative ion atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Dyes Pigments*, 92, 2012, 1192.

[Pardo, 2007a] O. Pardo, V. Yusa, C. Coscolla, V. Leon, A. Pastor, Determination of acrylamide in coffee and chocolate by pressurised fluid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Addit. Contam.*, 24, 2007, 663.

[Pardo, 2007b] O. Pardo, V. Yusa, V. León, A. Pastor, Development of a pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry method for the determination of domoic acid in shellfish, *J. Chrom. A*, 1154, 2007, 287.

[Parker, 2012] D. L. Parker, M. E. Rybak, C. M. Pfeiffer, Phytoestrogen biomonitoring: an extractionless LC-MS/MS method for measuring urinary isoflavones and lignans by use of atmospheric pressure photoionization (APPI), *Anal. Bioanal. Chem.*, 402, 2012, 1123.

[Pereira, 2005] A. D. Pereira, L. S. O. B. Oliveira, G. D. Mendes, J. J. Gabbai, G. De Nucci, Quantification of betamethasone in human plasma by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry using atmospheric pressure photoionization in negative mode, *J. Chromat. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 828, 2005, 27.

[Pol, 2007] J. Pol, T. J. Kauppila, M. Haapala, V. Saarela, S. [Franssila](#), R. A. [Ketola](#), T. [Kotiaho](#), R. [Kostiainen](#), Microchip sonic spray ionization, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 3519.

[Pozo, 2012] O. J. [Pozo](#), J [Marcos](#), J [Segura](#), R [Ventura](#), Recent developments in MS for small molecules: application to [human](#) doping control analysis, *Bioanalysis*, 4, 2012, 197.

[Purcell, 2006] J. M. Purcell, C. L. Hendrickson, R. P. Rodgers, A. G Marshall, Atmospheric pressure photoionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for complex mixture analysis, *Anal. Chem.*, 78, 2006, 5906.

[Purcell, 2007a] J. M. Purcell, C. L. Hendrickson, R. P. Rodgers, A. G Marshall, Atmospheric pressure photoionization proton transfer for complex organic mixtures by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 1682.

[Purcell, 2007b] J. M. Purcell, R. P. Rodgers, C. L. Hendrickson, A. G Marshall, Speciation of nitrogen containing aromatics by atmospheric pressure Photoionization or Electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 1265.

[Purcell, 2007c] J. M. Purcell, P. Juyal, D. G Kim, R. P. Rodgers, C. L. Hendrickson, A. G Marshall, Sulfur speciation in petroleum : atmospheric pressure Photoionization or chemical dérivation and électrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Energy & Fuels*, 21, 2007, 2569.

[Puton, 2008] J. Puton, M. Nousiainen, M. Sillanpää, Ion mobility spectrometers with doped gases, *Talanta*, 76, 2008, 978.

R

[Raffaelli, 2003] A. Raffaelli, A. Saba, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, 22, 2003, 318.

[Rahkonen, 2009] P. [Keski-Rahkonen](#), M. [Haapala](#), V. [Saarela](#), S. [Franssila](#), T. [Kotiaho](#), R. [Kostiainen](#), S. [Auriola](#), Atmospheric pressure thermospray ionization using a heated microchip nebulizer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 2009, 3313.

[Rauha, 2001] J. P. Rauha, H. Vuorela, R. Kostiainen, Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoïdes by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 36, 2001, 1269.

[Revel'skii, 1986] I. A. Revel'skii, Y. S. Yashin, V. N. Vosnesenskii, V. K. Kurochkin, R. G. Kostyanovskii, [Mass spectrometry with photoionization of N-alkanes, alcohols, ketones, esters, and amines at atmospheric pressure](#), *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science*, 35, 1986, 1806.

[Revel'skii, 1989a] I. A. Revel'skii, Y. S. Yashin, V.K. Kurochkin, R. G. Kostyanovskii, Mass spectrometric analysis of mixtures without separation, *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science*, 38, 1989, 1331.

[Revel'skii, 1989b] I. A. Revel'skii, S. V. Sokolov, Y. S. Yashin, V. N. [Volodin](#), V. K. Kurochkin, R. G. Kostyanovskii, [Determination of the chemical formulas of microcomponents of mixtures by a combination of chromatography, mass spectrometry, and plasma spectroscopy](#), *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science*, 38, 1989, 1330

[Riu, 2006] A. Riu, D. Zaliko, L. Debrauwer, Study of polybrominated diphenyl ethers using both positive and negative atmospheric pressure photoionization and tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 2006, 2133.

[Riu, 2008] A. Riu, J. Cravedi, L. Debrauwer, A. Garcia, C. Canlet, I. Jouanin, D. Zalko, Disposition and metabolic profiling of [C-14]-decabromodiphenyl ether in pregnant Wistar rats, *Environ. Int.*, 34 (2008) 318.

[Rivera, 2011] S. [Rivera](#), F. [Vilaro](#), R. [Canela](#), Determination of carotenoids by liquid chromatography/mass spectrometry: effect of several dopants, *Analyt. Bioanalyt. Chem.*, 400, 2011, 1339.

[Robb, 2000] D. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, Atmospheric Pressure Photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 72, 2000, 3653.

[Robb, 2009] D. B. [Robb](#), M. W. [Blades](#), An electropneumatic-heated nebulizer for enhancing spray ionization in PhotoSpray atmospheric pressure photoionization sources for liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spec.*, 23, 2009, 3394.

[Robb, 2010] D. B. [Robb](#), J. C. [Rogalski](#), J. Kast, M. W. [Blades](#), Atmospheric pressure-electron capture dissociation of peptides using a modified PhotoSpray ion source, *Rapid Commun. Mass Spec.*, 24, 2010, 3303.

[Robb, 2012] D. B. [Robb](#), J.C. [Rogalski](#), J. [Kast](#), M. W. [Blades](#), A New Ion Source and Procedures for Atmospheric Pressure-Electron Capture Dissociation of Peptides, *J. Am. Soc. Mass Spec.*, 22, 2011, 1699.

[Ross, 2010] M. S. Ross, C. S. Wong, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure photoionization, and anion attachment atmospheric pressure photoionization for the

analysis of hexabromocyclododecane enantiomers in environmental samples, *J. Chromatogr. A*, 1217, 2010, 7855.

[Roy, 2006] S. Roy, A. Delobel, K. Gaudin, D. Touboul, D. P. Germain, A. Baillet, P. Prognon, O. Lapr evote, P. Chaminade, Liquid chromatography on porous graphitic carbon with atmospheric pressure Photoionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry for the analysis of glycosphingolipides, *J. Chrom. A*, 1117, 2006, 154.

S

[Sakairi, 1988] M. Sakairi, H. Kambara, [Characteristics of a liquid chromatograph/atmospheric pressure ionization mass spectrometer](#), *Anal. Chem.*, 60, 1988, 774.

[Schappler, 2007] J. Schappler, D. Guillaume, J. Prat, J. L. Veutey et S. Rudaz, Coupling CE with atmospheric pressure photoionization MS for pharmaceutical basic compounds: optimization of operating parameters, *Electrophoresis*, 28, 2007, 3078-3087

[Schappler, 2008] J. Schappler, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veutey, Microemulsion electrokinetic chromatography hyphenated to atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Electrophoresis*, 29, 2008, 11.

[Schermund, 1975] J. T. Schermund, D. C. Loke, Universal photoionization detector for liquid-chromatography, *Anal. Lett.*, 8, 1975, 611.

[Short, 2007] L. C. Short, S. S. Cai, J. A. Syage, APPI-MS : effects of mobile phase and VUV lamps on the detection of PAH compounds, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 589.

[Short, 2008] L. C. Short, J. A. Syage, Electrospray photoionization (ESPI) liquid chromatography/mass spectrometry for the simultaneous analysis of cyclodextrin and

pharmaceuticals and their binding interactions, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 2008, 541.

[Silva, 2006] L. C. Silva, L. S. O. B. Oliveira, G. D. Mendes, G. Garcia, A. D. Pereira, G. De Nucci, [Quantification of isosorbide 5-mononitrate in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization](#), *J. Chromat. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 832, 2006, 302.

[Song, 2007a] L. Song, A.D. Wellman, H. Yao, J. Adcock, Electron capture atmospheric pressure Photoionization mass spectrometry: analysis of fullerenes, perfluorinated compounds, and pentafluorobenzyl derivatives, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2007, 1343.

[Song, 2007] L. Song, A.D. Wellman, H. Yao, J.E. Bartmess, Negative ion atmospheric pressure photoionization : electron capture, dissociative electron capture, proton transfer and anion attachment, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 189, 2007, 1789.

[Straube, 2004] E. A. Straube, W. Dekant, W. Völkel, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for the analysis of dinitropyrene and aminonitropyrene by LC-MS/MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 2004, 1853.

[Streit, 2007] F. [Streit](#), A. [Dogan](#), L. [Binder](#), M. Oellerich, Measurement of serum testosterone using a waters quattro premier XE Micromass (R) system with an APPI interface, *Clin. Chem.*, 53, 2007, A199.

[Sutherland, 1980] J. C. Sutherland, E. J. Desmond, P. Z. Takacs, Versatile spectrometer for experiments using synchrotron radiation at wavelengths greater than 100 nm. *Nucl Instrum Methods*, 172, 1980, 195.

[Syage, 2001a] J. A. Syage, K. A. Hanold, M. D. Evans, S. M. Fischer, P. H. Cormia, Atmospheric pressure photoionization (APPI) for LC/MS. Dans *Proceedings of the 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, 2001*.

[Syage, 2001b] J. A. Syage, K. A. Hanold, M. D. Evans, Y. Liu, Atmospheric pressure photoionizer for mass spectrometry, Patent No. WO0197252, 2001.

[Syage, 2004a] J. A. Syage, Mechanism of $[M+H]^+$ formation in photoionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 2004, 1521.

[Syage, 2004b] J. A. Syage, K. A. Hanold, T. C. Lynn, J. A. Horner, R. A. Takhur, Atmospheric pressure photoionization II. Dual source ionization, *J. Chrom. A*, 1050, 2004, 137.

[Song, 2007] L. Song, A. D. Wellman, H. Yao, J. E. Bartmess, Negative ion atmospheric pressure photoionization : electron capture, dissociative electron capture, proton transfer and anion attachment, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 189, 2007, 1789.

[Starkey, 2006] J. A. Starkey, Y. Mechref, J. Muzikar, W. J. McBride, M. V. Novotny, Determination of salisolinol and related catecholamines through on-line preconcentration and liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 78, 2006, 3342.

[Streit, 2007] F. Streit, A. Dogan, L. Binder, M. Oellerich, Measurement of serum testosterone using a watters quattro premier XE Micromass (R) system with an APPI interface, *Clin. Chem.*, 53, 2007, A199.

T

[Takino, 2003a] M. Takino, S Daishima, T. Nakahara, Determination of perfluorooctane sulfonate in river water by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass

spectrometry by automated on-line extraction using turbulent flow chromatography, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, 383.

[Takino, 2003b] M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1011, 2003, 67.

[Takino, 2004a] M. Takino, K. Yamaguchi, T. Nakahara, Determination of carbamate pesticide in vegetables and fruits by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2004, 727.

[Takino, 2004b] M. Takino, T. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Nakahara, Atmospheric pressure photo-ionization liquid chromatography/mass spectrometric determination of aflatoxins in food, *Food Addit. Contam.*, 21, 2004, 76.

[Tannenbaum, 1975] H. P. [Tannenbaum](#), J. D. [Roberts](#), R. C. [Dougherty](#), Negative chemical ionization mass-spectrometry - chloride attachment spectra, *Anal. Chem.*, 47, 1975, 49.

[Tao, 2001] Y. Tao, Y. Huang, , H. J. Qian, , Y. N. Yan, , J. H. Xu, , H. W. Zheng, , Y. Sheng, , X. W. Li, D. M. Li, *High Energy Phys. NuC.* 25, 2001, 66.

[Theron, 2007] H. B. Theron, van der Merwe, K. J Swart, J. H. van der Westhuizen, Employing atmospheric pressure photoionization in liquid chromatography/tandem mass spectrometry to minimize ion suppression and matrix effects for the quantification of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2007, 1680.

[Theron, 2004] H. B. Theron, C. Coetzee, F. C. W. Sutherland, J. L. Wiesner, K. J. Swart, Selective and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of levonorgestrel in human plasma, *J. Chrom. B*, 813, 2004, 331.

[Tonidandel, 2008] L. Tonidandel, E. Ragazzi, G. Roghi, P. Traldi, Mass spectrometry in the characterization of ambers. I. Studies of amber samples of different origin and ages by laser desorption ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 2008, 630.

[Trosken, 2004] E. R. [Trosken](#), E. [Straube](#), W. K. [Lutz](#), W. [Volkel](#), C. [Patten](#), Quantitation of lanosterol and its major metabolite FF-MAS in an inhibition assay of CYP51 by azoles with atmospheric pressure photoionization based LC-MS/MS, *J. Am. Soc. Mass Spec.*, 15, 2004, 1016.

[Turnipseed, 2005] S. B. Turnipseed, J. E. Roybal, W. C. Andersen, L. R. Kuck, Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source, *Anal. Chim. Acta*, 529, 2005, 159.

V

[van Leeuwen, 2004] S. M. van Leeuwen, L. Hendriksen, U. Karst, Determination of aldehydes and ketones using derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine and liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1058, 2004, 107.

[Varga, 2006] M. Varga, T. Bartok, A. Mesterhazy, Determination of ergosterol in Fusarium-infected wheat by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1103, 2006, 278.

[Vestal, 1983] M. L. Vestal, Studies of ionization mechanisms involved in thermospray LC-MS, *Int. J. Mass Spec. Ion Processes*, 46, 1983, 193.

W

[Wang, 2005] G. F. Wang, Y. Hsieh, W. A. Korfmacher, Comparison of atmospheric pressure chemical ionization, electrospray ionization and atmospheric pressure Photoionization for the determination of cyclosporine A in rat plasma, *Anal. Chem.*, 77, 2005, 541.

[Watanabe, 1953] K. Watanabe, C. E. Y. Inn, M. Zelikoff, Absorption Coefficients of Water Vapor in the Vacuum Ultraviolet, *J. Chem. Phys.*, 21, 1953, 1026.

Y

[Yamamoto, 2006] A. Yamamoto, N. Kakutani, K. Yamamoto, T. Kamiura, H. Miyakoda, Steroid hormone profiles of urban and tidal rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization sources, *Environ. Sci. Technol.*, 40, 2006, 4132.

[Yang, 2002] C.M. Yang, J. Henion, Atmospheric pressure photoionization liquid chromatographic mass spectrometric determination of idoxifene and its metabolites in human plasma, *J. Chrom. A*, 970, 2002, 155.

[Yoshioka, 2004] N. Yoshioka, Y. Akiyama, K. Teranishi, Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography mass spectrometry using atmospheric pressure Photoionization, *J. Chrom. A*, 1022, 2004, 145.

Z

[Zavitsanos, 2003] P. Zavitsanos, Using the LC-atmospheric pressure ionization ion trap for the analysis of steroids in water, *Liquid Chromatography/mass spectrometry, MS/MS and time of flight MS*, 850, 2003, 207.

[Zhang, 2007] F. Zhang, W. T. Stott, A. J. Clark, M. R. Schisler, J. J. Grundy, B. Bhaskar Gollapudi, M. J. Bartels, Quantitation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by liquid

chromatography/positive atmospheric pressure Photoionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2007, 3949.

[Zheng, 2006] J. Zheng, S. A. Shamsi, Capillary electrochromatography coupled to atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for methylated benzo [a]pyrene isomers, *Anal. Chem.*, 78, 2006, 6921.

[Zöllner, 2006] P. Zöllner, B. Mayer-Helm, Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1136, 2006, 123.

Deuxième Partie

RESULTATS & DISCUSSIONS

Chapitre 3 :

LES ACETOGENINES D'ANNONACEAE

CHAPITRE 3 : LES ACETOGENINES D'ANNONACEAE

11. Introduction générale

1. Implication des acétogénines d'Annonaceae dans les parkinsonismes atypiques guadeloupéens

La maladie de Parkinson est une affection neurodégénérative dont un stigmate est la mort des neurones dopaminergiques de la substance noire, noyau situé à la base du cerveau, et qui sont impliqués dans le contrôle du mouvement [Parkinson, 1817]. Cette perte neuronale se traduit par un déficit de la dopamine, neurotransmetteur. Cette maladie se déclenche généralement entre 45 et 70 ans et peut-être d'origine génétique. C'est la deuxième maladie neurodégénérative, après la [maladie d'Alzheimer](#). Certains syndromes parkinsoniens sont distincts de la maladie de Parkinson idiopathique dont les symptômes sont les tremblements involontaires, avec une puissance musculaire amoindrie, avec une propension à se plier vers l'avant du tronc, et de passer d'une marche à un rythme de course: les sens et intelligences étant indemnes [Parkinson, 1917]. Le médicament utilisé pour diminuer les symptômes moteurs du parkinsonisme idiopathique est un précurseur de la dopamine du nom de lévodopa (*Schéma 1*). Le patient est soumis à différents symptômes moteurs tels que l'hypertonie musculaire, le tremblement des extrémités, l'akinésie (lenteur des mouvements) et des symptômes non-moteurs tels que la dysautonomie (trouble de la tension artérielle et tonicité traduits par des contractions musculaires), l'insomnie, la somnolence diurne, la fatigue, la douleur.



Schéma 1 : Représentation de la lévodopa

Le docteur Dominique Capparos-Lefèbvre en 1999 [Capparos-Lefèbvre, 1999], constata, en Guadeloupe, que 2/3 de ses patients parkinsoniens n'avaient pas la maladie de Parkinson idiopathique. Cependant la sémiologie (sciences des signes, symptômes et syndromes) permit d'observer que ces syndromes parkinsoniens atypiques chez les 2/3 des patients étaient réfractaires à la thérapeutique normalement prodiguée à un patient atteint de parkinsonisme idiopathique (contre 30% seulement de réfractaires en Europe). Une des caractéristiques de cette maladie atypique est que les patients atteints de ce « parkinsonisme guadeloupéen » meurent rapidement après diagnostic de la maladie. Ce parkinsonisme qui est une tauopathie diffère principalement du parkinsonisme idiopathique qui est une synucléinopathie par sa résistance à la lévodopa. Il s'avère que le pourcentage de malades souffrant de cette pathologie est quatre fois plus important que celui de la métropole.

Il existe deux phénotypes en Guadeloupe de parkinsonismes atypiques : la paralysie supranucléaire progressive guadeloupéenne (Gd-PSP) et le complexe de parkinsonisme-démence guadeloupéenne (Gd-PDC) [Lannuzel, 2007], [Apartis, 2008].

Le Gd-PSP est caractérisé par une instabilité posturale prématurée, un dysfonctionnement oculomoteur supranucléaire et le Gd-PDC par des démences fronto-sub-corticales mais sans aucun dysfonctionnement oculomoteur [Capparos-Lefèbvre, 2002, 2005]. Ces symptômes ont été observés non seulement en Guadeloupe mais aussi dans d'autres lieux comme entre autres la Martinique ou l'île de Guam (Pacifique) [Capparos-Lefèbvre, 2005], mais aucune épidémiologie n'a été effectuée jusqu'à présent.

Les docteurs Dominique Capparos-Lefèbvre et Annie Lannuzel [Brain, 2008] ont donc mené des études épidémiologiques, en Guadeloupe, qui ont indiqué l'implication de plantes de la famille des Annonaceae par intoxication chronique en particulier le corossolier ou *soursop*

(*Annona muricata*) [Capparos-Lefèbvre, 1999] [Höglinger, 2005]. L'Annonaceae est une famille tropicale de plantes à fleur archaïques souvent employées en médecine traditionnelle. Il existe des genres à fruits comestibles, cultivés.

b)

Figure 1 : Photographie a) d'un fruit du corossolier (ou corossol) et b) fruit de l'asiminier.

L'étude épidémiologique montre que l'ingestion quotidienne de ses feuilles sous forme de tisanes, utilisées en médecine traditionnelle, et de son fruit le corossol, apprécié pour ses qualités nutritionnelles, a un lien avec de l'apparition des Parkinsonismes atypiques, mais la causalité n'a pas encore été prouvée.

L'équipe du laboratoire BioCIS (Biomolécules, Conception, Isolement, Synthèse, Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, France), l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN et les experts en Neurologie de Marbourg ont prouvé que les acétogénines [Escobar, 2007], des molécules caractéristiques de cette famille de la plante du corossolier (*Annona muricata*), (**Figure 1**) seraient, entre autres, liés cette maladie [Champy, 2004]. Il a été de même détecté des acétogénines dans l'asiminier (ou *paw-paw*) cultivé en Amérique du Nord (*Asimina triloba*) [Pomper, 2009] (**Figure 1**). En effet les acétogénines sont des marqueurs chimiotaxonomiques identifiés dans 13 genres de la famille Annonaceae. L'AFSSA, (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) en raison de l'impact potentiel des acétogénines et les risques liés à la consommation de corossol sur la Santé Publique, a fait une saisine auprès du Dr. Reynald Hoquemiller du laboratoire de Pharmacognosie de Châtenay-Malabry. Son équipe a écarté l'hypothèse des pesticides comme cause des dérèglements nerveux

facteurs de cette maladie. Ils ont en revanche démontré la présence de ces molécules dans le fruit [Champy, 2005] et leur pouvoir délétère sur les cellules du cerveau chez les rats [Champy, 2004] et les humains confirmant que les acétogénines, seraient, entre autres, les agents responsables des troubles à l'origine de la maladie. C'est l'annonacine, l'acétogénine commune à la famille Annonaceae et majoritaire dans l'*Annona Muricata*, ainsi que des analogues qui ont fait l'objet de la majorité des travaux neurotoxicologiques et ont permis de mettre en évidence leur activité neurotoxique dans plusieurs paradigmes *in vitro* [Escobar Khondiker, 2007], [Lannuzel, 2003], [Höllerhage, 2009], et *in vivo*, en lien avec la protéine Tau [Champy, 2004], [Yamada, 2009].

Les acétogénines des Annonaceae ont des propriétés antihelminthique (contre les parasites intestinaux), cytotoxique et antitumorale, antimicrobienne, antipaludique, antiparasitaire, antiprotozoaire, immunosuppressive, et sont une source de modèles pour des médicaments potentiellement anticancéreux et de pesticides.

Cependant des sociétés américaines commercialisent des produits alimentaires contenant ces acétogénines. Ces compléments alimentaires, à partir de la capacité de déplétion de la molécule sur les cellules tumorales, sont utilisés comme prévention en tant qu'anti-cancéreux et anti-oxydant [McLaughlin, 2008]. En effet ces composés sont de puissants inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (NADH ubiquinone oxydo-reductase, ce qui leur délivre un certain pouvoir anti-tumoral. Cette étape bloquée, le transfert de l'électron du [NADH](#) au centre Fe-S et l'ubiquinone n'est possible et donc il est impossible de créer par la suite des molécules d'ATP. Sans ATP, la cellule ne peut vivre (nécrose) [Schapira, 2010].

L'étude de cette implication « acétogénine-parkinsonisme atypique » devient donc un enjeu majeur dans les questions de santé publique mondiale et économique quand on sait que cette plante se situe dans de nombreux pays sub- et pantropicaux et qu'elle est importée avec

facilité sur le reste du globe grâce à la mondialisation pour sa consommation en tant que fruit ou en tant que médicament par prévention de tumeurs. Sa consommation quotidienne à travers les compléments alimentaires, en plus de la consommation habituelle du fruit, pourrait, malheureusement, avoir ainsi un impact phénoménal et supérieur à celui estimé sur la croissance des malades à travers le monde.

Le but de ce travail s'inscrit donc dans la saisine dont a eu recours l'AFFSA. L'intérêt des analyses MS est de déterminer la structure de nouveaux analogues de l'annonacine. Pour cela il faut définir l'outil le plus à même de prodiguer une détection rapide, simple et précise des acétogénines en faible quantité lors d'une application potentielle à la dérégulation d'extraits complexes [Champy, 2009].

2. Elucidation structurale des acétogénines

Les acétogénines *Annonaceae* ont été découvertes par Jolad *et al.* en 1982 [Jolad, 1982]. Ces molécules sont des dérivés d'acides gras comportant une longue chaîne alkyle de 32 à 34 atomes de carbone, des groupements fonctionnels tels que des cycles tétrahydrofuraniques au nombre de 0 à 3, des fonctions époxyde, hydroxyle ou des insaturations. Cette longue chaîne est terminée à une extrémité par un méthyle et à l'autre extrémité par une γ -méthyl- γ -lactone. Il existe également différents sous-types de lactones (**Tableau 1**). Au final plus de 500 acétogénines ont été découvertes et ont été listées par Zafra-Polo *et al.* [Zafra-Polo, 1996], [Bermejo, 2005], [Liaw, 2010] et répertoriées plus amplement dans un ouvrage par Cavé *et al.* [Cavé, 1997].

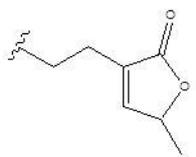
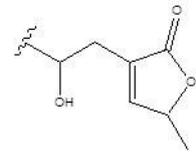
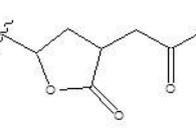
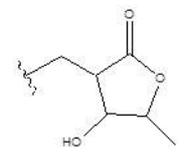
Méthyl-lactone	Représentation	Nom
Sous-type 1a		γ -méthyl- γ -lactone
Sous-type 1b		β -méthyl- γ -méthyl- γ -lactone
Sous-type 2		γ -lactone substituée par un groupement acetyl
Sous-type 3		β -hydroxy- γ -méthyl- γ -lactone

Tableau 1 : Sous-types de la méthyl-lactone actuellement répertoriée pour les acétogénines de type Annonaceae d'après [Bermejo, 2005].

Actuellement l'élucidation structurale des acétogénines se fait par trois principaux moyens :

- La RMN qui permet de déterminer le squelette complet de la molécule et sa stéréochimie, mais dont le désavantage est qu'il est nécessaire d'utiliser une grande quantité de produit (quelques milligrammes) ce qui est contraignant car l'extraction des acétogénines ne donne que peu de quantité dans le cas de certaines espèces. De plus les mélanges sont généralement complexes et comprennent de nombreux analogues difficilement résolubles et la localisation des fonctions hydroxyl le long de la chaîne alkyl reste généralement ambiguë [Alali, 1999], [Laprévôte, 1990, 1992 et 1994], [Gleye, 1997 et 2001], [Chen, 1996].

- La spectrométrie de masse avec l'Impact Electronique (IE) et l'Ionisation Chimique (IC), [Cortes, 1991], [Ratnayake, 1994], mais ces techniques nécessitent de dériver (silylation, acétylation) la molécule, ce que nous cherchons à éviter puisque le but est justement de positionner les fonctions hydroxyles. De plus, les spectres d'impact électronique obtenus sont particulièrement complexes à traiter [Ratnayake, 1994].
- Une autre technique de spectrométrie de masse est la Fast Atom Bombardment (FABMS) à balayages liés B/E constant. Il s'agit de soumettre un précurseur à un processus de dissociation induite par collision (CID) qui permet d'effectuer des collisions hautes énergies en couplant un analyseur de masse à secteur électrostatique-magnétique en balayant simultanément les secteurs B (magnétique) et E (électrostatique). Ceci permet d'obtenir de nombreuses fragmentations par charge piégée. Cette technique déploie une bonne sensibilité et permet d'analyser de nombreux composés, même en mélange donné. Le processus majoritaire dans ce cas est la protonation, mais l'intérêt de cette technique est que l'association de composés étudiés avec des sels de métaux alcalins comme le lithium génère des espèces cationisées $[M+Li]^+$ abondantes. Cet appareil a été utilisé largement pour l'étude des acétogénines dans les années 1990 par le professeur Olivier Laprévote [Laprévote, 1990, 1992 et 1994]. Mais ce spectromètre de masse est de moins en moins utilisé de nos jours.

Pour toutes ces raisons, il est devenu nécessaire de développer des méthodes alternatives pour l'étude des acétogénines afin d'obtenir des fragments diagnostiques.

12. Etude des acétogénines

1. L'annonacine

Le but de l'étude a donc porté sur la recherche de la meilleure méthode alternative en spectrométrie de masse en tandem pour élucider la structure d'acétogénines en comparant 4 appareils :

- l'ESI-LTQ-Orbitrap (basse énergie de collision < 200 eV),
- le MALDI ToF-ToF (haute énergie de collision > 1 keV et basse énergie de collision < 200 eV),
- l'ESI- Q-Star (basse énergie de collision < 200 eV)
- l'APPI-Q-Star (basse énergie de collision < 200 eV)

L'acétogénine modèle qui a été utilisée est l'annonacine, qui comporte 35 atomes de carbone, 1 groupement fonctionnel tétrahydrofurane (THF), 4 groupements hydroxyl (OH) et 1 méthyl- γ -lactone de sous-type 1b à l'une de ses extrémités comme présenté ci-dessous dans le **Schéma 2**.



Schéma 2 : Représentation linéaire de l'annonacine.

2. Les 7 autres acétogénines

Après avoir comparé les résultats avec l'annonacine et lorsque la ou les meilleures techniques auront été déterminées, la comparaison se poursuivra avec sept autres acétogénines possédant d'autres groupements fonctionnels. Le but est de confirmer que ces techniques seront utilisables également avec d'autres groupements fonctionnels qui peuvent être constitutifs des acétogénines. Le **Tableau 2** ci-dessous regroupe les informations nécessaires pour l'investigation structurale de ces acétogénines.

Composés	Formule Brute	Masse Monoisotopique	Structure
Annonacine	$C_{35}H_{64}O_7$	596,4652 Da	
Annonacinone	$C_{35}H_{62}O_7$	594,4495 Da	
<i>cis-</i> et <i>trans-</i> Isoannonacine	$C_{35}H_{64}O_7$	596,4652 Da	
Désacétyl- uvaricine	$C_{35}H_{62}O_6$	606,4859 Da	
Narumicine-2	$C_{37}H_{66}O_7$	622,4808 Da	
Squamocine	$C_{35}H_{66}O_7$	622,4808 Da	
Montécristine	$C_{37}H_{66}O_4$	574,4961 Da	
Diépomuricanine	$C_{35}H_{62}O_4$	546,4648 Da	

Tableau 2: Liste des huit acétogénines utilisées lors de l'étude comparative des quatre spectromètres de masse.

3. La nomenclature

L'identification des ions fragments de toutes les acétogénines qui ont été étudiées est basée sur la nomenclature proposée par Laprévote et Das [Laprévote, 1994] (schéma 3). Les ions A, B et C contiennent la γ -méthyl γ -lactone alors que les ions de type X, Y et Z comprennent le méthyl terminal. Les ions A et X représentent les ions formés par un clivage en alpha d'un groupement hydroxyl et contiennent l'atome d'oxygène de cette fonction. Les ions B et Y sont générés par une fragmentation à travers un cycle THF et retiennent une partie de celui-ci. Les ions C et Z sont produits par clivages en alpha du cycle THF. Des indices sont ajoutés afin de distinguer les différents ions appartenant à la même série. Par exemple, X₁ correspond au fragment produit par clivage en alpha du premier groupement hydroxyl en partant du méthyl terminal et ainsi de suite, jusqu'au X₄ (pour l'annonacine). Il faut ajouter que les séries A, B, C, X, Y, Z sont suffisantes pour l'identification et la localisation des groupements fonctionnels sur la chaîne alkyl, les autres fragments obtenus le long de la chaîne sont redondants bien qu'ils permettent de confirmer la structure.

A₄
C₁
B₁
A₃
X₁
Y₁
Z₁
X₂
A₂
A₁
X₃
X₄

Schéma 3 : Schéma de l'annonacine comportant les fragments caractéristiques illustrant la nomenclature proposée par Laprèvote et Das [Laprèvote, 1994].

13. Comparaison des spectromètres de masse par l'étude structurale de l'annonacine

Les expériences menées par le Professeur Olivier Laprèvote *et al.* dans les années 1990 avec le FABMS [Laprèvote, 1992 et 1994], [Roblot, 1993] [Gleye, 1997 et 1998], grâce à l'ajout de sel de lithium (chlorure de lithium LiCl), avait permis d'obtenir des spectres informatifs. Un sel de lithium (iodure de lithium LiI) a donc été ajouté, à la solution contenant l'annonacine dans les expériences suivantes afin de comparer les résultats obtenus avec ceux des espèces protonées ou cationisées au sodium.

1. Etude de l'annonacine par ESI-LTQ-Orbitrap

1. Etude de l'annonacine en mode d'ionisation positif par ESI-LTQ-Orbitrap

Le spectromètre de masse LTQ XL Orbitrap (ThermoScientific, USA) a été utilisé avec une gamme de m/z 150 – 650 et une résolution de masse de 100 000. Le principal avantage de l'ESI-LTQ-Orbitrap est sa grande précision en masse (déviation standard en-dessous de 5 ppm) qui permet la détermination précise des masses et des compositions élémentaires des ions fragments. Les paramètres instrumentaux ont été optimisés dans le but d'atteindre la meilleure sensibilité. Les paramètres d'énergie de collision ont été choisis dans la gamme de 0 à 130 (unité arbitraire) et l'influence du temps d'activation a été étudiée entre 10 et 5 000 ms pour chacune des valeurs d'énergie (**Tableau 3**). Dans la trappe LTQ on parle de CID car il s'agit d'une unité arbitraire, le calcul de l'énergie de collision est un calcul relatif, le contrôle se base sur un ratio d'ions fragments provenant d'un étalon.

GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1	MCP
50	20	25	400	3	1200	20	100	15	2	2100

Quantité injectée :	20 μ L à 10^{-6} mol.L ⁻¹
Solvant LC :	H ₂ O ou MeOH à 200 μ L.min ⁻¹ (0,1% FA)
Dopants :	Aucun

Tableau 3: Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse de l'annonacine avec le LTQ-Orbitrap.

Le spectre de masse ESI de l'annonacine ainsi obtenu présente un pic majoritaire correspondant à l'espèce cationisée au sodium (m/z 619,4540 ; $\Delta_{m/z} = 0,6$ ppm) et un pic minoritaire correspondant à l'espèce protonée (m/z 597,4723 ; $\Delta_{m/z} = 0$ ppm) (**Figure 2**).



Figure 2 : Spectre de masse ESI-MS de l'annonacine enregistré avec le LTQ-Orbitrap.

Les dissociations induites par collision de l'espèce protonée conduisent à la perte de cinq molécules d'eau (**Figure 3**). Comme l'annonacine contient quatre groupements hydroxyl, le motif de fragmentation permet de supposer que la perte d'une molécule d'eau provient de la méthyl-lactone après ouverture de cycle sous condition acide (puisque présence de 0,1 % de FA, pH = 2-3). Ce type de fragmentation a été précédemment décrit à partir de molécules protonées possédant une lactone à cinq chaînons [Crotti, 2004] et [Asensio, 2000]. La perte compétitive de CO qui a été rapportée pour des lactones à 5 chaînons n'a pas été observée dans le cas des acétogénines.



Figure 3 : Spectre de masse ESI-MS/MS (CID = 50 u.a. et temps d'activation = 33 ms) de l'annonacine protonée ($[M+H]^+$) enregistré avec le LTQ-Orbitrap.

Les expériences CID à basse énergie de collision sur les espèces cationisées au sodium mènent à l'obtention de deux pics structurellement intéressants (**Figure 4**) : le pic correspondant à l'ion fragment majoritaire X_4 (m/z 507,4011 ; $\Delta_{m/z} = 1,7$ ppm) et le pic correspondant à l'ion fragment X_3 (m/z 407,3130 ; $\Delta_{m/z} = 1,7$ ppm). Aucun autre ion caractéristique n'a été identifié, ce qui n'a pas permis de déterminer la position des autres fonctions hydroxyl et du groupement THF.

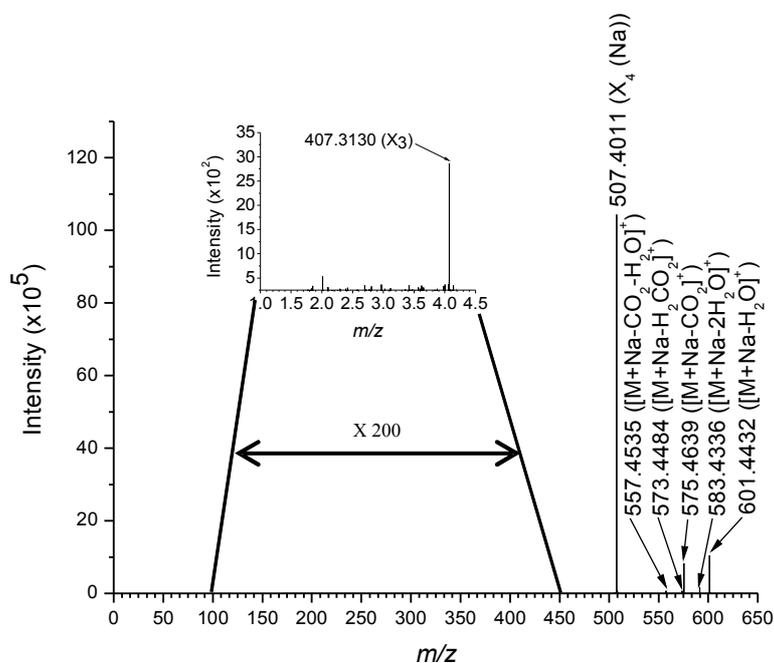


Figure 4 : Spectre de masse ESI-MS/MS (CID = 50 et temps d'activation = 33 ms) de l'annonacine cationisée au sodium ($[M+Na]^+$) enregistré avec le LTQ-Orbitrap.

2. Etude de l'annonacine avec sel de lithium par ESI-LTQ-Orbitrap

Comme les expériences CID sur les ions $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ n'ont donné que des informations partielles, de l'iodure de lithium a été ajouté à la solution contenant l'analyte (**Figure 5a**).



Figure 5a : Spectre de masse ESI-MS de l'annonacine avec un sel de lithium ajouté enregistré avec le LTQ-Orbitrap.

Le spectre MS/MS de l'ion $[M+Li]^+$ montre le signal des ions fragments cationisés au lithium X_2 , X_3 et X_4 respectivement à m/z 305,2661 ($\Delta_{m/z} = 0,7$ ppm), m/z 391,3393 ($\Delta_{m/z} = 0,3$ ppm) et m/z 491,4275 ($\Delta_{m/z} = 1,2$ ppm) ainsi que les signaux des ions complémentaires A_2 (m/z 247,1878 ; $\Delta_{m/z} = 0,9$ ppm) et les fragments A_3 ayant subi deux pertes successives d'eau ($[A_3+(Li)-H_2O]^+$) à m/z 315,2502 ($\Delta_{m/z} = 1,3$ ppm) et ($[A_3+(Li)-2H_2O]^+$) à m/z 297,2399 ($\Delta_{m/z} = 0,3$ ppm). Les pics des ions fragments A_4 et X_1 attendus à partir des clivages autour de la position C-20 n'ont pas été détectés. Ces séries d'ions fragments complémentaires A et X permettent la localisation aux positions C-4, C-10 et C-15 de trois des quatre groupements hydroxyl présents sur la chaîne (**Figure 5b**) et (**Schéma 4**). Ces ions ont été observables grâce à un zoom d'un facteur de 200 sur le spectre. Un récapitulatif de la formation des ions fragments générés est présenté dans le **Schéma 5**.

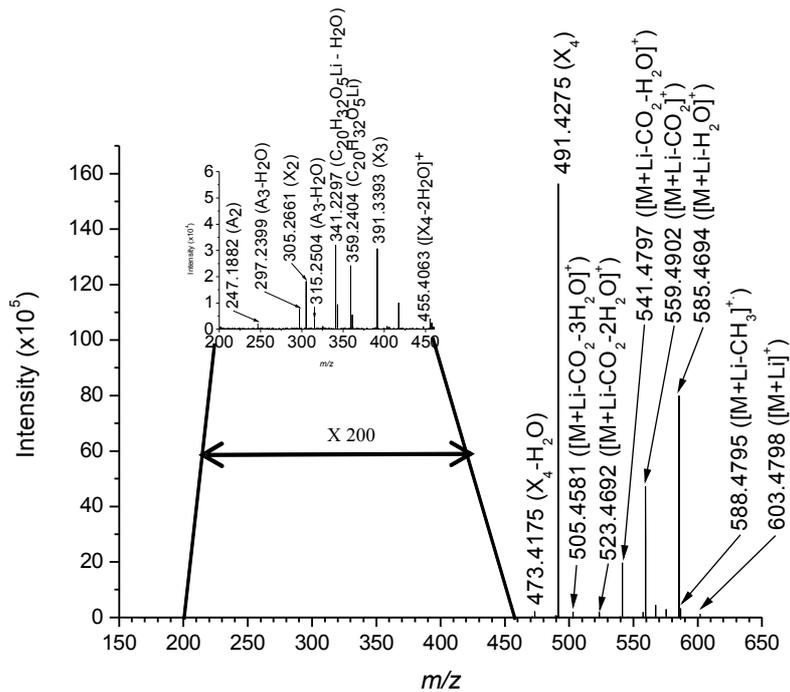


Figure 5b : Spectre de masse ESI-MS/MS (CID = 50 et temps d'activation = 33 ms) de l'annonacine cationisée au lithium ($[M+Li]^+$) avec le LTQ-Orbitrap.

Le pic à m/z 588,4795 correspond à la perte du radical méthyl ($[M+Li-CH_3]^+$; $\Delta_{m/z} = 0,8$ ppm) à partir de l'espèce cationisée au lithium et confirme que la fonction lactone est de sous-type 1 [Fang, 1993] (*Schéma 6*).

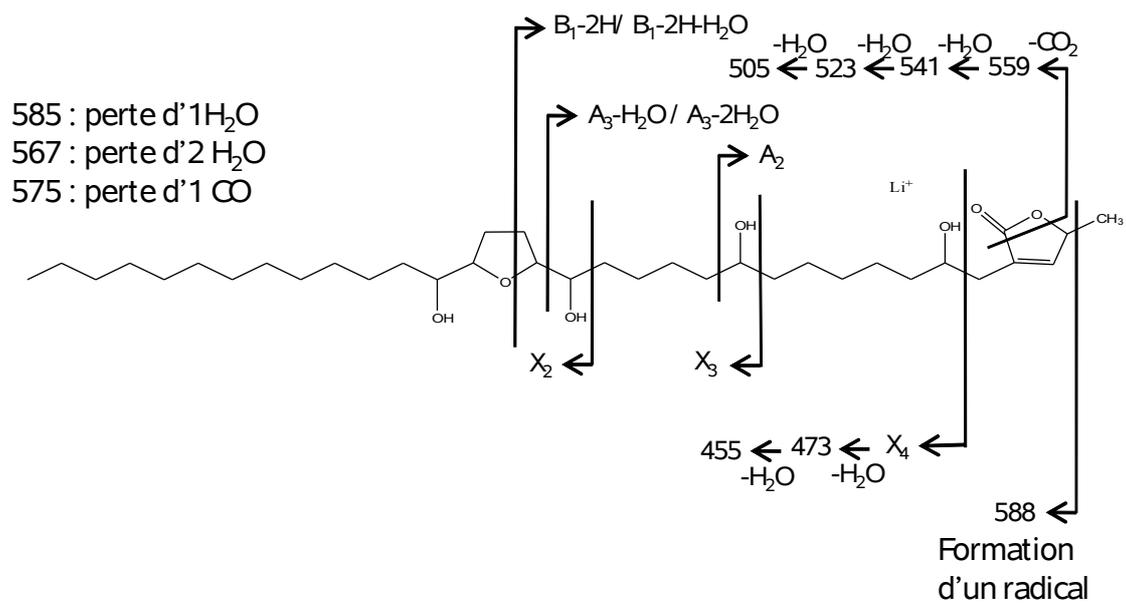
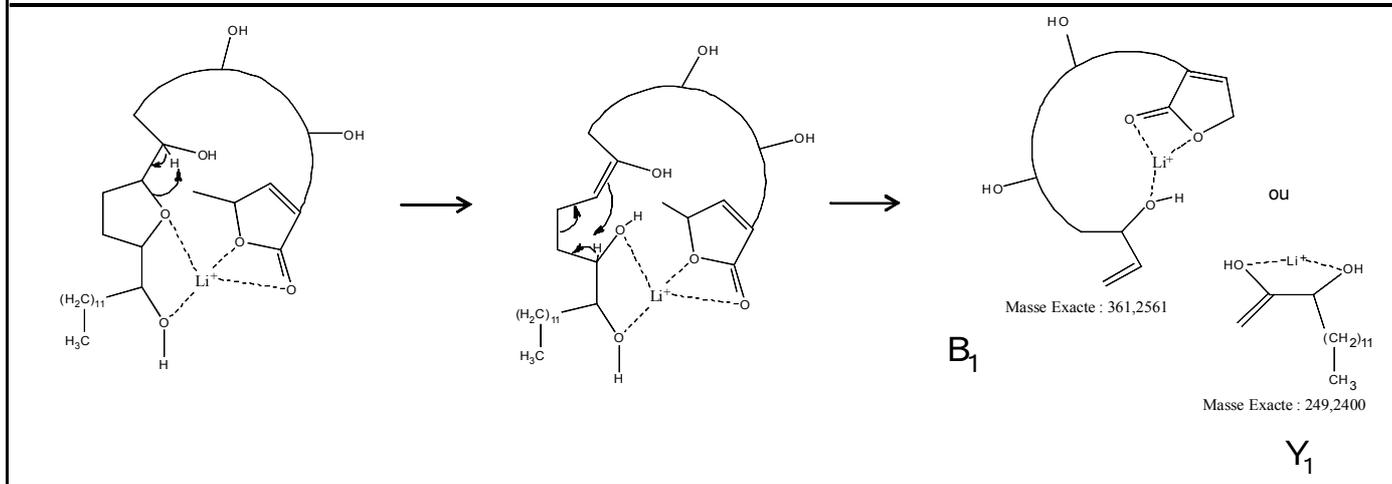
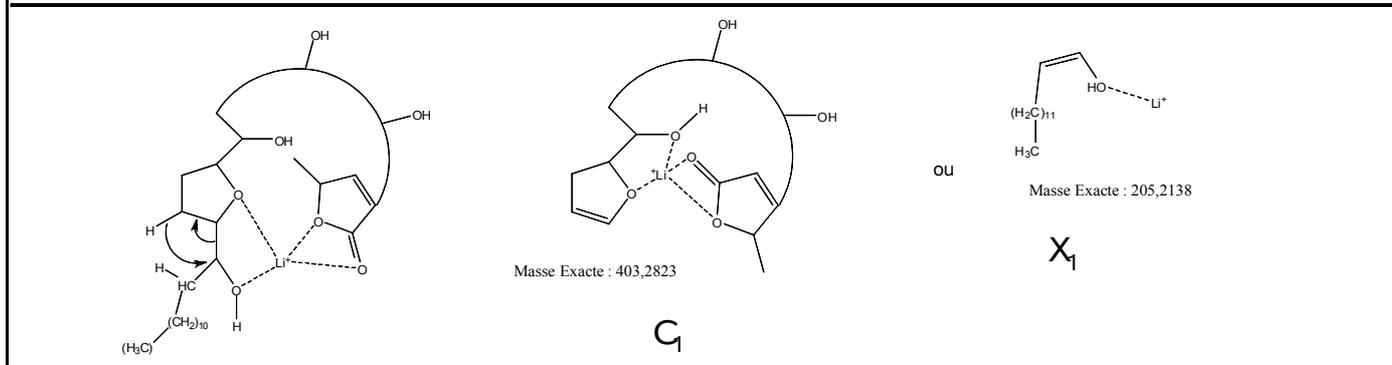
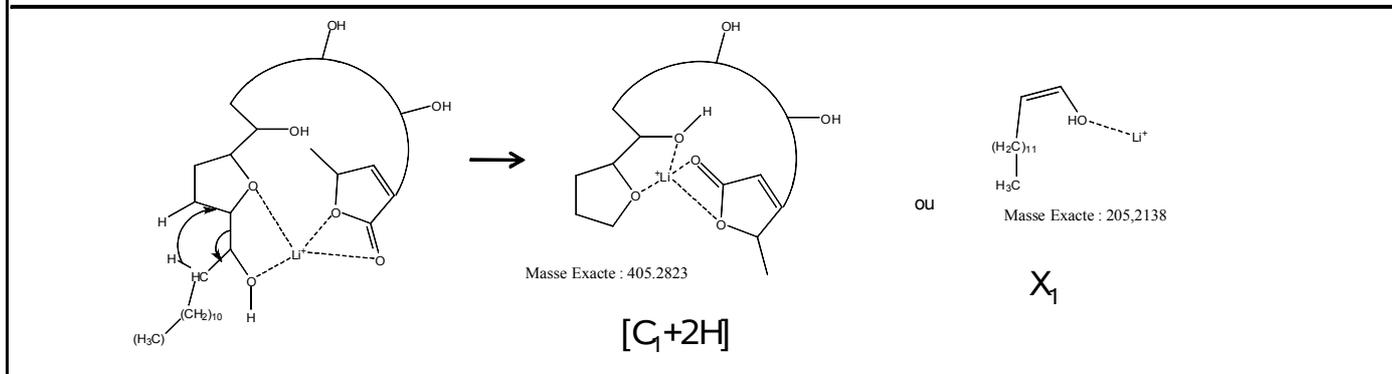
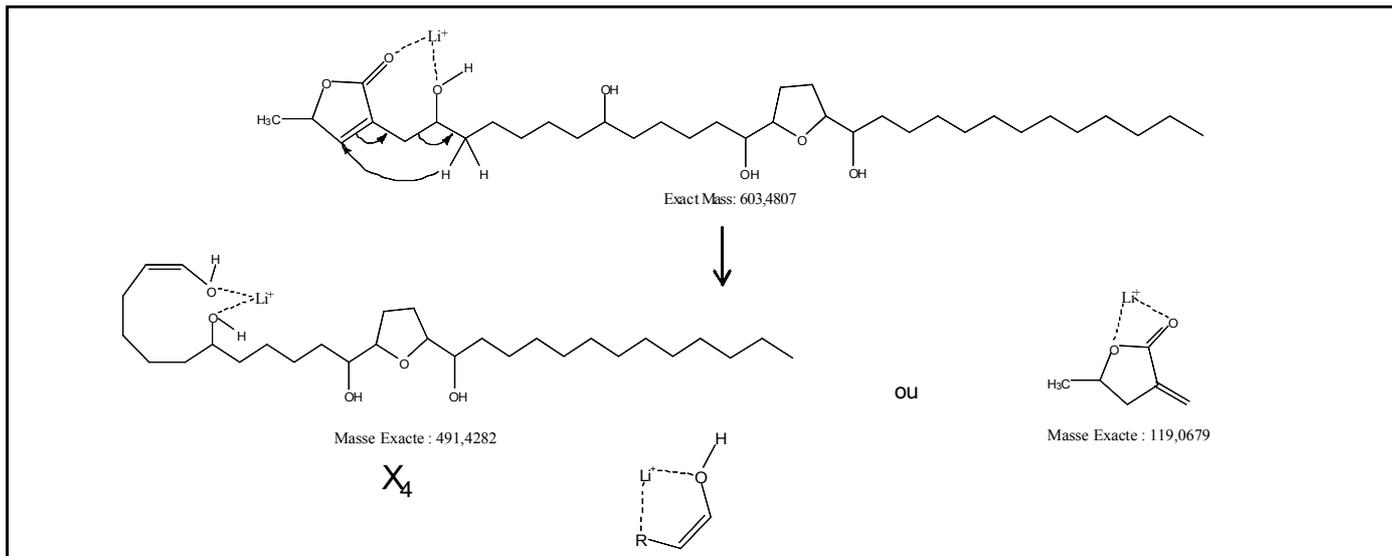


Schéma 4 : Principaux fragments formés lors d'une expérience ESI-MS/MS sur l'ion m/z 603,4 $[M+Li]^+$ de l'annonacine.



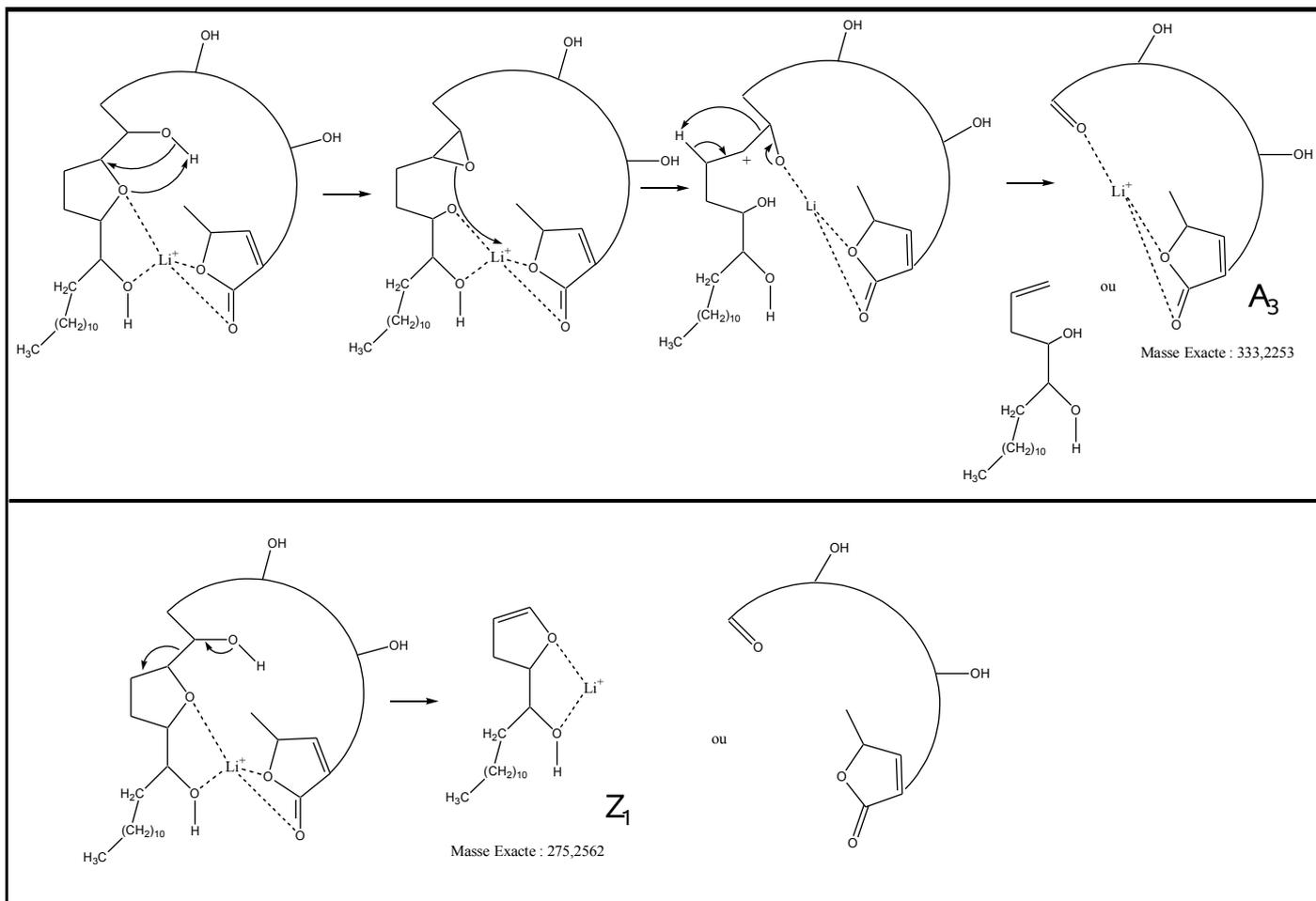


Schéma 5 : Schéma de fragmentation des principaux ions formés lors d'expériences CID (basse énergie de collision) sur l'ion $[M+Li]^+$ de l'annonacine.



Schéma 6 : Mécanisme proposé pour la perte du radical méthyle à partir de l'annonacine cationisée au lithium.

3. Etude de l'annonacine en mode d'ionisation négative par ESI-LTQ-Orbitrap

Le spectre MS permet d'observer un signal à m/z 595,4550 ($\Delta_{m/z} = 4,8$ ppm) correspondant à l'annonacine déprotonée avec un faible rapport signal-sur-bruit comparé au mode d'ionisation positive (**Figure 6**). Les expériences ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles faites pour le mode positif (**Tableau 3**).



Figure 6 : Spectre de masse MS de l'annonacine en mode d'ionisation négatif avec le LTQ-Orbitrap.

Le spectre de masse MS/MS de l'annonacine déprotonée présente des pics correspondants aux ions fragments X_3 et X_4 respectivement à m/z 383,3145 ($\Delta_{m/z} = 5,7$ ppm) et m/z 483,4029 ($\Delta_{m/z} = 1,9$ ppm), ainsi que le pic à m/z 197,1902 ($\Delta_{m/z} = 4,0$ ppm) correspondant au fragment X_1 (**Figure 7**). Ce dernier ion fragment permet de localiser un groupement hydroxyl en C-20, l'information qui est manquante en mode d'ionisation positif.

Cependant, en comparaison avec le mode d'ionisation positif, aucun pic correspondant à l'ion fragment du groupement hydroxyl en C-15 n'a été identifié (**Figure 7**). C'est pourquoi il est important de noter que les spectres MS/MS en modes négatif et positif enregistrés en ESI-LTQ-Orbitrap sont complémentaires et nécessaires pour une élucidation structurale complète.



Figure 7 : Spectre de masse ESI-MS/MS (CID = 50 et Activation Time = 33 ms) de l'annonacine déprotonée ($[M-H]^-$) avec le LTQ-Orbitrap.

Conclusion

Malgré une fragmentation informative exclusivement au niveau des groupements fonctionnels, l'ESI offre une bonne sensibilité et pourrait être utilisée comme première approche structurale dans le cas d'échantillon à faible concentration.

2. Etude de l'annonacine par MALDI-ToF-ToF

1. Etude de l'annonacine en mode d'ionisation positif par MALDI ToF-ToF

Dans ce paragraphe, les expériences ont été menées en utilisant un spectromètre de masse 4800 MALDI ToF-ToF (AB Sciex, les Ulis, France). L'avantage de ce spectromètre sur l'ESI-LTQ-Orbitrap est la haute énergie en collision accessible pour les expériences MS/MS (1 ou 2 keV). Tous les analytes ont été déposés sur une plaque en acier inoxydable de 384 puits. L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), largement utilisé pour la détection des acides gras et lipides a été la matrice de choix [Müller, 2001], [Champy, 2009].

Plusieurs compositions ont été testées :

- MeOH/CHCl₃ (1 / 1, v / v) qui donne un dépôt homogène
- MeOH/H₂O (1 / 1, v / v) qui donne des cristaux sur les bords du puits avec une zone amorphe centrale plus riche en sels et où il est nécessaire d'utiliser une puissance de laser particulièrement élevée (environ 5000 u. a.).

Aussi comme nous avons besoin de comparer les spectres entre eux il est préférable de retenir la matrice qui cristallise de la façon la plus homogène. Les spectres obtenus à l'aide de la matrice DHB dans le solvant MeOH/ CHCl₃ (1 / 1, v / v) présentant des pics particulièrement intenses et donc facilement traitables dès les premières expériences, nous avons utilisé cette matrice pour toutes les expériences en mode positif.

En mode négatif, il s'est avéré que l'espèce déprotonée n'était pas détectable avec la DHB, ainsi d'autres matrices telles que la 9 aminoacryamide ou la 2, 4, 6 – trihydroxyacetophénone

(THAP) dans deux solvants différents MeOH/CHCl₃ (1 / 1, v / v) et MeOH/H₂O (1 / 1, v / v) ont été testées, sans succès apparent. Aucune expérience en mode négatif n'a donc été poursuivie.

Les molécules cationisées au sodium et potassium ont été directement détectées à partir de la solution stock (**Tableau 5**) (2mg/mL dans le MeOH).

Premièrement, une étude des fragmentations sans gaz de collision a été effectuée (*CID off*) en utilisant trois valeurs d'intensité de laser (4000, 4500, 5500 u.a. pour une échelle allant de 400 à 7900 u.a). Chaque spectre enregistré est une moyenne de trois spectres de 1500 tirs laser. En mode *CID on*, les spectres sont obtenus en utilisant de l'air ou de l'argon (*CID on*) comme gaz de collision et en faisant varier les intensités de laser comme décrit ci-dessus. La pression de gaz est ajustée à 1, 2, 3 ou 4 x 10⁻⁶ hPa. De plus, l'énergie de collision a été fixée à 1 puis 2 keV. La meilleure sensibilité a été obtenue avec une intensité de laser fixée à 4500 u.a en mode *CID on* avec l'argon comme gaz de collision et une énergie de collision de 2 keV, ainsi uniquement ces spectres seront montrés.

Volume déposée :	1 µL
Matrice :	DHB
Solution matrice:	20 mg/mL CHCl ₃ / MeOH (1/1 v/v)
Concentration de l'échantillon :	2 mg/mL MeOH

Tableau 5 : Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par le MALDI ToF-ToF de l'annonacine.

Le spectre de masse de l'annonacine présente l'ion majoritaire ($[M+Na]^+$) et à plus faible intensité les espèces protonées et cationisées au potassium (**Figure 8**).



Figure 8 : Spectre de masse MALDI-MS de l'annonacine (intensité de laser = 4500).

Les dissociations induites par collision de l'ion $[M+Na]^+$ produisent un intense fragment Na^+ à m/z 23 (**Figure 9**) et des signaux correspondants à quelques fragmentations (A_2 , B_1 et X_4) du squelette de la molécule. Malgré cela le spectre reste peu informatif.



Figure 9 : Spectre de masse MALDI-MS/MS de l'annonacine cationisée au sodium ($[M+Na]^+$) (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

2. Etude de l'annonacine cationisé au lithium par MALDI ToF-ToF

Volume déposée :	1 μ L
Matrice :	DHB
Solution matrice:	20 mg/mL CHCl ₃ / MeOH (1/1 v/v)
Concentration de l'échantillon :	2 mg/mL MeOH
Concentration de LiI :	1 mg/mL dans la matrice DHB

Tableau 6 : Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par le MALDI ToF-ToF de l'annonacine.

Du sel de lithium a été ajouté à l'échantillon afin de générer une grande quantité d'ions $[M+Li]^+$. Les conditions de préparation sont décrites dans le **Tableau 6** et le spectre MS présenté à la **Figure 10**.



Figure 10 : Spectre MALDI-MS d'une solution d'annonacine après ajout d'un sel de lithium (intensité de laser = 4500).

On notera que la distribution isotopique de l'ion $[M+Li]^+$ de la **Figure 10** est la même que la distribution isotopique théorique présentée dans la **Figure 11**.



Figure 11 : Distribution isotopique théorique de l'annonacine.

Le spectre de masse en mode *CID off*, de l'annonacine cationisée au lithium (**Figure 12**) montre l'ion majoritaire correspond au fragment X_4 (m/z 491). Une série de pics séparés de 14 u.m.a correspondant à la fragmentation à charge piégée [Tomer, 1983], [Adams, 1983], [Claeys, 1996] [Trimpin, 2007] a été observée au contraire du spectre ESI-MS/MS avec le LTQ-Orbitrap enregistré sous basse énergie de collision (**Figure 5**). Ces voies de dissociations sont en effet typiques des phénomènes de haute énergie comme précédemment décrits pour les acides [Tomer, 1983], [Clayes, 1996]. La fragmentation à charge piégée est un type de fragmentation de liaison covalente qui se produit en phase gazeuse sur un ion mais qui n'est pas adjacente à l'emplacement de la charge [Gross, 2000], [Cheng, 2000].

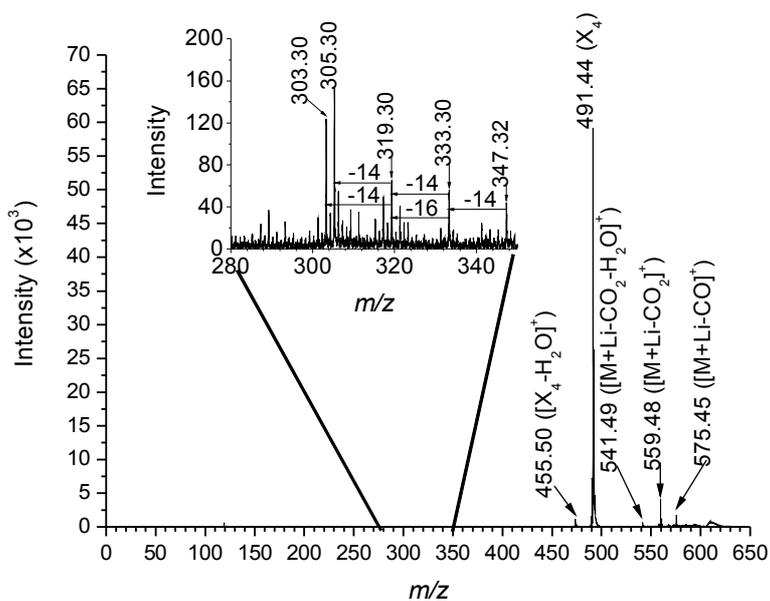


Figure 12 : Spectre de masse MS/MS de l'annonacine cationisée au lithium ($[M+Li]^+$) en mode *CID off*.

En mode *CID on* avec l'argon ou l'air, le spectre MS/MS apparaît plus riche (**Figure 13**). La présence des fragments appartenant à la série X et A permet la détermination non équivoque de la position de quatre groupements hydroxyl. Aucune différence notable n'est observée dans le schéma de fragmentation en comparant les deux gaz de collision.

D'autres ions fragments de type C_1 (m/z 403/405), Z_1 (m/z 273) et Y_1 (m/z 233/235) non observés par ESI-MS/MS permettent de localiser le cycle THF (**Schéma 7**). De plus, un ion fragment à m/z 119 complémentaire à l'ion fragment X_4 est détecté en utilisant les deux modes *CID off* et *CID on*. Finalement, un ion radical méthyl-lactone de rapport masse-surcharge m/z 118 est détecté et s'explique par une voie de dissociation homolytique (**Schéma 8**).



Figure 13 : Spectre de masse MALDI-MS/MS de l'annonacine cationisée au lithium ($[M+Li]^+$), en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

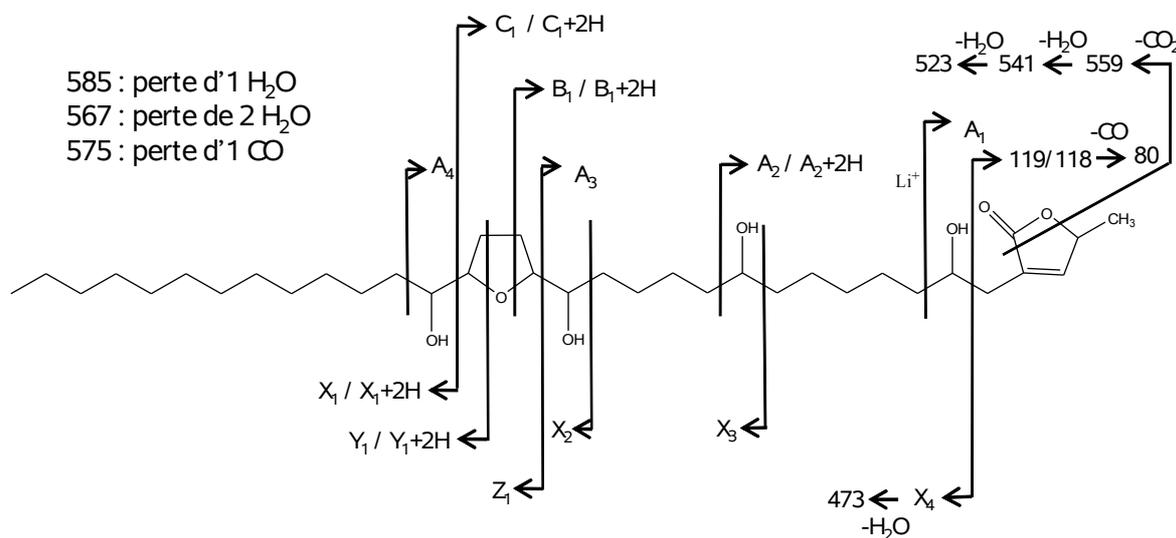


Schéma 7 : Principaux fragments formés lors d'une expérience MALDI-MS/MS sur l'ion à m/z 603, 4 $[M+Li]^+$ de l'annonacine en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).



Schéma 8 : Mécanisme proposé pour la formation de l'ion à m/z 118.

Conclusion

Le MALDI ToF-ToF permet d'obtenir des résultats à partir d'un seul spectre MS/MS à haute énergie de collision au contraire de la technique utilisant l'ESI-LTQ-Orbitrap où il faut combiner le mode négatif et positif. Par ailleurs, le spectre MS/MS obtenu est plus riche en pics que ceux obtenus avec l'ESI-LTQ-Orbitrap (où seuls sont présents les fragments d'intérêt), ce qui permet d'avoir plusieurs confirmation de la structure de l'acétogénine.

Par contre, la quantité de composé utilisée avec la technique d'ionisation MALDI était 1000 fois plus élevée en annonacine qu'avec la technique d'ionisation ESI.

Par conséquent, si la quantité d'acétogénines est suffisante, la technique d'ionisation MALDI est plus adéquate pour ses spectres plus riches en pics et sa rapidité d'utilisation.

3. Etude de l'annonacine par ESI-Q-ToF

La même étude que celle effectuée sur l'Orbitrap (III. 1. a.) a été menée sur le Q-ToF afin de comparer les spectres d'ionisation ESI obtenus avec ces deux appareils.

1. Etude de l'annonacine en mode d'ionisation positif par ESI-Q-ToF

Volume injectée :	20 μL
Solvant LC :	$\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH}$ (1/1 v/v) + 0.1% FA
Débit du solvant :	1 $\mu\text{L}/\text{min}$
Concentration de l'échantillon :	20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ sans lithium

Tableau 7 : Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par l'ESI-Q-ToF lors de l'analyse de l'annonacine

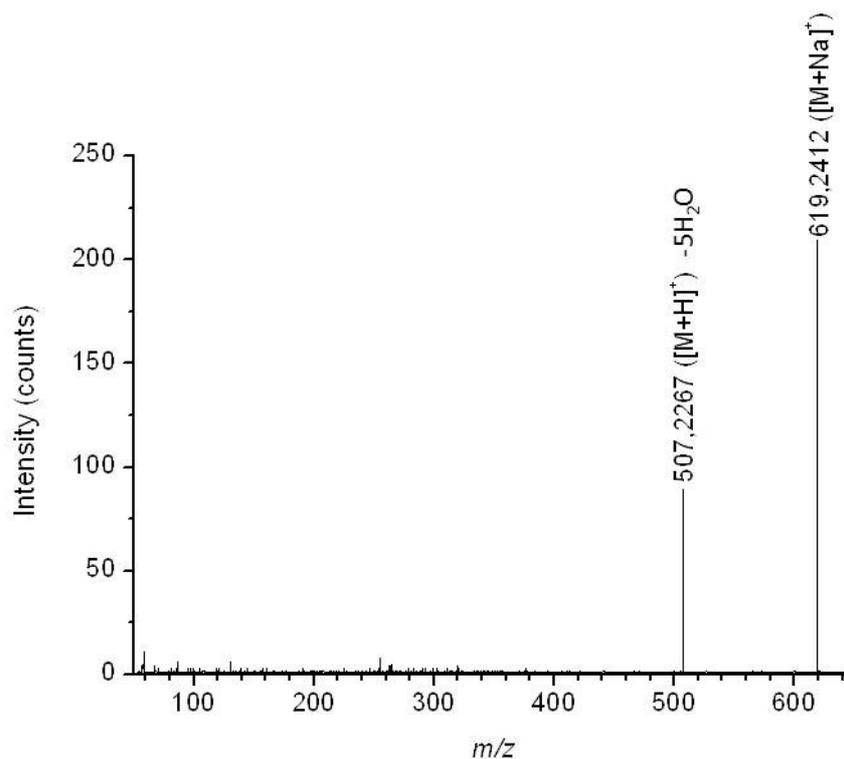


Figure 14 : Spectre de masse ESI-MS de l'annonacine dans $\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH}$ (1/1 ; v/v) à une concentration de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

La **Figure 14** présente un spectre comportant deux pics ; le signal d'un ion majoritaire $[M+Na]^+$ et le signal d'un ion minoritaire $[M+H]^+$. Aucun pic correspondant à des ions fragments d'intérêt assez intense n'a été obtenu avec cette technique sans ajout de lithium.

2. *Etude de l'annonacine avec sel de lithium par ESI-Q-ToF*

Volume injectée :	20 μ L
Solvant LC :	H ₂ O / MeOH (1/1 v/v) + 0.1% FA
Débit du solvant :	1 μ L/min
Concentration de l'échantillon :	20 ng/ μ L sans lithium 5 ng/ μ L avec lithium
Concentration du sel de lithium	100 ng/ μ L

Tableau 8 : Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par l'ESI-Q-ToF lors de l'analyse de l'annonacine.

L'unique différence réside dans l'apport de deux ions fragments supplémentaires dans le spectre ESI-Q-ToF entre le LTQ-Orbitrap et le Q-ToF; l'ion fragment A₃ m/z 338,2 et la perte d'H₂O à partir de l'ion fragment X₂ à m/z 229,1.

De plus, le zoom ici est d'un facteur 20 fois moins important que celui utilisé avec l'ESI-LTQ-Orbitrap.

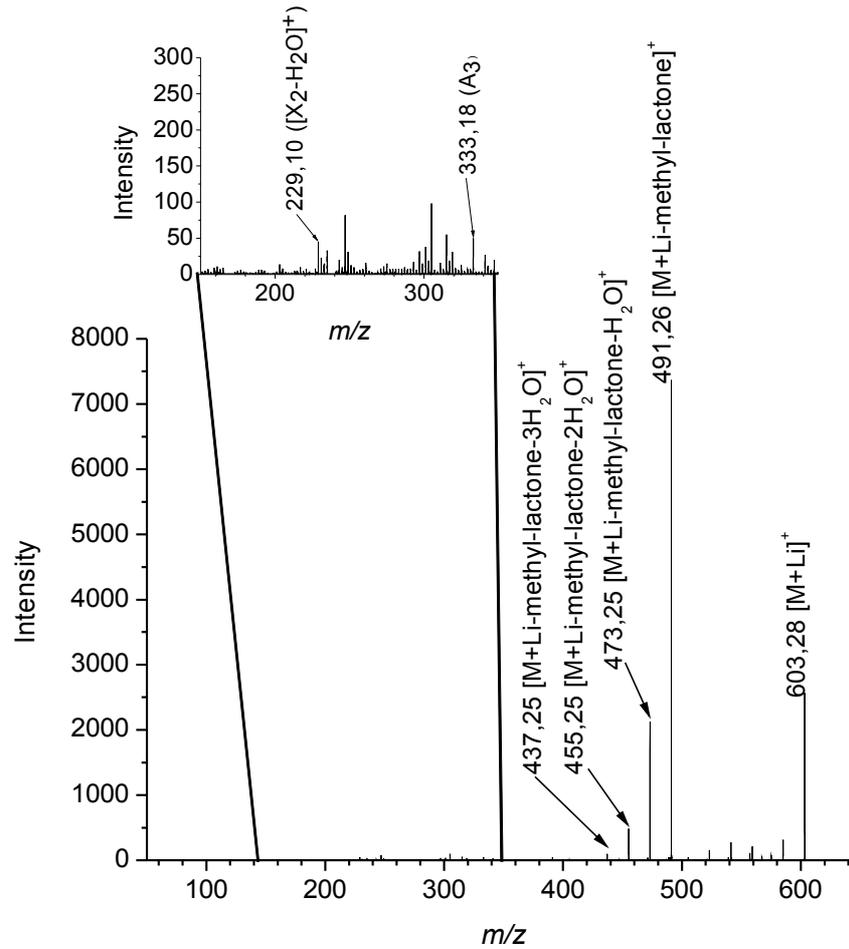


Figure 15 : Spectre de masse ESI-MS/MS de l'annonacine cationisée au lithium (m/z 603,28)

$[M+Li]^+$ à CE = 60 eV, enregistré dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) à une concentration de

5 ng/ μ L.

Conclusion

Les spectres de l'annonacine obtenus par ESI-Q-Star ont apporté peu d'informations structurales complémentaires par rapport à l'ESI-LTQ-Orbitrap mais les pics sont plus intenses d'un facteur 50.

4. Etude de l'annonacine par APPI-Q-Star

1. Etude de l'annonacine en mode d'ionisation positif par APPI-Q-ToF

Les expériences obtenues avec le Q-Star en ESI ne donnant aucune information structurale supplémentaire à celles obtenues avec l'ESI-LTQ-Orbitrap, les mêmes expériences ont été effectuées sur le Q-Star mais en utilisant la source APPI en injection directe (**Tableau 10**).

Volume injectée :	20 μ L
Solvant LC :	H ₂ O / MeOH (1/1 v/v) + 0.1% TFA
Débit du solvant :	120 μ L/min
Concentration de l'échantillon :	20 ng/ μ L sans lithium

GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1	MCP
50	20	25	300	3	1200	35	185	15	2	2100

Tableau 9 : Paramètres expérimentaux et instrumentaux de l'APPI-Q-Star utilisés lors de l'analyse de l'annonacine.

Les expériences menées ont été effectuées dans un premier temps sans l'aide de la lampe à décharge au Krypton (*lamp off*) puis dans un second temps à l'aide de la lampe à décharge (*lamp on*). Au contraire des expériences précédentes un simple spectre MS pour chacune des expériences a été enregistré dans le but d'obtenir des fragments d'intérêt.

Dans le spectre FIA-MS (Flow Injection Analysis) de l'annonacine sans ajout de lithium en mode *lamp off* (**Figure 16**) l'ion majoritaire est l'adduit au sodium avec présence de deux pertes d'H₂O à partir de l'espèce protonée [M+H]⁺ alors qu'en mode *lamp on* (**Figure 17**) l'ion majoritaire est l'espèce protonée avec quatre pertes successives d'H₂O (une perte d'H₂O

de moins que avec l'ESI-Q-Star). Ces quatre pertes successives d'eau semblent correspondre avec la présence des quatre hydroxyl répartis le long de la molécule.

La différence entre les spectres *lamp on* et *lamp off* pourrait s'expliquer par la réaction de photo-ionisation directe (réaction 1) avec formation du $M^{+\cdot}$ (m/z 596) non détecté puis capture du radical hydrogène (H^{\cdot}) (réaction 2) provenant vraisemblablement du solvant protique qu'est le méthanol comme Syage *et al.* l'ont expliqué en 2004 [Syage, 2004]. Syage *et al.* avaient également obtenu la formation efficace de MH^+ avec le solvant eau bien que ce solvant ait une énergie de liaison d'atome H relativement forte.



Cependant, aucune présence d'ion pseudo-moléculaire $M^{+\cdot}$ (m/z 596) dans le spectre de l'annonacine n'a été détectée, d'où l'hypothèse d'une photoionisation directe écartée. En effet, Syage *et al.* décrivent la dépendance de MH^+ et $M^{+\cdot}$ et du rapport $MH^+/M^{+\cdot}$ en fonction du solvant, lors de la photoionisation [Syage, 2004]. Une autre hypothèse pour la formation de l'ion MH^+ serait la photoionisation directe du solvant méthanol qui ainsi permettrait le transfert d'un proton à l'analyte [Kauppila, 2002]. Cependant, d'après le rapport des intensités entre les ions correspondant à la perte d' H_2O qui se trouve être de 1/10, ces pertes d' H_2O s'identifieraient donc à une perte thermique. Le processus mis en cause ici est donc vraisemblablement un processus thermospray.

Ces pertes successives de molécules d' H_2O permettent de conclure que l'APPI de l'annonacine n'apporte donc aucune information structurale pertinente.



Figure 16 : Spectre de masse APPI (FIAMS) de l'annonacine enregistrée dans le mélange

H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) + 0.1% TFA à 300°C la lampe éteinte (mode *lamp off*) à une

concentration de 25 ng/μL sans dopant.



Figure 17 : Spectre de masse APPI (FIAMS) de l'annonacine enregistrée dans le mélange

H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) + 0.1% TFA à 300°C avec la lampe allumée (mode *lamp on*) à une

concentration de 25 ng/μL sans dopant.

2. Etude de l'annonacine avec sel de lithium par APPI-Q-Star

Volume injectée :	20 μL
Solvant LC :	H ₂ O / MeOH (1/1 v/v) + 0.1% TFA
Débit du solvant :	120 μL/min
Concentration de l'échantillon :	20 ng/μL sans lithium 5 ng/μL avec lithium
Concentration du sel de lithium	20 ng/μL

Tableau 10: Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par l'APPI-Q-ToF lors de

l'analyse de l'annonacine.

Les expériences avec addition de sel de lithium débouchent sur les mêmes observations que celles sans lithium ; à part la présence supplémentaire de l'espèce cationisée au lithium [M+Li]⁺, les seuls ions fragments informatifs sont les pertes successives d'eau à partir de l'espèce cationisée au lithium.

En *lamp off* (**Figure 18**), l'ion majoritaire est l'ion $[M+Li]^+$ (m/z 603). Ici, les 2 pertes d' H_2O proviennent de l'espèce majoritaire donc de l'espèce cationisée au lithium.

En *lamp on* (**Figure 19**), c'est l'ion $[M+H]^+$ qui est majoritaire et est donc suivi jusqu'à 4 pertes d' H_2O $[M+H-4H_2O]^+$. Le reste des pics reste non identifiable et semble correspondre à des impuretés. Au contraire des expériences faites avec les précédentes méthodes, la technique ne permet pas d'obtenir des fragments structurellement intéressants.



Figure 18 : Spectre de masse APPI (FIAMS) de l'annonacine enregistrée dans le mélange $H_2O / MeOH$ (1/1 ; v/v) + 0.1% TFA à 300°C avec la lampe éteinte (mode *lamp off*) à une concentration de 5 ng/ μ L avec une solution de sel de lithium à 100 ng/ μ L sans dopant.



Figure 19 : Spectre de masse APPI (FIAMS) de l'annonacine enregistrée dans le mélange $H_2O / MeOH$ (1/1 ; v/v) + 0.1% TFA à 300°C avec la lampe allumée (mode *lamp on*) à une concentration de 5 ng/ μ L avec une solution de sel de lithium à 100 ng/ μ L sans dopant.

L'utilisation de dopants tels que le toluène a favorisé la formation de $[M+H]^+$ mais n'as pas eu de conséquence sur la formation de fragments supplémentaires.

Conclusion

A part la perte successive de molécules d'eau, cette technique d'analyse n'apporte aucune information structurale et donc dans le cas des acétogénines n'a pas d'intérêt.

5. Conclusion Générale

La première remarque porte sur l'évidence de l'apport important d'informations structurales lors de l'ajout d'un sel de lithium à l'analyte. La fragmentation de l'espèce cationisée au lithium lors des expériences avec les quatre spectromètres de masse, semble beaucoup plus judicieuse que celle des espèces protonées et cationisées au sodium.

Des quatre techniques utilisées, le MALDI-ToF-ToF est la technique qui permet d'obtenir les spectres les plus riches en information structurale. L'ESI-LTQ-Orbitrap a permis d'obtenir des spectres moins riches mais suffisants en ions d'intérêt pour une élucidation complète de la structure de la molécule. L'ESI-Q-ToF mène à des spectres relativement similaires à ceux obtenus en ESI-LTQ-Orbitrap. Enfin l'APPI peut être écartée totalement des techniques appropriées pour identifier des acétogénines puisqu'elle n'apporte aucune information structurale.

Par ailleurs, en comparant les spectres obtenus en FAB (4 keV) [Laprévote, 1994], et ceux obtenus avec le MALDI ToF-ToF (2 keV), le même type de fragmentations le long de la chaîne, autour et à l'intérieur du cycle THF est obtenu. En effet ces deux techniques utilisent des hautes énergies de collision.

La limite de détection (LOD) (signal-sur-bruit = 3) est d'environ 10 nM en MS et 10 µM en MS/MS avec le MALDI ToF-ToF, alors qu'avec l'ESI-LTQ-Orbitrap la LOD est d'environ 0,3 nM en MS et 0,5 µM en MS/MS.

L'ESI-LTQ-Orbitrap est plus performant que l'ESI-Q-Star et a démontré son efficacité par la complémentarité des spectres MS/MS en mode d'ionisation positif et négatif. La technique utilisant le MALDI ToF-ToF permet quant à elle d'obtenir de nombreux fragments informatifs pour l'élucidation structurale des acétogénines. Le nombre important de fragments supplémentaires à ceux suffisants pour l'élucidation structurale permet de confirmer sans ambiguïté la structure de la molécule, au contraire de la technique employant l'ESI-LTQ-Orbitrap.

Par conséquent, le MALDI ToF-ToF a été considéré comme la technique de choix pour la détermination de l'annonacine.

14. Application à 7 autres acétogénines

Avant de statuer sur l'efficacité de la méthode MS/MS à haute énergie de collision MALDI ToF-ToF pour la détermination de la structure des acétogénines, ses capacités ont été testées sur sept autres acétogénines de structure connue (*Schéma 9*). Les sept acétogénines ont été cationisées par le lithium et incorporées dans la matrice DHB comme précédemment décrit dans la partie MALDI-ToF-ToF. Les spectres ont été effectués en mode *CID on*, avec une intensité de laser de 4500, une énergie de collision de 2 keV avec l'argon utilisé à une pression de $3,6 \cdot 10^{-6}$ hPa.

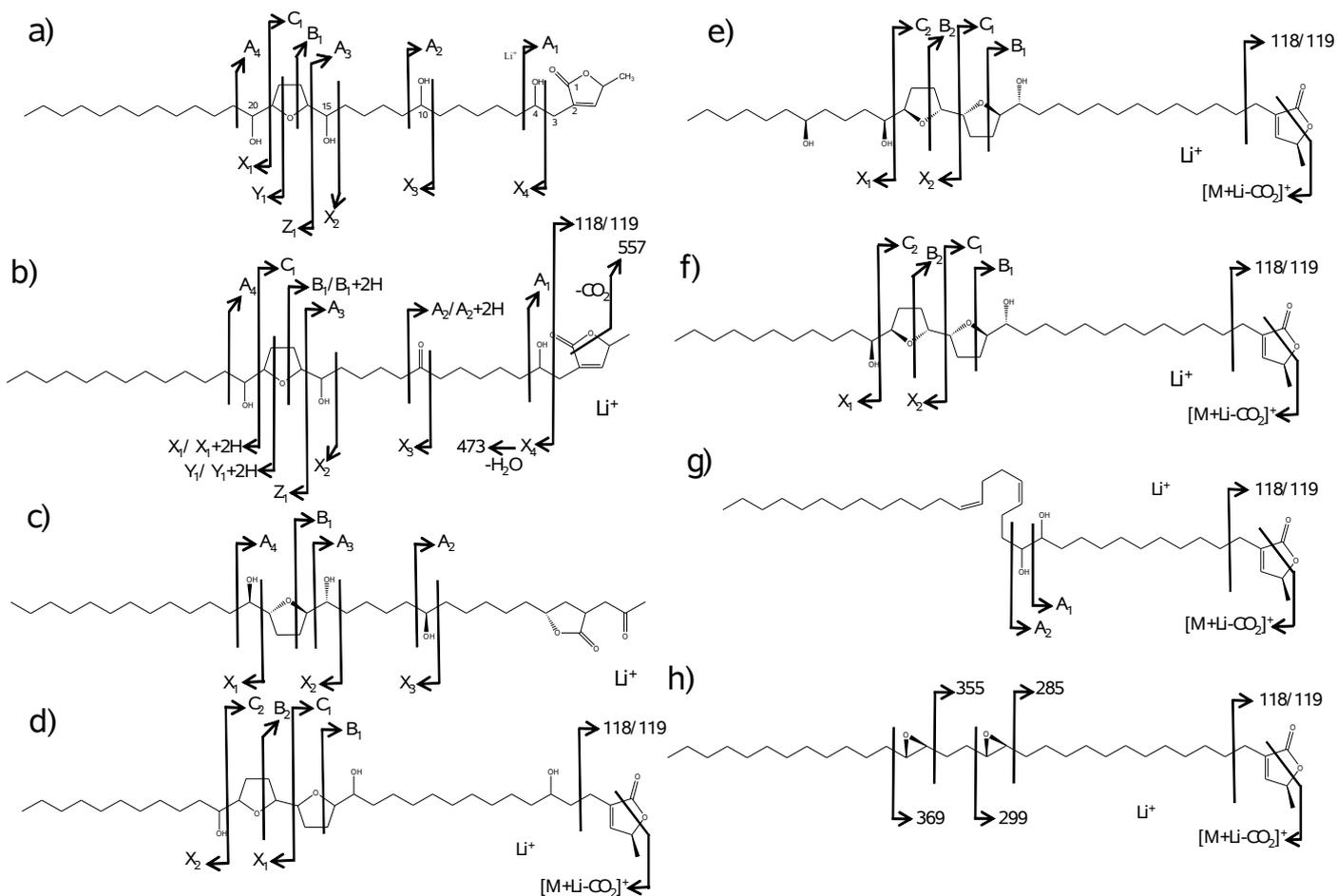


Schéma 9 : Principaux fragments formés lors d'une expérience MALDI-MS/MS sur l'espèce cationisée au lithium ($[M+Li]^+$) de a) l'annonacine b) l'annonacinone, c) la *cis* and *trans* annonacine, d) la narumicine-2, e) la squamocine, f) la désacétyl-uvaricin, g) la montécristine, h) la diépomuricanine (mode *CID on*, intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

L'annonacinone diffère de l'annonacine par un groupement cétone à la place de la fonction hydroxyle à la position C-10. Les voies de fragmentations obtenues présentent des similitudes avec celles de l'annonacine, la différence réside uniquement dans les pics espacés de 2 u. m. a. pour tous les fragments contenant la fonction cétone. Ceci permet de confirmer la localisation de la cétone sur la chaîne alkyle (*Schéma 9b* et *Figure 20*).



Figure 20 : Spectre MALDI-MS/MS de l'annonacinone cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6.10^{-6}$ hPa).

Les molécules isobariques (*cis*- et *trans*-isoannonacine) sont étudiées (**Schéma 9c** et **Figure 21**). Le spectre MS/MS obtenu présente les séries A, B et X. La seule différence avec l'annonacine repose dans la lactone qui est de sous-type 2 (**Tableau 1**) conduisant à l'absence de signaux à m/z 491 (X_4) et à m/z 119 [Fang, 1993].



Figure 21 : Spectre MALDI-MS/MS de la *cis*- et *trans*-annonacine cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6.10^{-6}$ hPa).

Dans le but de confirmer l'implication du groupe hydroxyl en position C-4 dans la formation du fragment X₄ de l'annonacine (correspondant à la perte de 112 u. m. a. à partir de l'ion précurseur cationisé au lithium), deux autres molécules ont été étudiées.

Chacune d'entre elles possède deux groupes THF et diffère par la localisation d'un groupement hydroxyl le long de la chaîne, à la position C-28 pour la squamocine (m/z 629 ; [M+Li]⁺) et à la place C-5 pour la narumicine-2 (m/z 629 ; [M+Li]⁺). Les spectres MS/MS des espèces cationisées au lithium de la narumicine-2 (**Figure 22**) et de la squamocine (**Figure 23**) ne présentent aucune perte de 112 u. m. a.

En plus de l'ion fragment à m/z 119, ces deux molécules présentent un ion radical méthyl-lactone, à m/z 118. Alors que la narumicine-2 contient un groupement hydroxyl en position C-5, la squamocine ne contient pas de groupement hydroxyl proche de la lactone. En conclusion, le groupement hydroxyl en position C-4 favorise la formation d'ion fragment à m/z 119 [Laprévôte, 1994] alors qu'un groupement hydroxyl à une autre position favorise la voie de fragmentation homolytique menant à l'ion radical m/z 118 (**Schéma 9d et 9e**). Malheureusement, aucun ion de type X ou C permet de localiser le groupement hydroxyl en position C-5 de la narumicine-2 et en position C-28 de la squamocine.



Figure 22 : Spectre MALDI-MS/MS de la narumicine-2 cationisée au lithium [M+Li]⁺ en mode *CID on* (intensité laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à 3.6.10⁻⁶ hPa).



Figure 23 : Spectre MALDI MS/MS de la squamocine cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

La désacétyl-uvaricine, qui contient le même squelette carboné que les deux précédentes molécules mais sans groupement hydroxyle autre que ceux adjacents aux cycles THF, a également été étudiée (*Schéma 9f* et *Figure 24*). Le spectre MS/MS de la désacétyl-uvaricine cationisée au lithium montre les mêmes séries C₁, C₂, B₁, B₂ et X₁, X₂ que celles obtenues avec la squamocine et la narumicine-2. Ces ions permettent la localisation des deux groupements THF.



Figure 24 : Spectre MALDI-MS/MS de la désacétyl-uvaricine cationisée au lithium [M+Li]⁺ en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à 3.6.10⁻⁶ hPa).

La structure de la montécristine (m/z 581 ; $[M+Li]^+$) (*Schéma 9g* et *Figure 25*) ne contient aucun cycle THF, mais deux insaturations et un système diol adjacent. Le groupement hydroxyl C-14 est localisé grâce aux ions fragments A_1 (m/z 303) et A_2 (m/z 273) [Gleye, 1997] (*Schéma 9g* et *Figure 25*). Contrairement à ce que l'on pourrait attendre des expériences à haute énergie de collision [Tomer, 1983] [Clayes, 1996] c'est-à-dire une différence de 26 u. m. a. [Gleye, 1997] entre les pics correspondant à ceux en alpha de la double liaison, la position des doubles liaisons n'a pas été déterminée.



Figure 25 : Spectre MALDI-MS/MS de la montécristine cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on*, (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6.10^{-6}$ hPa).

La diépomuricanine (m/z 553 ; $[M+Li]^+$) ne comporte pas de groupement THF mais contient deux groupements époxyde (**Schéma 9h**). Cependant, au contraire des résultats précédemment obtenus avec le FABMS [Laprévotte, 1992] aucun pic correspondant à une fragmentation interne au cycle époxyde n'a été détecté. Deux pics à m/z 299,3 et m/z 369,4 sembleraient correspondre à la fragmentation en alpha des deux cycles époxyde (**Figure 26**). Cependant, cette information semble peu évidente et utilisable pour une élucidation structurale d'autres acétogénines.



Figure 26 : Spectre MALDI-MS/MS de la diépomuricanine cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité de laser de 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6.10^{-6}$ hPa).

15. Conclusion

L'étude des huit acétogénines nous a permis de déterminer quatre principales caractéristiques structurales lors d'études MS-MS par MALDI-ToF-ToF (haute énergie de collision). Premièrement, les ions fragments à m/z 118 et/ou à m/z 119 signent la présence d'une lactone de sous-type 1, alors que leur absence est corrélée à une lactone de sous-type 2. Deuxièmement, la perte de 112 u. m. a. à partir de l'espèce cationisée au lithium indique la présence d'un groupement hydroxyl en position C-4. Troisièmement, le nombre d'hydroxyl ou groupements cétone a été déterminé autour du THF, mais leur position précise n'a pas été définie dans le cas où la molécule présente plus de deux groupements THF. Quatrièmement, l'approche MALDI-MS/MS semble peu efficace en termes de détection des insaturations et groupements époxyde.

REFERENCES

A

[Adams, 1988] J. Adams, M. L. Gross, Structural determination of modified fatty acids by collisional activation of cationized molecules, *Org. Mass Spectrom.*, 23, 1988, 307.

[AFSSA, 2010] AFSSA, 2010. Saisine 2008-SA-0171 (2010/04/28)

[Alali, 1999] F. Q. Alali, X. X. Liu, J. L. McLaughlin, [Annonaceous acetogenins: Recent progress](#), *J. Nat. Prod.*, 62, 1999, 504.

[Apartis, 2008] E. [Apartis](#), B. [Gaymard](#), S. [Verhaeghe](#), E. [Roze](#), M. [Vidailhet](#), A. [Lannuzel](#), Predominant cortical dysfunction in Guadeloupean parkinsonism, *Brain*, 131, 2008, 2701.

[Asensio, 2000] G. Asensio, M. A. Miranda, M. J. Sabater, J. Perez-Prieto, A. Simon-Fuentes, R. Mello, $C_5H_7O_2^+$ ions : the correlation between their thermochemistry in acidic solution and their chemistry in the gas phase, *J. Org. Chem.*, 65, 2000, 964.

B

[Bermejo, 2005] A. Bermejo, B. Figadere, M. C. Zafra-Polo, I. Barrachina, E. Estornell, D. Cortes, Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action, *Nat. Prod. Rep.*, 3, 2005, 426.

C

[Caparros-Lefèbvre, 1999] D. Caparros-Lefèbvre, A. Elbaz, the Caribbean Parkinsonism Study Group, Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: A case-control study, *Lancet*, 354, 1999, 281.

[Caparros-Lefèbvre, 2002] D. Caparros-Lefèbvre, N. Sergeant, A. Lees, A. Camuzat, S. Daniel, A. Lannuzel, A. Brice, E. Tolosa, A. Delacourte, C. Duyckaerts, Guadeloupean parkinsonism: A cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathie, *Brain*, 125, 2002, 801.

[Caparros-Lefèbvre, 2005] D. Caparros-Lefèbvre, J. Steele, Atypical parkinsonism on Guadeloupe, comparison with the parkinsonism-dementia complex of Guam, and environmental toxic hypotheses, *Environ. Toxicol. Phar.*, 19, 2005, 407.

[Cavé, 1997] A. Cavé, B. Figadère, A. Laurens, D. Cortes, Progress in the Chemistry of Organic natural Products, 1997.

[Champy, 2005] P. Champy, A. Melot, V. Guérineau, C. Gleye, G. U. Höglinger, M. Ruberg, A. Lannuzel, O. Laprèvote, A. Laurens, R. Hocquemiller, Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov. Disord.*, 20, 2005, 1629.

[Champy, 2004] P. Champy, G. U. Höglinger, J. Féger, C. Gleye, R. Hocquemiller, A. Laurens, V. Guérineau, O. Laprèvote, F. Medja, A. Lombès, P.P. Michel, A. Lannuzel, E.C. Hirsch, M. Ruberg, Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe, *J. Neurochem.* 88, 2004, 63.

[Chen, 1996] Y. Y. Chen, F. R. Chang, H. F. Yen, Y. C. Wu, Acetogenins from seeds of *Annona reticulata*, *Phytochemistry* 4, 1996, 1081.

[Cheng, 2000] C. Cheng, M. L. Gross, Applications and mechanisms of charge-remote fragmentation, *Mass Spectrom. Rev.*, 19, 2000, 398.

[Clayes, 1996] M. Clayes, L.Nizigiyimana, H. Van den Heuvel, P. Derrick, Mechanistic aspects of charge-remote fragmentation in saturated and mono-unsaturated fatty acid derivatives. Evidence for homolytic cleavage, *Rapid. Comm. Mass. Spectrom.*, 10, 1996, 770.

[Cortes, 1991] D. Cortes, S. H. Myint, A. Laurens, R. Hoquemiller, M. Leboeuf, A. Cavé, Acetogenins of Annonaceae : A new type of cytotoxic acetogenins - the tetrahydrofuranic beta-hydroxy methyl gamma-lactones, *Can. J. Chem.*, 69, 1991, 8.

[Crotti, 2004] A. E. M. Crotti, T. Fonseca, H. Hong, J. Staunton, S. E. Glembeck, N. P. Lopes, P. J. Gates, The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.*, 232, 2004, 271.

E

[Escobar, 2007] M. Escobar-Khondiker, M. [Höllerhage](#), M. P. [Muriel](#), P. [Champy](#), A. [Bach](#), C. [Depienne](#), G. [Respondék](#), E. S. [Yamada](#), A. [Lannuzel](#), T. [Yagi](#), E. C. [Hirsch](#), W. H. [Oertel](#), R. [Jacob](#), P. P. [Michel](#), M. [Ruberg](#), G. U. [Höglinger](#), Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons, *J. Neurosci.*, 29, 2007, 7827.

H

[Höglinger, 2005] G. U. Höglinger, P. P. Michel, P. Champy, J. Féger, E. C. Hirsch, M. Ruberg, A. Lannuzel, Experimental evidence for a toxic etiology of tropical parkinsonism, *Mov. Disord.*, 20, 2005, 118.

[Höllerhage, 2009] M. Höllerhage, A. [Matusch](#), P. [Champy](#), A. [Lombès](#), M. [Ruberg](#), W. H. [Oertel](#), G. U. [Höglinger](#), Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies, *Exp. Neurol.*, 220, 2009, 133.

F

[Fang, 1993] X. P. Fang, M. J. Rieser, Z. M. Gu, G. X. Zhao, J. L. Mc Laughlin, Annonaceous acetogenins – An updated review, 4, 1993, 27.

[Fenn, 1989] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, 246, 1989, 64.

G

[Gleye, 1997] C. Gleye, A. Laurens, R. Hocquemiller, A. Cavé, O. Laprèvote, L. J. Serani, [Isolation of montecristin, a key metabolite in biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and its structure elucidation by using tandem mass spectrometry](#), *Org. Chem.*, 62, 1997, 510.

[Gleye, 1998] C. Gleye, S. Raynaud, R. Hocquemiller, A. Laurens, C. Fourneau, L. J. Serani, O. Laprèvote, F. Roblot, T. Laugel, M. Leboeuf, A. Fournet, A. R. De Arias, B. Figadère, A. Cavé, Muricadenin, muridienins and chatenaytrienins, the early precursors of annonaceous acetogenins, *Phytochemistry*, 749, 1998, 5.

[Gleye, 2001] C. Gleye, B. Akendengue, A. Laurens, R. Hocquemiller, [Coronin from roots of *Annona muricata*, a putative intermediate in acetogenin biosynthesis](#), *Planta Med.*, 67, 2001, 570.

[Gross, 2000] M. Gross, Charge-remote fragmentation: an account of research on mechanisms and applications, *Int. J. Mass Spec.*, 200, 2000, 611.

J

[Jolad, 1982] S. D. Jolad, J.J. Hoffman, K. H. Schram, J. R. Cole, M. S. Tempesta, G. R. Kriek, R. B. Bates, Uvaricin, a new anti-tumor agent from *uvaria-accuminata* (annonaceae), *J. Org. Chem.* 47, 1982, 3151.

K

[Karas, 1988] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons, *Anal. Chem.*, 20, 1988, 2299.

[Kauppila, 2002] T. J. [Kauppila](#), T. [Kuورانne](#), E. C. [Meurer](#), M. N. [Eberlin](#), T. [Kotiaho](#), R. [Kostiainen](#), Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes. *Anal Chem.*, 21, 2002, 54.

L

A. Lannuzel, P. P. Michel, G. U. Höglinger, P. Champy, A. Jousset, F. Medja, A. Lombès, F. Darios, C. Gleye, A. Laurens, R. Hocquemiller, E. C. Hirsch, M. Ruberg, [The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism](#), *Neuroscience*, 121, 2003, 287.

[Lannuzel, 2007] A. [Lannuzel](#), G. U. [Höglinger](#), S. [Verhaeghe](#), L. [Gire](#), S. [Belson](#), M. [Escobar-Khondiker](#), P. [Poullain](#), W. H. [Oertel](#), E. C. [Hirsch](#), B. [Dubois](#), M. Ruberg, Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes?, *Brain*, 130, 2007, 816.

[Laprévöte, 1990] O. Laprövöte, F. Roblot, R. Hocquemiller, A. Cavé, [Structural elucidation of 2 new acetogenins, epoxyrollins-a and epoxyrollins-b, by tandem mass-spectrometry](#), *Tetrahedron Lett.*, 16, 1990, 2283.

[Laprövöte, 1992] O. Laprövöte, C. Girard, B. C. Das, D. Cortes, A. Cavé, [Acetogenins from annonaceae: formation of gas-phase lithium complexes from acetogenins and their analysis by fast-atom-bombardment mass-spectrometry](#), *Tetrahedron Lett.*, 33, 1992, 5237.

[Laprövöte, 1992] O. Laprövöte, C. Girard, B. C. Das, T. [Laugel](#), F. [Roblot](#), M. [Leboeuf](#), A. [Cavé](#), Location of epoxy rings in a long chain acetogenin by fast-atom bombardment and linked scan (B/E) mass spectrometry of lithium-cationized molecules, 6, 1992, 352.

[Laprévôte, 1994] O. Laprévôte, B. C. Das, [Structural elucidation of acetogenins from annonaceae by fast-atom-bombardment mass-spectrometry](#), *Tetrahedron*, 50, 1994, 8479.

[Liaw, 2010] Y. C. Huang, T. L. Hwang, Y. L. Yang, S. H. Wu, M. H. Hsu, J. P. Wang, S. C. Chen, L. J. Huang, C. C. Liaw, [Acetogenin and Prenylated Flavonoids from *Helminthostachy zeylanica* with Inhibitory Activity on Superoxide Generation and Elastase Release by Neutrophils](#), *Planta Med.*, 5, 2010, 447.

M

[McLaughlin, 2008] J. L. McLaughlin, Paw Paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products, *J. Nat. Prod.*, 71, 2008, 1311.

[Müller, 2001] M. Müller, J. Schiller, M. Petkovic, W. Oehrl, R. Heinze, R. Wetzker, K. J. Arnold, Limits for the detection of (poly-)phosphoinositides by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), *Chem. Phys. Lipids*, 110, 2001, 151.

O

[Okereke, 2002] C. S. Okereke, Role of integrative pharmacokinetic and pharmacodynamic optimization strategy in the management of Parkinson's disease patients experiencing motor fluctuations with levodopa, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 5, 2002, 146.

P

[Parkinson, 1817] J. Parkinson, *J. Neuropsychiatry. Clin. Neurosci.*, 14, 2002, 223, A retranscription of An essay on the shaking palsy, 1817.

[Pomper, 2009] K. W. Pomper, J. D. Lowe, S. B. Crabtree, W. Keller, Identification of Annonaceous Acetogenins in the Ripe Fruit of the North American Pawpaw (*Asimina triloba*), *J. Agric. Food Chem.* 57, 2009, 8339.

R

[Ratnayake, 1994] S. Ratnayake, Z. M. Gu, L. R. Miesbauer, D. L. Smith, K. V. Wood, D. R. Evert, J. L. McLaughlin, Parvifloracin and parviflorin: cytotoxic bistetrahydrofuran acetogenins with 35 carbons from *Asimina parviflora*, *Can. J. Chem.*, 72, 1994, 287.

[Roblot, 1993] F. Roblot, T. Laugel, M. Leboeuf, A. Cavé, O. Laprèvote, Two acetogenins from *Annona muricata* seeds, *Phytochemistry*, 1, 1993, 281.

S

[Syage, 2004] J.A. Syage, Mechanism of $[M+H]^+$ formation in photoionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 2004, 1521-1533

T

[Tomer, KB] K. B. Tomer, F. W. Crow, M. L. Gross, Location of double bond position in unsaturated fatty acids by negative ion MS/MS, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 1983, 5487.

[Trimpin, 2007] S. Trimpin, D. E. Clemmer, C. N. McEwen, Charge-remote fragmentation of lithiated fatty acids on a ToF-ToF instrument using matrix-ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 1967.

Y

[Yamada, 2009] E. Yamada, A. de Andrade, G. Respondek, S. Muessner, P. Champy, W. H. Oertel, G. Hoeglinger, Gene-environment interaction in a mouse model of a tauopathy, *J. Neural. Transm.*, 2009, 116(2), 222.

Z

[Zafra-Polo, 1996] M. C. Zafra-Polo, M. C. Gonzalez, E. Estornell, S. Sahpaz, D. Cortes, Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I, *Photochem.*, 42, 1996, 253.

Chapitre 4 :

LA GUANINE

CHAPITRE 4 : LA GUANINE

Le comportement de la guanine sous différentes conditions expérimentales, avec ou sans dopant, est choisi comme premier cas pour démontrer l'efficacité du spectromètre Q-Star sur la ligne DISCO du synchrotron. Le but est de confirmer ou non les mécanismes d'ionisation précédemment décrits dans la littérature sans et avec dopant et d'étudier l'influence de l'énergie des photons sur les différentes voies réactionnelles.

16. Introduction

La guanine est une des deux bases pyrimidiques parmi les cinq bases contenues dans l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et l'ARN (Acide RiboNucléique). Un enchaînement d'unités nucléosidiques (acide nucléique + sucre) liées entre elles par des ponts phosphodiester (nucléotide) permet de former un simple brin d'ADN, appelé oligonucléotide s'il est court. Le

Tableau 1 donne un récapitulatif de ces cinq nucléobases.

Nucléobase	Structure	Acide nucléique
Purines Adénine (Ade)		ARN ADN
Guanine (Gua)		ARN ADN
Pyrimidines Cytosine (Cyt)		ARN ADN
Thymine (Thy)		ADN
Uracile (Ura)		ARN

Tableau 1 : Récapitulatif des 5 nucléobases, leur structure et implication dans l'ADN/ARN.

L'ionisation des nucléotides joue un rôle important dans la chimie et la biologie de l'ADN. Les sites du nucléotide qui sont induits par des électrophiles ou des rayonnements ionisants mènent à une migration d'électrons et donc un déficit en électron endommageant ainsi l'ADN. Dans la plupart des cas c'est la guanine qui possède le site initiateur d'oxydation ou centre où se déroule la perte d'électrons. Ce phénomène est dû au fait que la guanine est la base possédant l'énergie d'ionisation la plus basse de toutes les nucléobases (*Tableau 2*) [Zhou, 2009].

Le cas de la guanine est particulièrement intéressant dans la mesure où cette base nucléique possède la plus basse EI (EI = 7,8-8,2 eV), ce qui est en faveur de réactions de transfert de charge efficaces, et l'AP la plus élevée (AP = 959,5 kJ/mol), ce qui est en faveur de la réaction de protonation. La guanine est la seule base nucléique possédant une EI inférieure à celle de l'anisole (7,8-8,2 eV) (*Tableau 2*), qui lui-même possède la plus basse EI des dopants les plus utilisés.

Composés	EI (eV)	AP (kJ/mol)
Guanine	7.8-8.2	959.5
Adénine	8.3-8.9	942.8
Cytosine	8.4-9.0	949.9
Thymine	9.0-9.4	880.9
Uracile	9.2-9.8	872.7
Adénosine		989.3
Cytidine		982.5
Uridine		947.6
Toluène	8.83	
radical benzyle		831.4
Anisole	8.20	
radical méthoxyphenyl		~ 880
Acétone	9.69	
radical 2-oxopropyl		820

Tableau 2 : Energies d'ionisation (EI) et affinités protoniques (AP) des nucléobases et des molécules de dopants. Valeurs obtenues sur le *NIST Webbook* [Linstrom, 2005] à l'exception de l'AP du radical méthoxyphenyl qui a été trouvé d'après [Kauppila, 2004]

17. Travaux antérieurs sur la guanine avec la lampe au krypton

La guanine a été étudiée précédemment à l'aide de la lampe au krypton PKS 106 dans notre équipe par A. Bagag. La lampe a permis donc d'obtenir des résultats à deux valeurs d'énergie de photons fixes de 10 eV et 10,6 eV.

Les expériences ont été effectuées avec la source Photospray™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Avant chaque utilisation, la source a été préchauffée pendant au moins quinze minutes afin d'éviter la condensation de vapeurs de solvant au sein de l'enceinte. Le solvant LC a été injecté à l'aide d'une chaîne HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo alto, CA, USA), classiquement à un débit de 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Le débit de gaz protégeant la lampe UV a été fixé à 2 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. L'azote (Air Liquide) a été utilisé comme gaz sauf le gaz nébuliseur qui est de l'air sec et propre. Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et obtenus auprès de Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) sauf pour le toluène qui a été obtenu auprès de SDS (Peypin, France) et l'anisole auprès d'Acros Organics (Geel, Belgique). L'eau employée est de l'eau osmosée purifiée sur un dispositif Milli-Q (18 $\text{M}\Omega$). Le dopant utilisé était l'anisole. Les conditions expérimentales sont résumées dans le

Tableau 3.

Quantité injectée :	20 μL à 10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Solvant LC :	H_2O ou MeOH à 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Dopants :	Anisole pur, Toluène pur à 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1	MCP
50	20	25	400	3	1200	20	100	15	2	2100

Tableau 3 : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse de la guanine.

Les **Figures 1** et **2** présentent le spectre de masse APPI de la guanine respectivement dans l'eau et dans le méthanol à 400°C en absence de dopant. Seuls les signaux des ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$ sont détectés en absence de dopant [Marotta, 2003]. Avec le dopant anisole (**Figure 3**) l'intensité des signaux de l'ion moléculaire M^{+} et de la molécule protonée $[\text{M}+\text{H}]^+$

sont quasi égaux et le rapport $[M+Na]^+ / [M+H]^+$ est le même que celui sans dopant (1/6) dans le méthanol. Bagag dans sa thèse en 2008 démontra que $[M+Na]^+$ est donc formé par thermospray.

L'ion $[M+H]^+$ sans dopant est formé par transfert de photon à partir du solvant eau comme méthanol mais les résultats des calculs des enthalpies de cette réaction de transfert d'atome d'hydrogène dans ces deux solvants ($D_H(H_2O) = 5,16 \text{ eV}$ et $D_H(MeOH) = 4,08 \text{ eV}$) avec les résultats obtenus sur les spectres était totalement en désaccord. D'après les valeurs théoriques obtenues, il apparaît que la réaction de transfert de H est toujours endothermique dans l'eau mais elle devient exothermique dans le méthanol (**Tableau 4**). Or les spectres sont quasi similaires avec un même rapport $[M^{++}]/[M+H]^+$ aussi bien dans l'eau que dans le méthanol.

Bases	ΔH_{H_2O} (kJ/mol)	ΔH_{MeOH} (kJ/mol)	$[M^{++}]/[M+H]^+$ dans	
			H ₂ O	MeOH
Guanine (7,8 eV)	98,4	-7,7	0,01	0.01
Guanine (8,2 eV)	59,82	-44,38	0,01	0,01

Tableau 4 : Valeur de l'enthalpie de réaction de transfert d'hydrogène calculée avec les valeurs extrêmes d'EI de la guanine (**Tableau 2**) et rapport des intensités du cation radicalaire moléculaire sur la molécule protonée pour chaque base dans l'eau et dans le méthanol

Selon les valeurs obtenues dans l'eau, la réaction de transfert d'hydrogène serait défavorisée énergétiquement pour la guanine. Or ce n'est pas ce qui est observé sur les spectres de masse, où le pic majoritaire est celui de l'ion $[M+H]^+$; le transfert de proton avait été donc supposé provenir d'impuretés présentes dans le milieu (**Figure 1 et 2**). Aucune généralité n'avait pu être tirée de la comparaison de l'enthalpie calculée et des rapports d'intensité. Avec dopant, la base possédant une EI inférieure à celle de l'anisole, les mécanismes de transfert de proton et de charge avaient été suggérés comme compétitifs.

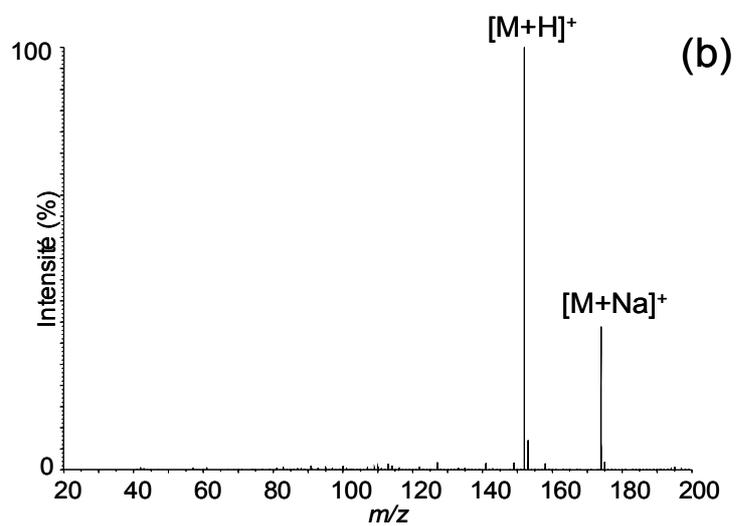


Figure 1 : Spectres de masse APPI de la guanine enregistré dans l'eau à 400°C sans dopant.

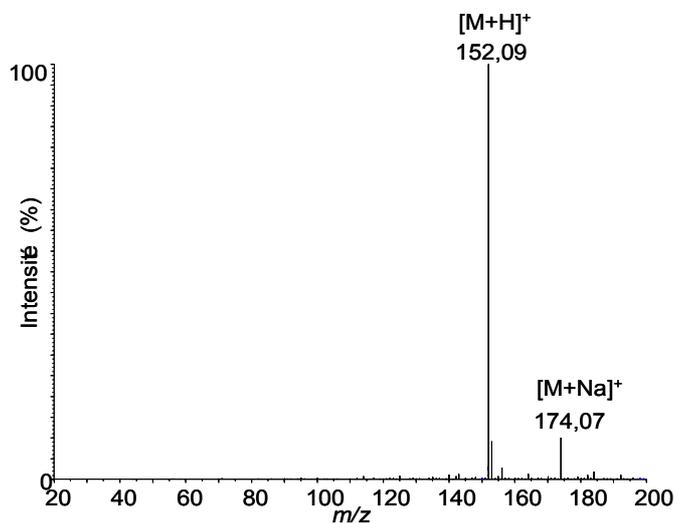


Figure 2 : Spectre de masse APPI de la guanine enregistré dans le méthanol à 400°C sans dopant.

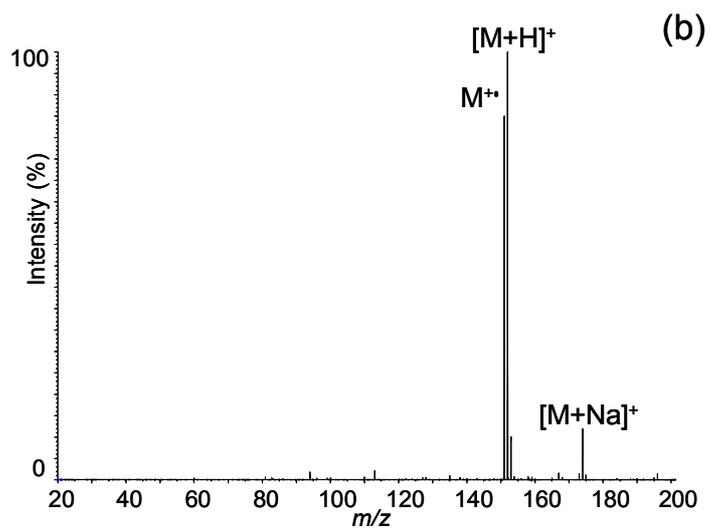


Figure 3 : Spectres de masse APPI de la guanine enregistré à 400°C en présence d'anisole.

18. Etude de la guanine sans dopant en SR-APPI (SR : Synchrotron Radiation)

Les conditions expérimentales pour l'étude de la guanine en SR-APPI ont été optimisées, en particulier la nature du solvant (mélange H₂O/MeOH (1/1 v/v)) qui permettait d'obtenir une plus forte intensité de signal, et sont retranscrites dans le **Tableau 5** suivant :

Quantité injectée :	20 μ L à 10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹
Solvant LC :	H ₂ O/MeOH (1/1 v/v) à 200 μ L.min ⁻¹
Dopants :	Anisole pur, Toluène pur à 1 μ L.min ⁻¹

GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1	MCP
50	20	25	450	3	1200	20	100	15	2	2100

Tableau 5 : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse de la guanine.

Le **Tableau 6** retranscrit les réactions nécessaires pour la compréhension des mécanismes réactionnels qui se déroulent lors de l'étude de la guanine par SR-APPI :

Thermospray	$[M+H+nS]^+ \rightarrow [M+H]^+ + nS$	(1)
APPI directe	$M + hv \rightarrow M^{++} + e^-$	si EI (M) < hv (2)
Transfert d'atome H	$M^{++} + S \rightarrow [M+H]^+ + (S-H)^\bullet$	(3)
Photoionisation du dopant	$D + hv \rightarrow D^{++} + e^-$	(4)
Transfert de proton assisté	$D^{++} + M \rightarrow (D-H)^\bullet + [M+H]^+$	si AP (M) > AP ([D-H]^\bullet) (5)
Transfert de charge assisté	$D^{++} + M \rightarrow M^{++} + D$	si IE (D) > IE (M) (6)

M = guanine, S = MeOH/H₂O, D = anisole

Tableau 6 : Récapitulatif des réactions mises en jeu lors de l'étude de la guanine avec le mélange de solvants MeOH/H₂O et l'anisole par SR-APPI.

Selon les valeurs d'EI et AP de la guanine, méthanol, eau et anisole reportées dans le **Tableau 7**, les réactions (1), (2) et (3) devraient se produire sans dopant. La réaction (1) correspond à un procédé simple de thermospray qui est toujours présent en raison de la configuration de la source APPI. La photoionisation directe de l'analyte en (2) ne s'effectue

que si son EI est inférieure à l'énergie des photons. Cette réaction peut être suivie ou non par un transfert d'hydrogène selon l'affinité relative du proton de l'analyte et du solvant. Les réactions (4), (5) et (6) peuvent elle se dérouler quand l'anisole est utilisé comme dopant. La réaction (4) transcrit la photoionisation directe du dopant quand l'énergie d'ionisation du dopant est inférieure à celle de l'énergie des photons. Les deux réactions compétitives (5) et (6) peuvent se dérouler selon les propriétés thermochimiques du dopant et de l'analyte.

La lampe à décharge au krypton, comme celle au xénon, et argon délivre des photons d'énergie fixe respectives de 10/10,6, 8,4 et 11,7 eV [Yoshikawa, 1971] et donc des valeurs d'énergie de photons supérieures à celle de la guanine et de l'anisole (**Tableau 7**). Ainsi aucune des sources APPI commerciales n'est capable d'apporter les conditions thermodynamiques nécessaires afin d'étudier l'apparition et l'évolution des réactions consécutives et compétitives de (1) à (6). Au contraire, le faisceau DISCO est plus approprié pour étudier les processus chimiques en phase gazeuse en permettant de balayer de 4 à 11 eV la gamme d'énergie des photons UV.

Composés	EI (eV)	AP (kJ.mol ⁻¹)
Eau	12.62	691.0
Dimère d'eau		816
Trimère d'eau		862
Tétramère d'eau		900
Méthanol	10.84	754.3
Dimère de méthanol		883
Trimère de méthanol		937
Tétramère de méthanol		967

Guanine	8.1±0.2	959.5
Toluène	8.83	
Radical benzyl		831.4
Anisole	8.20	
Methoxyphenyl radical		~880

Tableau 7 : Récapitulatif des énergies d'ionisation (EI) et affinités protoniques (AP) des nucléobases et molécules de dopant et solvant. Les données proviennent de NIST database à l'exception de l'AP du radical methoxyphenyl [Kauppila, 2004].

La guanine possède une affinité protonique significativement plus élevée que celle des clusters d'eau et de méthanol (**Tableau 7**), ce qui l'empêche d'être déprotoné par le solvant. Il a été également supposé que les clusters de solvant jouaient un rôle dans le procédé d'APPI avec la lampe à décharge au krypton [Short, 2007]. Cependant, du fait que les seuils d'énergie de l'eau protonée, des clusters de méthanol ou d'eau/méthanol ont une énergie comprise entre 9.6 et 10.2 eV [Kostko, 2008] et comme les expériences sont effectuées à des énergies de photon inférieures à 9,0 eV, la photoionisation des clusters de solvant ne sera pas considérée dans la suite de l'étude.



Figure 4 : Spectre de masse SR-APPI de la guanine enregistré à 450°C dans le mélange H₂O/CH₃OH (50/50 , v/v) sans dopant et avec une énergie des photons de 8,0 eV.

Le spectre de masse à pression atmosphérique par rayonnement synchrotron (SR-APPI) enregistré à 450°C dans l'eau/méthanol (50/50, v/v) à l'énergie de photons UV de 8,0 eV est présenté dans la **Figure 4**. Les signaux intenses correspondant aux ions [M+H]⁺ (*m/z* 152) et [M+Na]⁺ (*m/z* 174) sont enregistrés. L'addition de billes d'Amberlite™ à l'échantillon fut insuffisante pour s'affranchir totalement des pics des adduits au sodium. Ceci signifie que la

guanine présente une forte affinité pour le sodium [Hoyau, 1999]. Les espèces cationisées au sodium observées sous de telles conditions sont produites par thermospray. Ce processus peut être considéré comme une désolvatation des espèces chargées préformées en solution, comme proposé dans la littérature [Cristoni, 2002]. En effet, à n'importe quelle valeur d'énergie de photons, l'intensité du signal de $[M+Na]^+$ ne varie en aucun cas.

La **Figure 5** montre les variations d'abondance de l'ion $[M+H]^+$ en fonction de l'énergie de photons. Un plateau est observé en-dessous de 8,15 eV, suivi par d'augmentation linéaire de l'abondance en fonction de l'énergie de photons. Il est à noter que l'énergie d'ionisation verticale de la guanine est de 8.1 ± 0.2 eV en phase gazeuse [Zhou, 2009] et [Bravaya, 2010] ou avec des petits clusters d'eau [Belau, 2007]. Les observations sont en accord avec les schémas des réactions (1), (2) et (3). Avec une énergie de photons plus basse que celle de la guanine, le signal de l'ion correspondant à $[M+H]^+$ est tout simplement dû au processus de thermospray (réaction (1)) comme décrit pour $[M+Na]^+$. En effet, avec des photons d'énergie plus importante que l'EI de la guanine, celle-ci est premièrement photoionisée menant aux ions radicaux intermédiaires qui subissent des collisions et réagissent avec des molécules de solvant (réaction (3)). Au contraire, les calculs théoriques indiquent que l'ionisation verticale théorique de la nucléobase se déroule à une énergie environ 1 eV sous celle en phase gazeuse [Pluharova, 2011]. Les observations expérimentales sont donc concordantes avec les réactions chimiques se déroulant en phase gazeuse ou dans un environnement micro-solvaté. Selon les valeurs énoncées dans le **Tableau 6**, le transfert de proton entre la guanine protonée et les clusters d'eau ou méthanol sont notablement endothermiques, à l'exception du tétramère de méthanol. D'après les calculs faits par Short *et al.*, le trimère de méthanol devrait être présent dans la région de la photoionisation avec une pression partielle 10^5 fois plus basse que celle du monomère de méthanol [Short, 2007]. Nous pouvons donc conclure que l'APPI est actuellement en phase gazeuse et non dans des micro-gouttes du solvant.

L'enthalpie de la réaction de transfert de l'atome d'hydrogène (reaction (3)) peut être calculé selon l'équation [Syage, 2004]:

$$\Delta_{\text{R}}\text{H} = \text{EI}(\text{H}) - \text{EI}(\text{M}) - \text{AP}(\text{M}) + \text{D}_{\text{H}}(\text{S}) \quad (7)$$

Où EI(H) et EI(M) sont les énergies d'ionisation respectives de l'atome hydrogène et de l'analyte, AP(M) est l'affinité protonique de l'analyte et D_H(S) est l'énergie de dissociation de liaison de l'atome H de la molécule solvant.

Bagag *et al.* ont obtenu des valeurs légèrement négatives de Δ_RH pour la guanine (M) dans le méthanol (S) (-7.7 kJ.mol⁻¹), suggérant le caractère exothermique de la réaction en phase gazeuse [Bagag, 2007]. Cela explique pourquoi aucun cation radicalaire de guanine n'est observé dans les conditions expérimentales utilisées ici. Les données expérimentales sont en concordance avec les schémas des réactions (1), (2) et (3) lorsque le dopant n'est pas utilisé.

Par conséquent, pour l'énergie de photons supérieure à 8,0 eV, l'ionisation thermospray (réaction 1) et la photoionisation/transfert d'atome H (réaction (2) et (3)) sont deux processus chimiques qui nécessitent d'être pris en compte pour la compréhension des données expérimentales.



Figure 5 : Intensité du pic de la guanine protonée étudiée par SR-APPI-MS à 450°C dans le mélange H₂O/CH₃OH (50/50, v/v) sans dopant en fonction de l'énergie des photons (les pointillés permettent de suivre plus aisément l'évolution de la courbe).

19. Etude de la guanine avec dopant en SR-APPI

Les mêmes expériences ont été menées en additionnant l'anisole pur à 1 μL.min⁻¹ comme dopant. Le spectre de masse enregistré à 450°C dans l'eau/méthanol (50:50, v/v) à 8,0 eV

présente deux signaux intenses à m/z 152 and m/z 174, comme précédemment décrit sans dopant.



Figure 6 : Intensité des pics de la guanine protonée étudiée par SR-APPI-MS à 450°C dans le mélange H₂O/CH₃OH (50/50 , v/v) avec l'anisole comme dopant en fonction de l'énergie des photons (les pointillés permettent de suivre plus aisément l'évolution de la courbe).

La **Figure 6** montre la variation de l'intensité du signal de l'ion [M+H]⁺ de la guanine avec le dopant anisole en fonction de l'énergie de photons. Entre 7,8 et 8,1 eV, l'intensité du signal de l'ion [M+H]⁺ est stable alors qu'une augmentation de 20% est observée entre 8,1 et 8,3 eV suivi par une augmentation linéaire en fonction de l'énergie de photons plus importante à partir de 8,3 eV (**Figure 6**). Cette valeur correspond à la valeur du seuil d'apparition de l'anisole.

Ceci est en accord avec le schéma réactionnel (réaction (4)) où se déroule la photoionisation du dopant. Quand les photons possèdent une énergie supérieure à l'EI de l'anisole, 8,2 eV, la photoionisation du dopant commence à être efficace, menant à la formation de cations radicalaires D⁺ qui peuvent à leur tour réagir avec la guanine par transfert de proton (réaction (5)) selon leur PA respectives (**Tableau 7**). Cette dernière réaction est directement dépendante de la quantité de cations radicalaires de dopant D⁺, qui augmente quand l'énergie de photons augmente.



Figure 7 : Spectre de masse SR-APPI de la guanine enregistré à 450°C dans le mélange H₂O/CH₃OH (50/50 , v/v) avec l'anisole comme dopant à 9,0 eV.

Pour les énergies de photons supérieures à 8,15 eV, le signal correspondant à l'ion M⁺ est présent dans le spectre (**Figure 7**). Le rapport d'intensité des ions M⁺ sur [M+H]⁺ en fonction de l'énergie de photons montre une nette augmentation entre 8,2 eV et 8,7 eV alors qu'il atteint un plateau à des énergies supérieures (**Figure 8**). Ce résultat est en accord avec les réactions (4) et (6) du modèle théorique. En effet, pour les énergies de photon plus importantes que l'EI de l'anisole, la photoionisation du dopant est efficace (réaction (4)), menant à la formation de cations radicalaires D⁺ qui peuvent à leur tour réagir avec la guanine par une réaction de transfert de charge (réaction (6)) selon leur propres EI (**Tableau 2 et 7**). Les réactions (5) et (6), qui sont toutes les deux exothermiques et directement dépendantes de la quantité de cation radicalaire d'anisole formé dans la source d'ions, sont donc compétitives quand l'énergie de photons est plus élevée que celle du dopant. De plus la réaction (6) est favorisée de manière entropique. Ces résultats expérimentaux sont en total accord avec les précédents mécanismes proposés dans lesquels l'échange de charge et le transfert de proton peuvent se produire de manière compétitive [Syage, 2004], [Kauppila, 2004], [Bagag, 2007].



Figure 8 : Ratio (%) entre l'intensité du pic de l'ion m/z 151 (M⁺) et m/z 152 ([M+H]⁺) en fonction de l'énergie des photons enregistré par SR-APPI-MS avec l'anisole comme dopant (les pointillés permettent de suivre plus aisément l'évolution de la courbe).

Le plateau, atteint pour le rapport d'intensités des ions M^{+} sur $[M+H]^{+}$ en fonction de l'énergie de photons observé à partir de 8,7 eV, a déjà été décrit par Zhou *et al.* lorsqu'ils enregistrèrent les courbes de rendement de photoionisation de la guanine (Photo-Ionization Efficiency PIE) en fonction de l'énergie de photons par désorption laser (un laser Nd:YLF laser utilisé à 527 nm) [Zhou, 2009]. Comme décrit dans les précédents travaux sur la guanine avec l'anisole comme dopant à 10,0/10,6 eV (lampe au krypton) Bagag *et al.* [Bagag, 2007] montrèrent que le transfert de charge et le transfert de proton peuvent se dérouler de manière compétitive.

Lors de cette étude, nous avons montré pour la première fois que l'énergie de photon est un paramètre crucial pour orienter le mécanisme en faveur des réactions de transfert de proton ou de charge. Il apparaît clairement que l'efficacité du transfert de charge augmente linéairement avec l'énergie de photon au-delà du seuil d'ionisation du dopant. Ceci est en parfait accord avec les réactions (4) et (6). En effet, l'augmentation graduelle du rapport de l'intensité de M^{+} sur $[M+H]^{+}$ de l'EI de l'anisole peut simplement être expliquée par la section efficace d'ionisation pour l'anisole qui correspond approximativement à deux fois celle du toluène. Même si la réaction de transfert du radical hydrogène (5) est aussi exothermique dans le méthanol (**Tableau 4**), il est connu que le transfert de charge est favorisé grâce à la cinétique [Syage, 2004].

En comparaison avec l'anisole, le toluène (données non présentées) agit exclusivement en faveur de la réaction par transfert de proton, l'ion moléculaire de la guanine étant absent dans le spectre de masse SR-APPI enregistré dans la même gamme d'énergie que pour l'anisole. Ceci peut être simplement expliqué par l'ordre d'affinité protonique entre le radical benzyl et le cluster de méthanol ou d'eau [Chiang, 2008] indiquant que les photoions du toluène réagissent rapidement par transfert de protons dissociatif intra-cluster sur les clusters de méthanol ou d'eau [Chiang, 2008].

20. Conclusion

Ce travail retranscrit les premiers résultats obtenus avec une source APPI modifiée couplée à un rayonnement accordable VUV. Les rendements de réaction menant à l'ionisation du produit thermodynamiquement le plus stable de la guanine en fonction de l'énergie, confirment les mécanismes antérieurs proposés. Sans dopant, il y a réaction avec le solvant à la fois via un mécanisme de type thermospray ou via une photoionisation directe de la guanine suivi par un transfert d'hydrogène radicalaire. L'APPI se déroule bien en phase gazeuse et non en micro-goutellettes ni en réagissant avec les clusters de méthanol.

Avec le dopant, la réaction de transfert de proton et de transfert de charge sont compétitives, avec la réaction de transfert de charge dépendante de la quantité de cation radical d'anisole et de l'énergie de photon au-delà du seuil d'ionisation du dopant.

Le toluène lui réagit en faveur du transfert de proton.

REFERENCES

B

[Bagag, 2007] A. Bagag, A. Giuliani, O. Lapr evote, Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry of Nucleic Bases, Ribonucleosides And Ribonucleotides, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2007**, 264, 1.

[Belau, 2007] L. Belau, K.R. Wilson, S.R. Leone, M. Ahmed, Vacuum-Ultraviolet Photoionization studies of the microhydration of DNA bases (guanine, cytosine, adenine, and thymine), *J. Phys. Chem., A* **2007**, 111, 7562.

[Bravaya, 2010] K.B. Bravaya, O. Kostko, S. Dolgikh, A. Landau, M. Ahmed, A.I. Krylov, Electronic structure and spectroscopy of nucleic acid bases: ionization energies, ionization-induced structural changes, and photoelectron spectra, *J. Phys. Chem., A* **2010**, 114, 12305.

C

[Chiang, 2008] C.T. Chiang, K.S. Shores, M. Freindorf, T. Furlani, R.L. DeLeon, J.F. Garvey, Size-Restricted Proton Transfer within Toluene-Methanol Cluster Ions, *J. Phys. Chem. A.*, 2008, 112, 11559.

[Cristoni, 2002] S. [Cristoni](#), L.R. [Bernardi](#), I. [Biunno](#), F. [Guidugli](#), Analysis of Peptides using Partial (No Discharge) Atmospheric Pressure Chemical Ionization Conditions with Ion Trap Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, 16, 1686.

H

[Hoyau, 1999] S. Hoyau, K. Norrman, T.B. McMahon, G. Ohanessian, A quantitative basis for as cale of Na⁺ affinities of organic and small biological molecules in the gas phase, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 8864.

K

[Kauppila, 2004] T.J. Kauppila, R. Kostianen, A.P. Bruins, [Anisole, a New Dopant for Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry of Low Proton Affinity, Low Ionization Energy Compounds](#), *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18, 808.

[Kostko, 2008] O. Kostko, L. Belau, K.R. Wilson, M. Ahmed, Vacuum-ultraviolet (VUV) photoionization of small methanol and methanol-water clusters, *J. Phys. Chem., A* 2008, 112, 9555.

M

[Marotta, 2003] E. Marotta, R. Seraglia, F. Fabris, P. Traldi, Atmospheric Pressure Photoionization Mechanisms 1. The Case of Acetonitrile, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2003, 228.

P

[Pluharova, 2011] E. Pluharova, P. Jungwirth, S. Bradforth, P. Slavicek, Ionization of purine tautomers in nucleobases, nucleosides, and nucleotides: from the gas phase to the aqueous environment, *J. Phys. Chem., B* 2011, 115, 1294.

S

[Short, 2007] L.C. Short, S.S. Cai, J.A. Syage, APPI-MS: effects of mobile phase and VUV lamps on the detection of PAH compounds, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2007, 18, 589.

Y

[Yoshikawa, 1971] S. [Yoshikawa](#), K. [Iwamoto](#), K. [Washio](#), Efficient Arc Lamps for Optical Pumping of Neodymium Lasers, *Appl Opt.*, 1971, 10, 1620.

Z

[Zhou, 2009] J. Zhou, O. Kostlo, C. Nicolas, X. Tang, L. Belau, M.S. de Vries, M. Ahmed, Experimental Observation of Guanine Tautomers with VUV Photoionization, *J. Phys. Chem. A* 2009, 113, 4829.

Chapitre 5 :

LES PHOSPHOLIPIDES

CHAPITRE 5 : LES PHOSPHOLIPIDES

21. Introduction aux phospholipides

Les lipides peuvent être décrits comme la fraction cellulaire qui peut être diluée dans les solvants protiques et aprotiques comme le chloroforme.

Les phospholipides sont des lipides possédant trois parties (**Figure 1**) : un glycérol, deux acides gras estérifiés en position *sn*-1 et *sn*-2 et une fonction phosphate. De part la présence des acides gras (partie hydrophobe) et la présence de la fonction phosphate et tête polaire (partie hydrophile), les phosphoglycérolipides ont des propriétés amphiphiles qui leur permettent d'être organisés en bicouches pour former des membranes biologiques cellulaires, par exemple. Ces dix dernières années, la spectrométrie de masse, tout particulièrement avec une source ESI, a été largement utilisée pour étudier les phospholipides et plus particulièrement pour déterminer la longueur, le degré d'insaturation et la position des chaînes carbonées.



Figure 1 : Structure générale de la famille des phospholipides avec :

R_1 = Chaîne carbonée : *ether gras, vinyl ether gras, acyle gras,*

R_2 = Chaîne carbonée : *acyle gras,*

R_3 = Groupe polaire : *choline, éthanolamine, inositol, sérine, glycérol,*

[Pulfer & Murphy, 2003]. Les structures ci-dessus sont représentées dans le

Tableau 1.

Nom	Fonction
Ether	
Vinyl éther	

Acyl	
Choline	
Ethanolamine	
Inositol	
Sérine	
Glycérol	

Tableau 1 : Liste des fonctions chimiques possibles au niveau des résidus R₁, R₂ et R₃ d'un phospholipide.

Les phospholipides remplissent des fonctions biologiques dans les organismes vivants, comme la structure des membranes cellulaires [Fujiwara, 2002], ou la signalisation cellulaire [Einicker-Lamas, 2003]. De nombreux travaux ont été réalisés sur les phosphatidylcholines (PCs) dont la longueur de chaîne joue un rôle dans la solubilité du cholestérol et dont les compositions structurales sont liées à des maladies comme l'athérosclérose [Dashti, 2011], la leishmaniose [Ramos, 2008], la dystrophie musculaire de Duchenne [Benabdellah, 2009], la lésion du cortex chez le rat [Toback, 1976] et même la mort cellulaire (apoptose) [Ferreira, 2012].

D'autres travaux ont été effectués sur les phosphoéthanolamines (PEs) qui sont impliquées dans le facteur de croissance d'une gamme de cellules de carcinome mammaire de rat [[Kano-](#)

[Sueoka](#), 1979], dans la maladie d'Alzheimer [Conquer, 2000] et la maladie de Huntington [Ellison, 1987]. L'étude de la diversité des lipides et la compréhension des implications fonctionnelles selon leur structure est devenu donc un champ émergent dans le domaine de la lipidomique fonctionnelle [Gross, 2005].

Parmi toutes les techniques d'ionisation, certaines techniques produisent une fragmentation abondante comme l'ionisation par bombardement par atomes rapides (FAB) [Murphy, 1994]. L'ionisation électronique (EI) sur les PCs [Klein, 1971a et b] et l'ionisation chimique (CI) [Crawford, 1983] [Polonsky, 1980] ont été mise de côté pour laisser place à de nouvelles techniques comme la spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS) [Benabdellah, 2010]. En effet, les techniques d'impacts électronique et chimique nécessitent une dérivatisation préalable de l'analyte mais c'est particulièrement la complexité des spectres qui fait que ces techniques sont de moins en moins usitées.

D'autres techniques, plus douces, l'ionisation electrospray (ESI) [Fenn, 1989 et 1990], la désorption-ionisation electrospray (DESI) [Manicke, 2008] et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) [Karas, 1987] [Tanaka, 1988] génèrent des ions intacts pseudo-moléculaires en phase gazeuse pour une majorité de lipides [Murphy, 2001 et 2005] [Harvey, 2005] [Kaufmann, 1996] [Asbury, 1999] [Stubiger, 2007]. Ces techniques d'ionisation douce permettent des études par spectrométrie de masse tandem MS/MS en mode d'ionisation positif [Berry & Murphy, 2004] [Hsu & Turk, 2000a et 2003] et négatif [Hsu & Turk, 2000b et 2009] [Pulfer & Murphy, 2003].

Cependant les phospholipides restent difficiles à analyser du fait de leur très faible solubilité dans des solvants aqueux. Il semblait donc important de développer des techniques alternatives en spectrométrie de masse permettant des analyses structurales de cette classe de molécules. L'APPI fut déterminée comme la méthode de choix pour analyser les PCs

[Delobel, 2005] car elle avait préalablement présenté une bonne sensibilité pour l'analyse de composés non polaires et permettait de fournir des espèces à nombre pair et impair d'électrons conduisant à des voies de fragmentation spécifiques en source. Ce sont d'ailleurs ces travaux qui seront pris comme comparaison dans le paragraphe traitant de la phosphatidylcholine [Delobel, 2005].

Afin de mieux comprendre les processus d'ionisation et de fragmentation, une série de lipides allant du PE au PC, en passant par le N-méthyl PE et le N, N-diméthyl PE, a été étudiée.

Ces différents phospholipides sont reportés dans le **Tableau 2**.

Composé	Abbréviation	Acronyme attribué	Formule	Masse monoisotopique
1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine	18:1/18:1 (Δ^9 -Cis) PE	DOPE	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	743.5465 Da
1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(N-méthyl)-ethanolamine	18:1/18:1 PMe	DOPMe	C ₄₂ H ₇₆ NO ₈ P	757.5622 Da
1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(N,N-diméthyl)-ethanolamine	18:1/18:1 PDe	DOPDe	C ₄₀ H ₇₆ NO ₈ P	771.5778 Da
1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	18:1/18:1 (Δ^9 -Cis) PC	DOPC	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	785.5935 Da
1-oleoyl-2-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	18:1-16:0 PC	-	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	759.5778 Da
1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	16:0-18:1 PC	-	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	759.5778 Da
1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine	16:0-18:1 PE	-	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	759.5778 Da
1-stearoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine	18:0-18:1 PE	-	C ₄₁ H ₈₀ NO ₈ P	745.5620 Da

Tableau 2 : Liste des huit phospholipides étudiés dans ce chapitre.

22. Etude des phospholipides : PC, PMe, PDe et PE

1. Conditions expérimentales

Quantité injectée :	20 μ L à $3 \cdot 10^{-4}$ mol.L ⁻¹
Solvant LC :	MeOH à 300 μ L.min ⁻¹
Dopants :	Aucun

GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1	MCP
50	30	25	450	3	1200	20	150	15	2	2100

Les paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés lors de l'analyse des lipides, ont été ajustés afin d'obtenir un rapport signal/bruit satisfaisant tout en minimisant les processus de collision dissociative au niveau de la source.

Composés	EI (eV)
MeOH	10,84eV

2. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine : DOPC

La DOPC est un phospholipide comprenant deux chaînes d'acides gras C18:1, une fonction glycérol et une tête phosphocholine (*Figure 2*).



Figure 2 : Représentation de la DOPC.

Le tableau suivant (*Tableau 3*) comporte la liste des ions qui sont observés au cours des expériences sur le lipide DOPC et donc plus facilement identifiables au cours de la lecture.

Ions (DOPC)

Ions (DOPC)

m/z 786,60

m/z 772,59

m/z 800,62

m/z 749,51

m/z 603,53

m/z 504,35

m/z 490,34

m/z 462,30

m/z 412,38

m/z 398,42

m/z 384,35

m/z 368,35

m/z 354,33

m/z 339,29

m/z 265,25

m/z 198,09

m/z 184,07

m/z 170,06

m/z 104,07

m/z 90,09

m/z 86,09

m/z 86,09

m/z 72,08

m/z 60,07

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des ion-fragments obtenus lors des diverses fragmentations sur le lipide DOPC.

1. Avec la lampe au krypton (APPI)

Avant d'effectuer les expériences en APPI, une étude de la DOPC en ESI a été effectuée. Les expériences ESI-MS/MS après sélection de l'ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 786,6 mènent à l'ion fragment m/z 184,1 comme pic majoritaire. Celui-ci correspond à l'ion complémentaire (phosphocholine) alors que l'ion correspondant à la perte de la tête polaire (m/z 603,5) n'est pas détecté (*Figure 3*) [Hsu & Turk, 2003, 2009] [Berry & Murphy, 2004].

L'ion phosphocholine est formé grâce à la participation des hydrogènes α en *sn-2* qui sont plus labiles que ceux en *sn-1* (*Figure 4*).

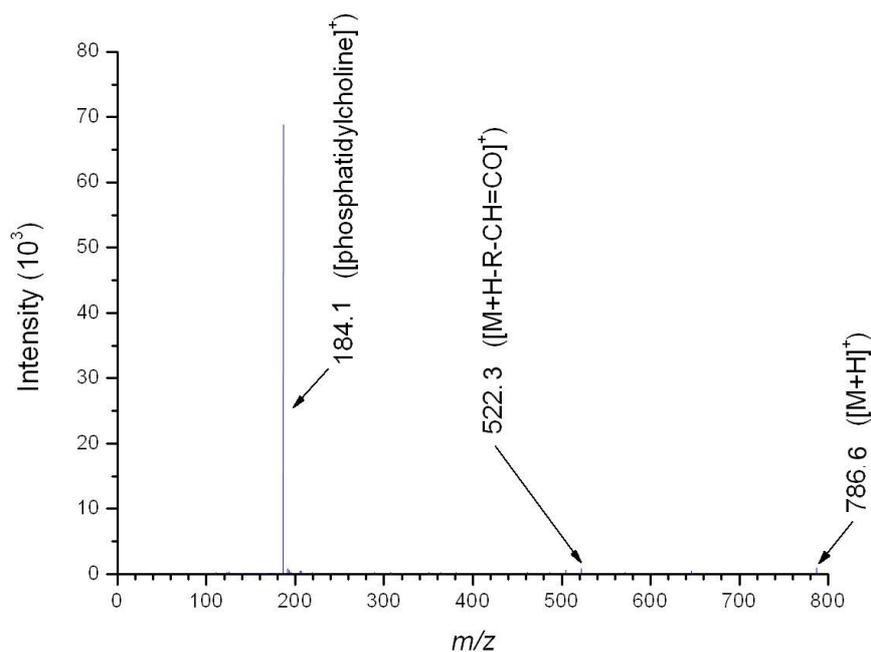


Figure 3 : Spectre de masse ESI-MS/MS de la DOPC (m/z 786,6) enregistré sur le LTQ-Orbitrap à une énergie CID=40. (R = chaîne grasse $C_{17}H_{33}$)

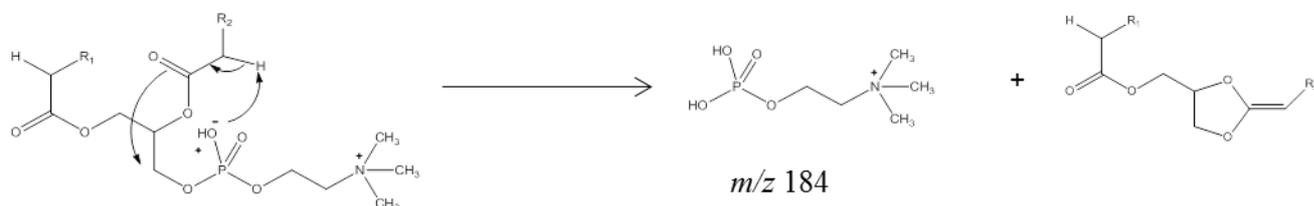


Figure 4 : Formation de l'ion m/z 184 à partir de la phosphatidylcholine [Hsu & Turk, 2003]

En revanche, en APPI-MS, avec la lampe au Krypton, l'ion phosphocholine est présent uniquement à 500°C avec une faible intensité (**Figure 5c**). Ces expériences conduisent également à l'ion précurseur $[M+H]^+$ (m/z 786,6) (**Figure 5a, b, c**) et à la perte de la tête phosphocholine (m/z 603,5 $[M+H-183]^+$) qui représente l'ion majoritaire dans le spectre à toutes les températures.

- a)
- b)

c)

Figure 5 : Spectres de masse APPI de la DOPC à (a) 300°C, (b) 400°C, (c) 500°C avec le MeOH comme solvant LC et sans dopant.

Par ailleurs, les ions fragments à m/z 265,2 et m/z 368,3 indiquent la présence d'une chaîne d'acide gras C18:1 comme précédemment décrits dans les travaux de Delobel [Delobel, 2005].

Le spectre APPI-MS ne présente pas le signal de l'ion m/z 504,3 correspondant à un réarrangement au niveau de la fonction phosphate menant à la perte d'une chaîne grasse (**Tableau 3**), mais celui de l'ion m/z 490,3 qui correspond à l'ion m/z 504,3 ayant perdu un des méthyles de la tête polaire [Delobel, 2005] (**Figure 6**).

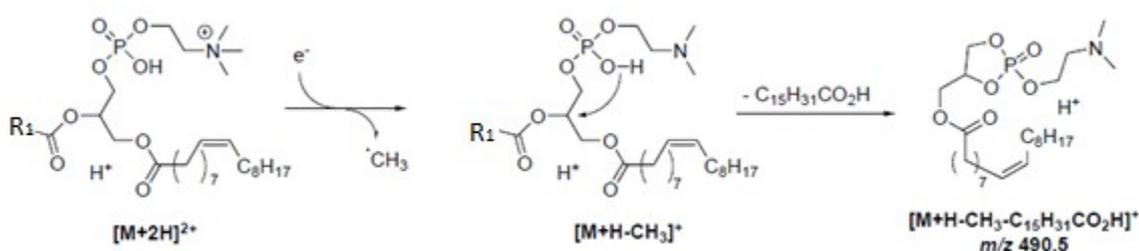


Figure 6 : Mécanisme pour la formation de l'ion m/z 490 [Delobel, 2005]

De même à faible intensité trois ions, formés par réarrangement, sont présents à m/z 412,4, m/z 398,4 et m/z 384,4, et qui sont respectivement l'ion possédant une tête polaire à 3 méthyles, l'ion possédant deux méthyles (perte d'un méthyle) et l'ion possédant uniquement un méthyle (perte de deux méthyles). Les structures supposées sont proposées dans le **Tableau 3**.

Il est à noter que plus la température augmente et plus les signaux des ions cationisés au sodium sont présents sur le spectre. En effet la désolvatation des adduits au sodium se fait

plus difficilement que les espèces protonées, par conséquent leur apparition se produit à des températures plus élevées.

2. Avec le rayonnement synchrotron (SR-APPI)

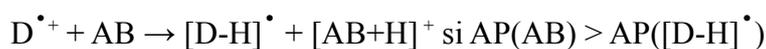
La caractéristique du spectre de masse en APPI-MS avec le faisceau polychromatique (**Figure 7**) est la présence principalement l'ion $[M+H-14]^+$ (m/z 772,6), l'espèce protonée (m/z 786,6), le pic de base à m/z 603,5 correspondant à l'ion fragment ayant perdu la tête polaire phosphocholine et en plus faible intensité à m/z 184,1 l'ion complémentaire phosphocholine.



Figure 7 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec le faisceau polychromatique.

Pour tenter de comprendre le phénomène qui se déroule en APPI, qui est vraisemblablement différent de celui qui se déroule en ESI, l'influence de l'énergie des photons sur la fragmentation de la molécule DOPC a été étudiée.

A 9,0 eV, en dessous du seuil de l'énergie d'ionisation du solvant méthanol, une plus forte intensité relative de l'ion m/z 184,1 (5,6 counts) que l'ion m/z 603,5 (1,0 count) est noté (**Figure 8**). A 10,0 eV, le signal de l'ion m/z 184,1 est toujours plus intense que celui de l'ion m/z 603,5 (**Figure 9**). A 10,8 eV, c'est l'ion m/z 603,5 qui devient l'ion majoritaire (183 counts) (**Figure 10**). Il y aurait ainsi deux mécanismes entrant en jeu, un mécanisme de thermospray mettant en évidence l'ion m/z 184,1 puis un mécanisme de photoionisation favorisant la formation de l'ion m/z 603,5 provenant très vraisemblablement d'un transfert de protons du méthanol comme décrit dans l'équation ci-dessous.



Avec D⁺: méthanol et AB⁺: DOPC.

Le spectres à 9,0 eV et 10,0 eV présentent par ailleurs en commun l'ion à m/z 198,1 qui correspond à l'ion phosphocholine sous la forme $[M+CH_3OH-H_2O+H]^+$, à m/z 206,1 l'adduit au sodium de l'ion phosphocholine sous la forme $[M+Na]^+$, les ions à m/z 800,6 $[M+CH_3OH-H_2O+H]^+$ et m/z 806,6 $[M+Na]^+$.

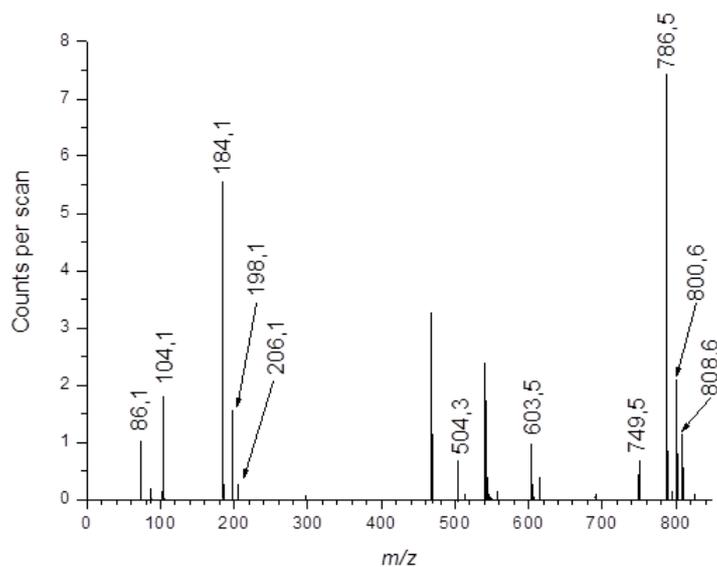


Figure 8 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec une énergie de photons de 9,0 eV.

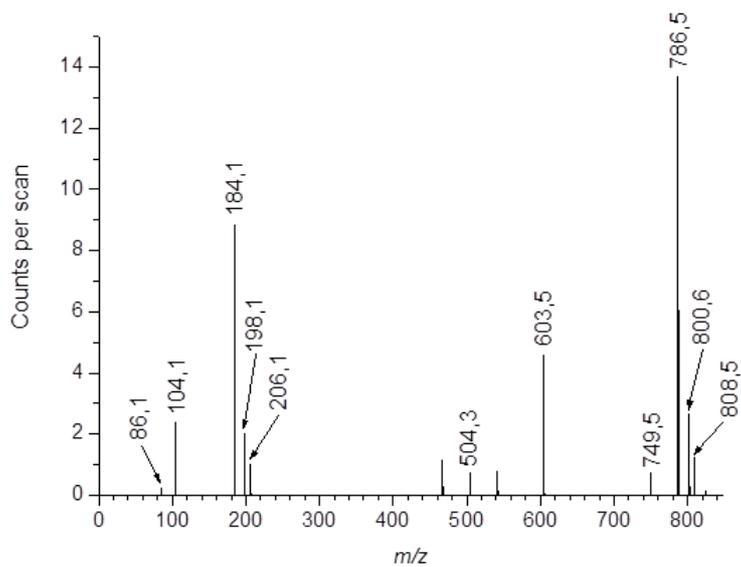


Figure 9 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec une énergie de photons de 10,0 eV.



Figure 10 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif sans dopant et avec une énergie des photons de 10,8 eV.

Comme il a été reporté précédemment en ESI [Hsu & Turk, 2003], la formation favorisée de l'ion m/z 184,1 indique que la forme zwitterionique de l'ion phosphocholine est plus basique que l'ion fragment complémentaire $[M+H-183]^+$. Il semblerait que ce soit ce même mécanisme qui se déroule dans la source APPI (**Figure 4**).

Il a été décrit plusieurs mécanismes pour la formation de l'espèce protonée ayant perdu la tête polaire $[M+H-183]^+$.

$-N(CH_3)_3$

Figure 11 : Formation de l'ion $[M+H-183]^+$ à partir d'une phosphatidylcholine, [Hsu & Turk, 2003].

La **Figure 11** propose un mécanisme plausible correspondant à l'attaque nucléophile de l'oxygène puis perte de la tête polaire avec réarrangement du phosphate, mais le produit final est moins stable que les deux produits proposés ci-dessous en **Figure 12**.

m/z 786,6

m/z 603,5

m/z 603,5

Figure 12 : Formation de l'ion $[M+H-183]^+$ à partir d'une phosphatidylcholine [Delobel, 2005].

Cependant ce mécanisme (*Figure 12*) ne fait intervenir aucune espèces radicalaires réactives donc ce chemin de fragmentation semble être à éliminer pour l'APPI.

Pour tenter de trouver un mécanisme plausible pour la formation de l'ion m/z 603,5 il semble intéressant d'étudier l'évolution de l'intensité des ions fragments en fonction de l'énergie de photon. Cette étude retranscrite dans la *Figure 13* mène à l'observation de deux seuils. Un seuil à environ 10,6 eV donc proche de l'énergie d'ionisation du méthanol ($IE_{\text{théorique}} = 10,84$ eV) et un autre seuil à 9,7 eV qui correspondrait à l'énergie d'ionisation de la molécule.

Figure 13 : Intensité relative de l'ion m/z 603,5 en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Au sein de la molécule, différents sites d'ionisation sont possibles, au niveau de : la fonction ester, alcène ou phosphate. Or le seuil d'ionisation de la molécule obtenu lors des expériences étant de 9,7 eV il est possible de déterminer quelle fonction chimique d'après les valeurs théoriques est en accord avec cette valeur expérimentale. Les valeurs des EI des fonctions esters comme le méthyl propionate ($IE = 10,15$ eV), le méthyl ester ($IE = 10,1$ eV) ou le

méthyl valérate (IE = $10,4 \pm 0,2$ eV) avoisinent toutes les 10,1 eV par conséquent il ne peut s'agir de cette fonction. Les alcènes ont des valeurs d'énergie d'ionisation variées selon la longueur de la chaîne, de la position et du nombre d'insaturation. Cependant aux vues des valeurs des IEs du **Tableau 4**, il semble que la valeur de l'IE de l'alcane de la molécule soit au-dessous de la valeur obtenue de 9,7 eV. Dans la littérature [Colson, 1993], il a été montré uniquement que plus la chaîne carbonée rattachée à la fonction phosphate est longue et plus l'énergie d'ionisation s'en trouve diminuée. Cependant aucune valeur représentative de la fonction phosphate impliquée entre des chaînes grasses et la tête polaire n'étant appropriée, aucune n'a été retenue comme valeur référence. Cependant la fonction phosphate semblerait la plus probable de toutes les fonctions présentes dans la molécule puisqu'elle est riche en électrons et donc conviendrait parfaitement comme site d'ionisation.

Composés	IE (eV)
methyl propionate	10,15
methyl ester	10,1
méthyl valérate	$10,4 \pm 0,2$
octane	9,8
heptane	9,9
2-hexene	8.97 ± 0.02
2-heptene	8.84 ± 0.02
3-heptene	8.92
H ₃ PO ₄	12,10
H ₂ PO ₄ ⁻	5,23
(CH ₃) ₂ HPO ₄	11,65
(CH ₃) ₂ PO ₄ ⁻	5,33

Tableau 4 : Energies d'ionisation de divers composés organiques (valeurs obtenues sur le NIST Webbook, [http : //webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov)) à l'exception du phosphate [Colson, 1993].

Il est à noter que le spectre de masse avec le faisceau polychromatique (**Figure 5**) présente également un ion m/z 772,6 qui correspond à la perte du radical méthyl CH₃[•]. En étudiant

l'évolution de l'intensité de cet ion fragment en fonction de l'énergie de photon on note la présence des deux mêmes seuils que précédemment (**Figure 14**). Le seuil correspondant à l'énergie d'ionisation du méthanol à 10,7 eV et le seuil correspondant à l'énergie d'ionisation supposée de la fonction phosphate de la molécule 9,7 eV. Il semble que ces deux ions (m/z 603,5 et m/z 772,6) proviennent de voies de fragmentation similaires.

Figure 14 : Intensité relative de l'ion m/z 772,6 en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

En étudiant le rapport de l'intensité de l'ion m/z 603 sur celle de l'ion m/z 772, il a été observé qu'à partir de 9,8 eV le rapport reste stable (**Figure 15**). Ceci indique que l'ion m/z 772,6 est très vraisemblablement le précurseur de l'ion m/z 603,5.

(%)

Figure 15: Rapport (%) entre les intensités de l'ion m/z 603 ($[M+H-183]^+$ correspondant à la perte de la tête polaire et de l'ion m/z 772 ($[M+H-CH_3]^+$ correspondant à la perte du radical méthyl en fonction de l'énergie de photon enregistré par SR-APPI-MS. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

En partant du postulat que la fonction phosphate se photoionise, un mécanisme est proposé pour la formation de l'ion m/z 772,6 (**Figure 16**). Après photoionisation de la molécule, il y a éjection d'un électron qui est piégé par la choline, puis éjection du radical méthyl. Le solvant méthanol permet l'apport d'un radical hydrogène et un proton provenant du milieu s'additionne sur la molécule neutre afin de reprotoner l'ion fragment m/z 772,6.



Figure 16 : Mécanisme proposé de la perte du radical à partir de l'espèce protonée.

L'ion m/z 603,5 serait donc formé à partir de l'ion m/z 772,6 qui subirait le mécanisme précédemment proposé et non directement à partir de l'espèce protonée (m/z 786,6) comme Delobel l'avait suggéré [Delobel, 2005]. Ce mécanisme serait plausible dans ce cas puisque la molécule aurait déjà subi une photoionisation (**Figure 17**).

m/z 603,5

m/z 772,6
 m/z 603,5

Figure 17 : Mécanisme proposé de la perte de la tête polaire à partir de l'ion déméthylé

m/z 772.

Pour confirmer le mécanisme décrit uniquement en APPI, il est nécessaire d'étudier l'intensité, en fonction de l'énergie des photons, d'un ion fragment commun avec la technique d'ionisation de l'ESI. L'ion m/z 504,3 qui correspond à la perte d'une chaîne d'acide gras C18 :1 de façon indifférenciée sur la chaîne en *sn*-1 ou *sn*-2 a été choisi.

L'étude montre une courbe stable en fonction de l'énergie de photons utilisée jusqu'à 10,6 eV (**Figure 18**). Il faut noter que les expériences ont été menées sur la ligne DISCO (**Figure 18**) avec la fenêtre en MgF₂ séparant la ligne du pompage différentiel et dont la transmission est proche de zéro à 114 nm (10.88 eV) [Giuliani, 2011].

Figure 18 : Intensité relative de l'ion m/z 504,3 correspondant à la perte de la chaîne C18:1 en $sn-1$ ou $sn-2$ en fonction de l'énergie de photon. Le trait sert à donner une ligne directrice.

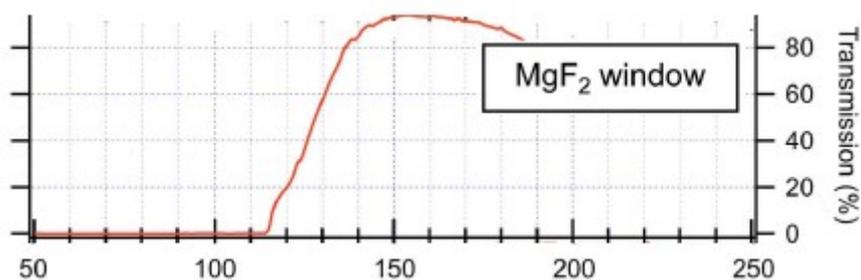


Figure 19 : Transmission enregistrée de 50 à 250 nm dans l'air à une atmosphère (1013 hPa) avec une fenêtre en MgF₂ séparant la ligne du pompage différentiel.

Par conséquent il est normal qu'à partir de la valeur 10,6 eV on note une baisse de flux de photons. La diminution de l'intensité des ions donc visible sur les prochaines courbes en fonction de l'énergie des photons est due à une absence de correction par le flux de photons. Cette correction qui consiste à soustraire le flux de photon à l'intensité des ions de chacun des spectres obtenus pour chacune des expériences aurait été fastidieuse.

Ainsi la formation de l'ion m/z 504,3 n'évolue en aucun cas en fonction de l'énergie de photons et donc subit un mécanisme de dissociation thermique (**Figure 20**).

m/z 504
 m/z 786

Figure 20 : Mécanisme pour la formation de l'ion m/z 504 à partir de la DOPC

[Hsu & Turk, 2003]

Les spectres obtenus en utilisant la lampe au krypton avaient précédemment présenté un ion m/z 490,3 (**Tableau 3**) qui correspondait à l'ion m/z 504,3 provenant de l'ion parent ayant perdu une fonction méthyl puis une chaîne C18-1. A l'inverse ici le spectre SR-APPI ne présente pas l'ion m/z 490,3 mais l'ion m/z 504,3. Aucune explication rationnelle n'a été proposée jusqu'à présent pour expliquer la dissociation plus facile de l'ion m/z 504,3 en m/z 490,3 avec le faisceau polychromatique.

Il est à noter également la présence de l'ion m/z 198,1 (184+14) qui correspondrait à une probable méthylation subit en source. Cette méthylation est vraisemblable puisque le milieu est pourvu de méthanol. Deux sites de méthylation peuvent être possibles ; l'un sur la fonction phosphate et l'autre sur la tête polaire. Les spectres MS/MS de l'ion m/z 198,1 et m/z 184,1 de la DOPC ont été comparés et l'unique fragment résultant leur étant commun est l'ion m/z 86,1 qui comporte la tête polaire (**Tableau 3**). Par conséquent c'est la fonction phosphate qui a subit la méthylation (**Figure 21**).

Figure 21 : Réaction chimique proposée pour la méthylation à partir de l'ion phosphocholine m/z 184.

3. Avec le toluène comme dopant (SR-APPI)

Une dernière expérience a été menée en utilisant un dopant, le toluène ($10\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). On note une unique différence entre le spectre avec dopant et sans dopant. Le spectre avec toluène a

permis d'augmenter l'intensité de certains ions, et particulièrement l'ion m/z 772,6 $[M+H-14]^+$ d'un facteur 4 avec l'ajout de dopant (**Figure 22**). Ainsi le toluène favorise le mécanisme de perte de $\cdot\text{CH}_3$ par transfert d'électrons.

L'ion m/z 772,6 peut donc être formé à partir d'un transfert de charge intramoléculaire ou d'un transfert de charge à l'aide du toluène utilisé comme dopant.

La **Figure 22** présente également un ion à m/z 170,1 uniquement détectable en additionnant le toluène. Cet ion signe l'ion phosphodiméthyl et sa présence dans ce spectre DOPC confirme que le toluène, comme dopant, permet la perte de CH_3 .

Cependant il faudra effectuer d'autres expériences avec le toluène afin de déterminer les seuils d'ionisation des composés mis en jeu et ensuite proposer et/ou confirmer cette théorie.

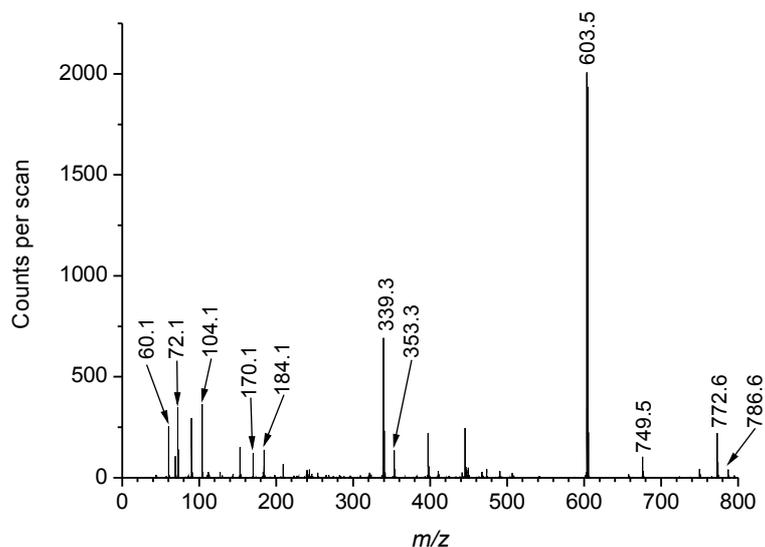


Figure 22 : Spectre de masse APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant avec le faisceau polychromatique.

3. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-N,N-dimethylethanolamine : DOPDe

La DOPDe se différencie de la DOPC uniquement par la présence de 2 méthyls sur la tête polaire au contraire de la DOPC qui en possède 3 (**Figure 23**).

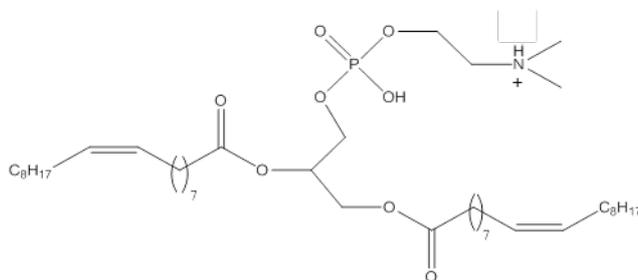


Figure 23 : Représentation de la DOPDe.

Ions (DOPDe, DOPMe, DOPE)

Ions (DOPDe, DOPMe, DOPE)

m/z 494,32

m/z 480,31

m/z 476,31

m/z 462,30

m/z 308,29

m/z 142,07

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des ion-fragments obtenus lors des diverses fragmentations sur les phospholipides. De nombreux ions des spectres DOPDe, DOPMe, DOPE sont communs à ceux de la DOPC par conséquent n'ont pas été répétés.

Le spectre SR-APPI de la molécule avec le faisceau polychromatique (**Figure 24**) présente des ions similaires à ceux obtenus avec la molécule DOPC mais décalés de moins 14 u.m.a pour les fragments comportant la tête polaire. Le spectre montre l'espèce protonée $[M+H]^+$ à m/z 772,6 (correspondant à l'ion à m/z 786 ayant perdu une fonction méthyl), l'ion à m/z 490,51 (correspondant à l'ion à m/z 504 ayant perdu une fonction méthyl), l'ion phospho-N,N-dimethylethalamine à m/z 170,1 (correspondant à l'ion phosphocholine à m/z 184 ayant perdu une fonction méthyl) et la présence de l'ion à m/z 72,1 (correspondant à l'ion à m/z 86 ayant perdu une fonction méthyl). Les ions qui ne comportent pas la tête polaire sont également présents comme le pic majoritaire correspondant à l'ion m/z 603,5 ou l'ion m/z 339,49.

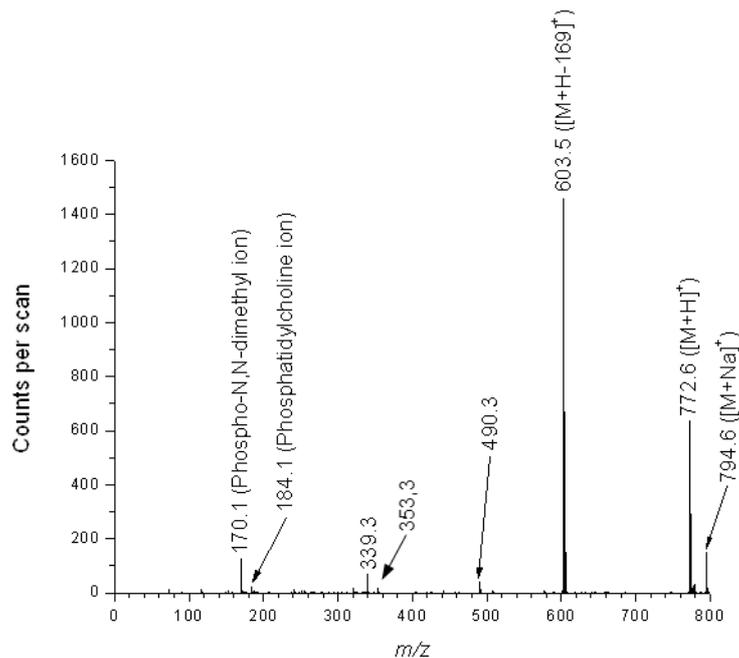


Figure 24 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPDe à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif sans dopant avec le faisceau polychromatique.

L'ion phosphocholine à m/z 184,1 est présent malgré la présence de l'ion phospho-N,N-diméthylethanolamine à m/z 170,1. Cet ion m/z 184,1 n'est pas l'ion phosphocholine mais un ion diméthylé qui provient également d'une méthylation subit en source. En effet, les spectres MS/MS de l'ion m/z 184,1 et m/z 170,1 de la DOPDe ont été comparés et l'unique fragment résultant leur étant commun est l'ion m/z 72,1 qui comporte la tête polaire (**Tableau 5**).

L'étude de l'intensité des ions m/z 170,1, m/z 184,1 et leur complémentaire m/z 603,5 comme l'espèce protonée m/z 772,6 permet d'obtenir un seuil d'ionisation à $\sim 10,6$ eV proche de l'énergie d'ionisation du méthanol (IE= 10,84 eV) (**Figures 25, 26, 27, 28**).



Figure 25 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 170 correspondant à l'ion phospho-N,N-diméthylethanolamine en fonction de l'énergie de photons. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

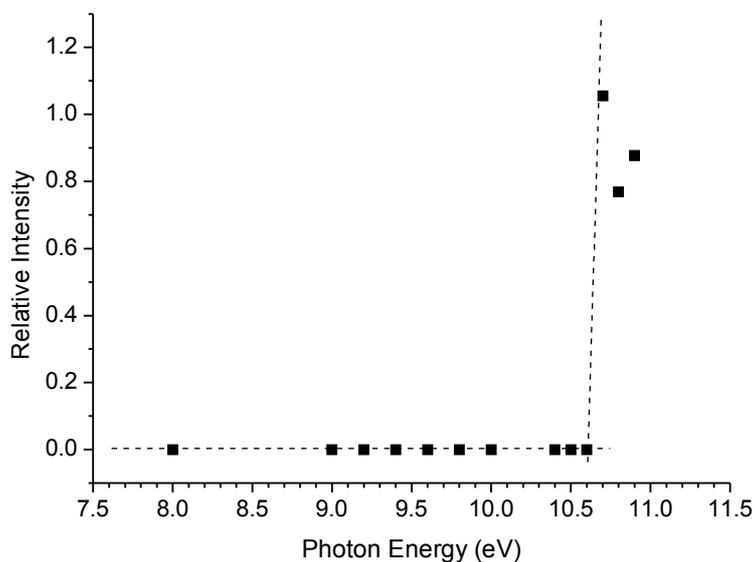


Figure 26 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 184 correspondant à l'ion phosphocholine en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.



Figure 27 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 603 correspondant à la perte de la tête polaire de la DOPDe $[M+H-169]^+$ en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.



Figure 28 : Intensité relative du pic de l'espèce protonée $[M+H]^+$ à m/z 772 en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

L'absence ou la présence non observable dans le cas de la DOPDe, par rapport à la DOPC, du seuil d'ionisation de la fonction phosphate, confirme l'hypothèse émise précédemment quant à la perte d'un radical méthyl. L'ionisation de la fonction phosphate dans le cas du DOPC est donc une étape préliminaire afin d'obtenir les ions fragments ayant perdus la tête polaire. Ainsi avec le DOPC, il y a ionisation de la fonction phosphate afin de perdre un ion radical et passer par une fonction diméthyl. L'ionisation de la fonction phosphate dans le cas de la DOPDe est de type thermique.

4. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-N-methylethanolamine : DOPMe

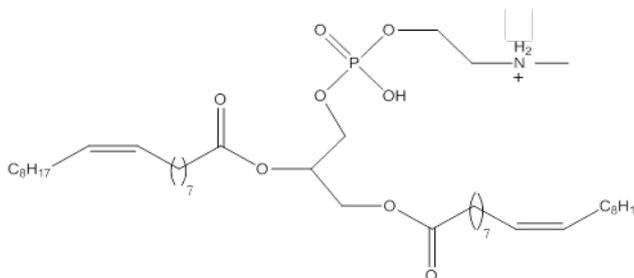


Figure 29 : Représentation de la DOPMe.

La **Figure 29** présente la structure du phospholipide DOPMe.

Le spectre de masse SR-APPI (**Figure 30**) de la DOPMe obtenu avec le faisceau polychromatique montre l'espèce protonée à m/z 758,6, l'ion majoritaire à m/z 603,5

correspondant à la perte de la tête polaire et le m/z 339,3 correspondant à la perte d'une chaîne latérale et à un réarrangement avec la fonction phosphate.

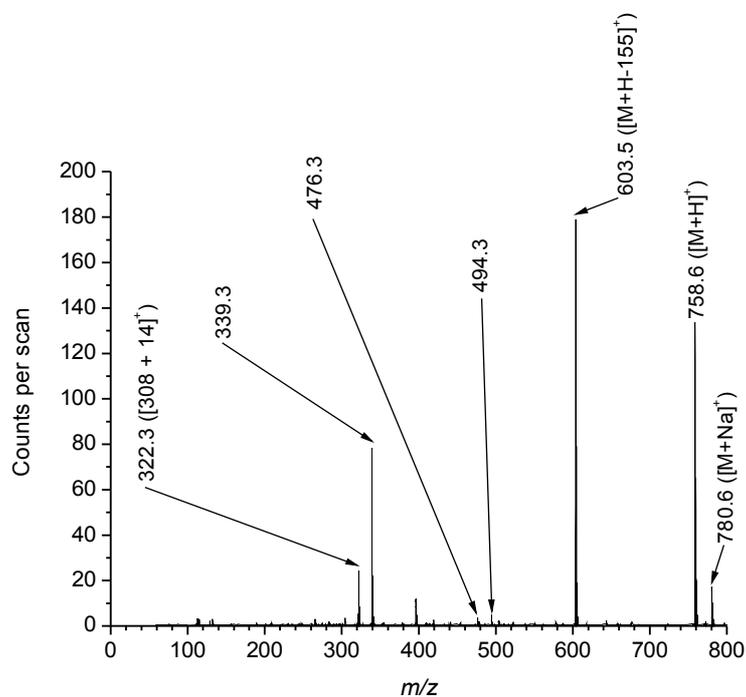


Figure 30 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPMe à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif sans dopant avec le faisceau polychromatique.

Le spectre présente également à m/z 476,3 l'ion correspondant à la perte de la chaîne en *sn*-1 et *sn*-2 indistinctement. Cet ion correspond à l'ion m/z 490,5, obtenu avec le DOPDe avec une perte de 14 u.m.a ou l'ion m/z 504,3, obtenu avec le spectre DOPC, avec deux pertes de 14 u.m.a. Le spectre de la molécule DOPMe présente par ailleurs la perte d'une chaîne d'acide gras avec un réarrangement conformationnel au niveau du phosphate à m/z 476,3 comme Delobel *et al.* [Delobel, 2005] l'ont décrit pour le DOPC et sous forme non réarrangée à m/z 494,3 (**Tableau 5**).

Le spectre montre également à m/z 322,3 dont le mécanisme est décrit ci-dessous (**Figure 31**).

OH

OH

*

Figure 31 : Mécanisme proposé pour l'ion m/z 322.

L'annotation [*] correspond à la référence de [Berry & Murphy, 2004].

L'ion fragment m/z 322,3 pourrait provenir d'une seconde population d'ions à m/z 494 possédant son site de protonation non pas sur l'amine mais sur le groupement ester. La paire d'électrons célibataires localisée sur l'atome d'azote génère une attaque nucléophile sur le carbone de la fonction carbonyle protonée, résultant en une nouvelle liaison azote-carbone-oxygène. Finalement, un réarrangement menant à une rupture en α de la fonction phosphate mène à l'ion m/z 322,3 qui comporte la nouvelle liaison azote-carbone. Ce mécanisme est possible uniquement si le site de protonation est localisé sur le groupement ester.

L'ion phospho-N-méthyl à m/z 156 ou son équivalent diméthylé ou triméthylé est absent de ce spectre au contraire des précédents spectres de la DOPC et la DOPDe. Apparemment contrairement à la DOPC l'ion zwitterionique phospho-N-méthylethanolamine est moins basique que son ion zwitterionique complémentaire $[M+H-155]^+$.

5. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine : DOPE

La DOPE est un phospholipide comprenant deux chaînes d'acides gras C18 :1, une fonction glycérol et une fonction éthanolamine (**Figure 32**).



Figure 32 : Représentation de la DOPE.

1. Avec la lampe au krypton (APPI)

Les spectres MS avec la DOPE montrent le précurseur $[M+H]^+$ (m/z 744.6) (**Figure 33a, b, c**) et l'ion correspondant à la perte du groupement phosphoéthanolamine (PE) (m/z 603,5). Cet ion représente le pic majoritaire du spectre à 500°C. A 300 et 400°C, le pic majoritaire est l'ion précurseur $[M+H]^+$.

- a)
- b)
- c)

Figure 33 : Spectres de masse APPI de la DOPE à (a) 300°C, (b) 400°C, (c) 500°C avec le MeOH comme solvant LC et sans dopant.

Des expériences précédentes par ESI MS/MS [Berry & Murphy, 2004], [Hsu & Turk, 2000 et 2009] et refaites au laboratoire (**Figure 34**) mènent à des spectres comportant un pic majoritaire correspondant à l'ion fragment ayant perdu un groupement phosphoéthanolamine et une absence de l'ion phosphoéthanolamine qui est l'ion complémentaire (m/z 142) ainsi qu'une forte intensité de l'ion fragment correspondant à la perte de la tête polaire. Ces caractéristiques se retrouvent dans les expériences effectuées en APPI. Il semble évident qu'il

s'agisse du même chemin de fragmentation [Karin, 2004], [Hsu & Turk, 2000 et 2009]. Les spectres de la DOPE présentent des ions fragments à m/z 339,3 ; m/z 462,3 et m/z 480,3 (**Tableau 5**) comme pour le DOPC précédemment décrits par Delobel [Delobel, 2005], permettant d'identifier les pertes de deux chaînes d'acides gras, C18:1 (m/z 265,36 et m/z 339,40) dans notre cas. L'ion m/z 480,40 présent dans le spectre de la DOPE correspond à l'ion à m/z 494,3 du DOPMe moins une fonction méthyl donc 14 u.m.a.

Deux signaux au rapport m/z pair (m/z 124,1 et m/z 308,3) (**Figure 33**) permettent de conclure qu'ils contiennent un azote mais qu'ils sont formés en utilisant un chemin réactionnel original. L'ion à m/z 308,3 provient du même mécanisme que celui proposé pour l'ion à m/z 322,3 avec la DOPMe. L'ion fragment m/z 124,08 correspond à l'ion $[M+H-620]^+$ à partir du clivage de la liaison C(3)-O-P précédemment décrit [Hsu & Turk, 2009] qui avait été détecté pour l'espèce cationisée au lithium dans leur cas.

-141

Figure 34 : Spectre ESI-MS/MS de la DOPE protonée (m/z 744) (CID=40) enregistré avec le LTQ-Orbitrap. R étant la chaîne d'acide gras C18 :1

Comme précédemment décrit, les calculs de l'énergie d'ionisation du groupement ester donnent une valeur de 10,1 eV. Comme la lampe génère des photons à 10,6 eV donc au-dessus de la valeur de EI de l'ester (IE = 10,1 eV) alors la photoionisation est possible. Donc à partir des calculs théoriques, la protonation semble être confirmée se situer sur un autre site que celui de la tête amine, et permet d'apporter à la molécule des chemins de fragmentation différents et variés. Par conséquent, il est envisageable que la molécule soit ionisée aussi sur la fonction phosphate et suive un chemin réactionnel identique à celui décrit dans le paragraphe avec la DOPC.

2. Avec le rayonnement synchrotron (SR-APPI)

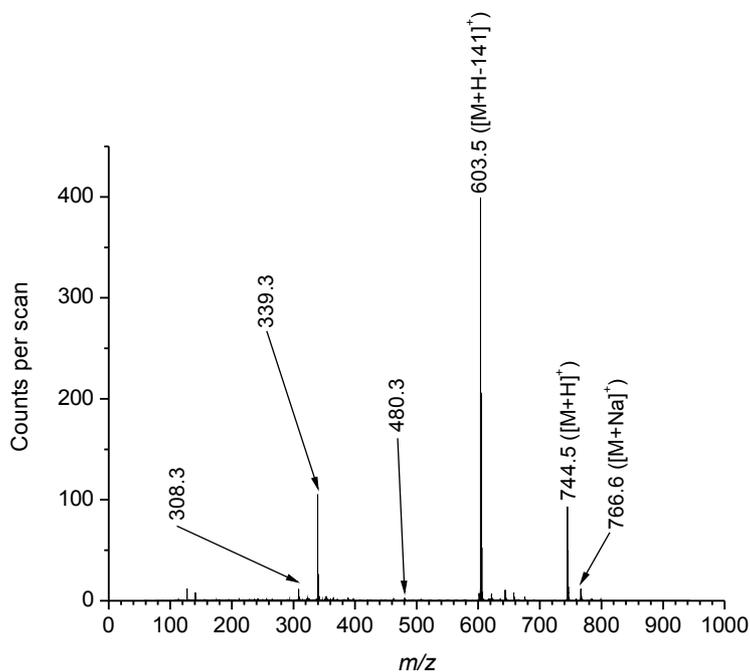


Figure 35 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPE à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif sans dopant avec le faisceau polychromatique.

Le spectre de masse SR-APPI de la DOPE permet d'observer comme avec la lampe au krypton les ions m/z 308,3, m/z 339,3 et m/z 480,3 mais avec des intensités différentes (**Figure 35**). Les deux seuils à 9,7 eV et 10,6 eV dans le cas de la DOPE correspondent respectivement à l'énergie d'ionisation de la fonction phosphate et du solvant méthanol (**Figure 36**).



Figure 36: Intensité relative du pic de l'ion m/z 603 $[M+H-141]^+$ en fonction de l'énergie de photons. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

La molécule DOPE subit donc le même mécanisme que précédemment décrit avec le DOPC mais implique une perte d'un hydrogène radical à la place d'un radical méthyl (**Figure 37**).

Les spectres ESI, APPI et SR-APPI présentent le même ion, à m/z 308,3. Il peut être immédiatement suggéré que cet ion est généré par le mécanisme de type thermique (**Figure 38**). L'intensité de cet ion augmente en fonction de la température en APPI signifiant que le mécanisme de formation n'implique pas d'électrons. De plus, il y a une apparition du pic de l'ion m/z 308,3 lorsque la valeur de l'énergie d'ionisation du méthanol est atteinte et subit une augmentation d'un facteur de 6 jusqu'à la valeur de 11 eV (**Figure 39**). L'ionisation du méthanol, considérée comme dopant, permet le transfert d'hydrogène radicalaire grâce à la réaction suivante :



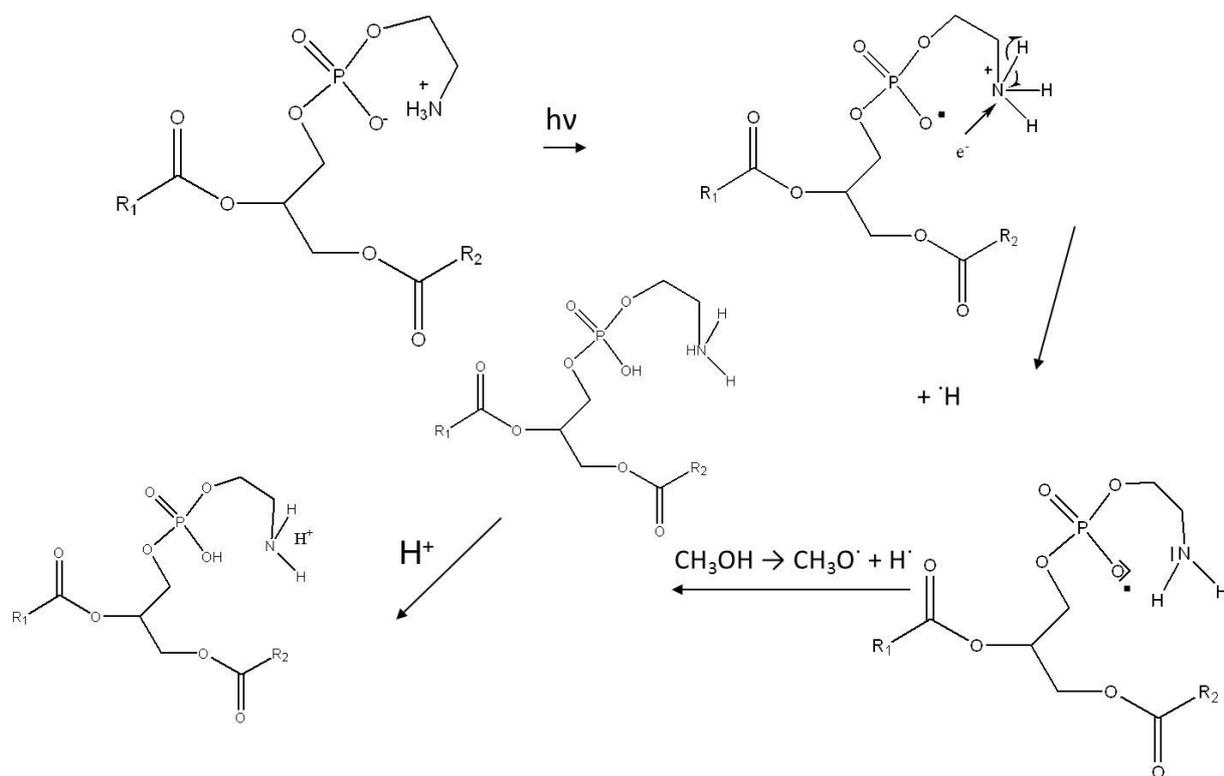


Figure 37 : Mécanisme proposé pour la perte du radical hydrogène à partir de l'espèce protonée.

OH

OH

*

Figure 38: Mécanisme proposé pour la formation de l'ion m/z 308 pour la DOPE.

L'annotation [*] correspond à la référence de [Berry & Murphy, 2004].



Figure 39 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 308 en fonction de l'énergie de photons. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

6. C18:1 – C16:0 PC et C16:0 - C18:1 PC

Le but ici en étudiant deux molécules identiques mais avec une inversion en position *sn*-1 et *sn*-2 est d'étudier le comportement des chaînes d'acide gras lors de la fragmentation par APPI (**Figure 40**).

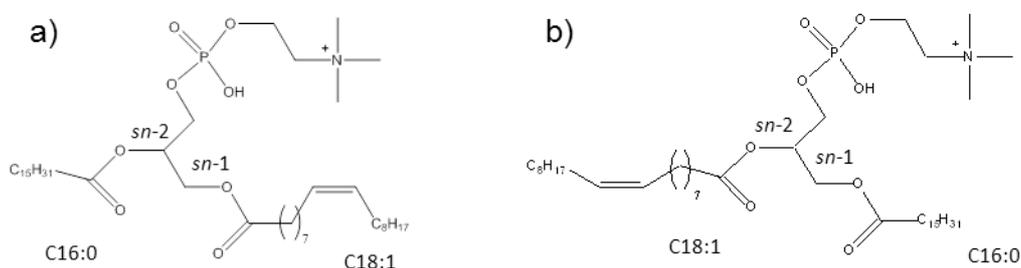


Figure 40 : Représentation de la a) C18:1 – C16:0 PC et b) C16:0 - C18:1 PC.

Ions (C18:1 – C16:0 PC, C16:0 - C18:1 PC)

Ions (C18:1 – C16:0 PC, C16:0 - C18:1 PC)

m/z 760,57

m/z 746,57

m/z 723,49

m/z 577,51

m/z 577,51

m/z 478,33

m/z 464,31

m/z 445,27

m/z 419,25

m/z 384,40

m/z 313,27

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des ion-fragments obtenus lors des diverses fragmentations sur les phospholipides. De nombreux ions des spectres C18:1 – C16:0 PC et C16:0 - C18:1 PC sont communs à ceux de la DOPC par conséquent n'ont pas été répétés.

- a)
- b)

Figure 41: Spectre de masse APPI de la (a) 18:1 – 16:0 PC et la (b) 16:0 – 18:1 PC à 450°C avec le MeOH utilisé comme solvant LC sans dopant avec la lampe au krypton.

a)
b)

Figure 42 : Spectre de masse SR-APPI de la (a) 18:1 – 16:0 PC et la (b) 16:0 – 18:1 PC à 450°C avec le MeOH utilisé comme solvant LC sans dopant avec le rayonnement synchrotron.

Il existe de nombreux travaux concernant l'étude des fragmentations favorisées des acides gras selon la position *sn*-1 et *sn*-2 sur la fonction glycérol [Al-Saad, 2003], [Vernooij, 2002], [Nakanishi, 2009], [Berry & Murphy, 2004], [Hsu & Turk, 2003]. Cependant aucun modèle ne peut être appliqué car la perte favorisée ou non des chaînes d'acides gras dépend de leur longueur et également du type de tête polaire du phospholipide analysé. Les travaux de Delobel *et al.* en APPI avaient permis de déterminer expérimentalement les pertes en *sn*-1 et *sn*-2 de quelques phospholipides [Delobel, 2005]. Cependant après les expériences faites avec la lampe au krypton et avec le faisceau polychromatique des mêmes phospholipides étudiés dans ce paragraphe, aucune prédiction sur la perte favorisée en *sn*-1 ou *sn*-2 n'a été possible. En revanche, les résultats obtenus peuvent servir de modèle pour des molécules similaires au niveau de la chaîne et de la tête polaire.

Pour la molécule C16 :0-C18 :1, avec la lampe au krypton (**Figure 41b**), l'ion m/z 464,3 (perte de *sn*-2) est plus intense que l'ion m/z 490,3 (perte de *sn*-1) (**Tableau 6**). Alors que c'est la perte de la chaîne d'acide gras en *sn*-1 (m/z 504,3) qui est favorisée par rapport à celle en *sn*-2 (m/z 478,3) (**Figure 42b**) avec le rayonnement synchrotron.

Dans le cas de la molécule C18:1-C16:0 avec la lampe au krypton (**Figure 41a**) c'est la perte de la chaîne d'acide gras en *sn*-2 qui est favorisée (m/z 464,3). En revanche, dans le cas du rayonnement synchrotron, aucune perte n'est favorisée, l'intensité des deux ions est équivalente (**Figure 42a**). Même si les expériences faites avec la lampe au krypton ont confirmé les expériences faites par Delobel *et al.*, le fait que ces expériences ne puissent pas être reproductibles avec le faisceau polychromatique ne permet pas de conclure à ce que l'APPI soit une technique viable pour la détection des pertes favorisées en *sn*-1 ou *sn*-2.

7. Phospholipides insaturés avec le chloroforme

Des expériences ont porté sur l'utilisation non plus du méthanol comme solvant mais du chloroforme. Pour cela la molécule analysée choisie arbitrairement a été la 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine. Aucun dopant n'a été utilisé afin de s'affranchir de tout effet externe qui pourrait interagir lors de la réaction. Les concentrations et paramètres du spectromètre ont été optimisés dans le but d'obtenir le meilleur signal-sur-bruit (**Tableau 7**).

Le fait de faire interagir du chloroforme avec l'insaturation d'une molécule pourrait mener à réaction de dichlorocyclopropanation (**Tableau 8**).

Quantité injectée :	20 μ L à 3.10^{-4} mol.L ⁻¹
Solvant LC :	CHCl ₃ à 400 μ L.min ⁻¹
Dopants :	Aucun

GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1	MCP
50	20	25	400	3	1200	20	100	15	2	2100

Tableau 7 : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés lors de l'analyse du phospholipide DOPE.

Composés	EI (eV)
Carbène	~ 5 eV
CHCl ₃	11,37 eV (seuil à 9,05 eV)

Tableau 8 : Energies d'ionisation des carbènes et du chloroforme. Valeurs obtenues sur le *NIST Webbook* [Linstrom, 2005] [Lee & Suto, 1987] [Brownsword, 1997].

Les carbènes sont des composés possédant un atome de carbone neutre divalent avec 6 électrons sur sa couche de valence. Ce carbone est lié à deux groupes adjacents par liaison covalente et possède donc 2 électrons non liants. Les carbènes sont utilisés comme des intermédiaires transitoires très réactifs en synthèse organique mais peuvent être aussi engagés dans des complexes organométalliques. C'est donc grâce à la réactivité du carbène excité par

les photons que la réaction a lieu. Il existe deux états fondamentaux [Lennard-Jones & Pople, 1951] [Walsh, 1953] : l'état singulet et triplet. Les carbènes triplets et singlets à couche de valence libre sont considérés comme des diradicaux. Le dichlorocarbène généré avec la lampe au krypton donc par photochimie à 10 eV fait partie de la catégorie des carbènes singlets. Le carbène le plus stable sous forme singlet a une demi-vie au moins illimitée [Arduengo, 1997]. Les carbènes singlets à couche de valence remplie semblent réagir comme de forts électrophiles car dominés par la couche de valence déficiente au niveau du carbone. Les groupements mésomères comportant deux électrons donneurs (chlore) rendent l'état singlet plus favorable, parce qu'ils apportent une densité électronique supplémentaire à la couche de valence déficiente du carbone et stabilisent thermodynamiquement l'état et la géométrie. L'état singlet possède une géométrie triangulaire possédant trois orbitales remplies par deux paires d'électrons et par une orbitale vide. Leur réaction est concertée et asymétrique (**Figure 43**), les électrons du diradical dans la même orbitale moléculaire réagissent en même temps et donc la réaction est stéréosélective.

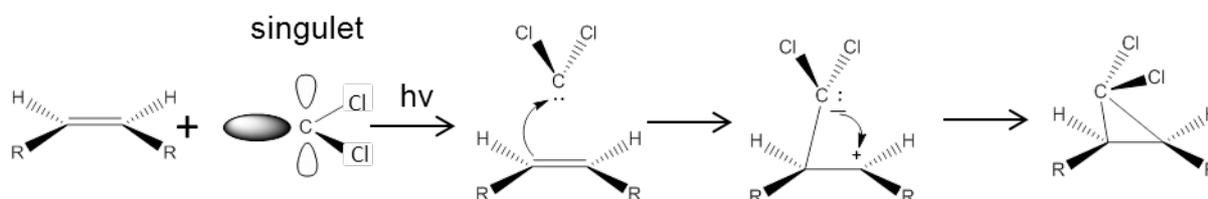


Figure 43 : Mécanisme réactionnel stéréosélectif de dichlorocyclopropanation du carbène singulet sur un alcène d'après [Skell & Garner, 1956] et [Hoffman, 1968].

1. Photochimie du chloroforme

Une étude a été effectuée sur la comparaison des spectres de photoabsorption avec les rendements de fluorescence due à la photodissociation du chloroforme [Lee & Suto, 1987]. La seconde bande de fluorescence dont le seuil se situe à 137 nm (9,05 eV) y est décrite comme

corrélée à un état répulsif centré à 109,7 nm (énergie verticale de 11,3 eV) qui se dissocie selon la réaction (1) :



où la perte de HCl à haute énergie est exclue.

La dynamique de photodissociation du chloroforme a été étudiée par un autre groupe [Ying & Leung, 1995] qui a déterminé les rendements quantiques noté f_H pour la production d'atome d'hydrogène (*Tableau 9*).

I (nm)/ E (eV)	f_H
193,3/6,4 eV	0
157,6/7,9 eV	0,13
121,6/10,2 eV	0,23

Tableau 9 : rendements quantiques f_H en fonction de la longueur d'onde (nm) et l'énergie des photons (eV).

À basse énergie la photochimie du chloroforme est dominée par la perte d'atome de chlore. Lorsque l'énergie d'excitation augmente, la production d'atome d'hydrogène devient compétitive. Sur la base de l'analyse des distributions d'énergie de translation, la formation d'atome d'hydrogène est proposée avoir lieu à partir d'un intermédiaire «chaud» (indiqué par \parallel) produit par une transition non-adiabatique depuis l'état excité (indiqué par $**$) [Brownsword, 1997] :



2. Conséquences pour l'APPI

Le tableau suivant donne les enthalpies de formation (ΔH_R^{298}) (*Tableau 10*). L'énergie disponible pour la réaction photochimique après photoabsorption par la lampe au krypton peut se calculer par $E_{\text{ex}} = h\nu$ (10 eV = 964,5 kJ/mol).

Réactions	ΔH_R^{298} (kJ/mol)	E_{ex} (kJ/mol)
$CHCl_3 \rightarrow CCl_3 + H$	392,4	572,1
$CHCl_3 \rightarrow CCl_2 + Cl + H$	681,6	282,9

Tableau 10 : Enthalpies de formation (ΔH_R^{298}) et énergie disponible pour la réaction photochimique après photoabsorption (E_{ex}) [Brownsword, 1997].

Il apparaît que ces deux réactions suggérées dans la littérature [Brownsword, 1997] sont énergétiquement possibles à 10 eV. Le chloroforme irradié par les photons de la lampe au krypton peut se décomposer pour former des atomes de chlore, d'hydrogène ou le dichlorocarbène dans un état singulet excité.

3. Etude avec la lampe au krypton

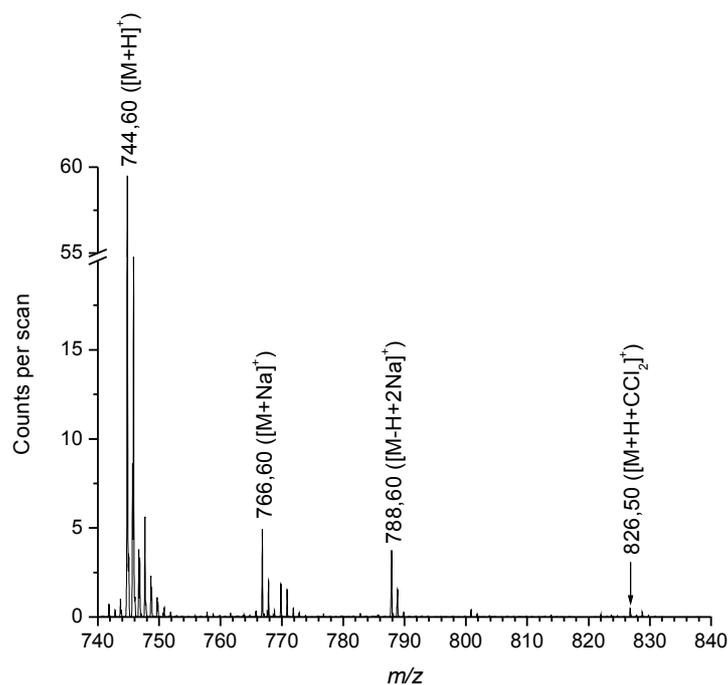


Figure 44 : Zoom de la région [740-840] du spectre de masse APPI du DOPE à 450°C avec le chloroforme utilisé comme éluant et solvant sans dopant avec la lampe au krypton.

La **Figure 44** représente le zoom de la région [740-840] du spectre de masse APPI du DOPE à 450°C avec le chloroforme comme éluant et solvant. Le zoom du spectre présente l'espèce protonée à m/z 744,60, les adduits au sodium $[M+Na]^+$ et $[M-H+2Na]^+$ respectivement à m/z 766,60 et m/z 788,60 et un signal à m/z 826,50 avec une intensité faible (0,6 counts par scan).

Afin d'identifier le massif isotopique correspondant à cette valeur de rapport masse sur charge un zoom a été effectué sur ce signal à m/z 826,50 et est représenté à la **Figure 45**. Le massif isotopique expérimental est en bonne correspondance avec le massif isotopique théorique de l'adduit au dichlorocarbène $[M+H+CCl_2]^+$ avec un rapport de 1/100 sur l'intensité de l'espèce protonée. La formation d'une dichlorocyclopropanation à partir de l'espèce protonée se déroule et dans des proportions relativement faibles comparés aux autres adduits.

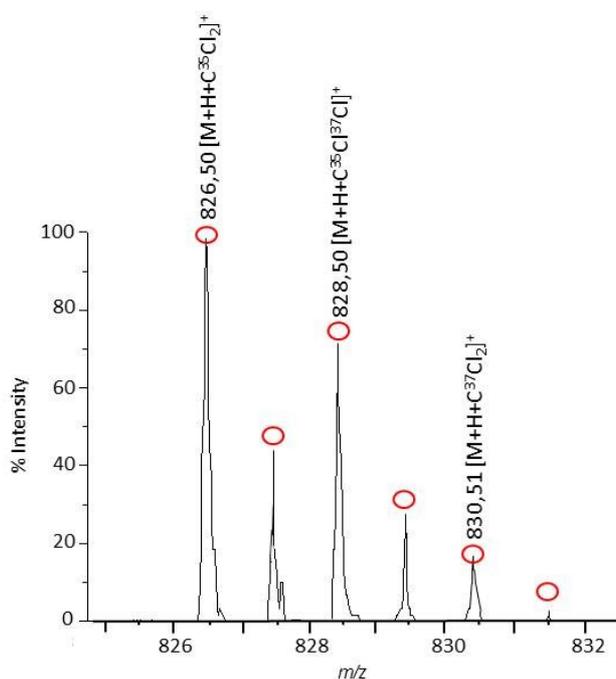


Figure 45 : Distribution isotopique de l'adduit CCl_2 du DOPE après traitement (smooth et baseline subtract). Les cercles indiquent la distribution théorique pour ce fragment.

Par ailleurs, la molécule comporte deux insaturations donc il devrait exister dans le spectre de masse du DOPE un second massif isotopique correspondant à l'ion comportant deux dichlorocyclopropanations à m/z 908,50. Cependant aucun signal n'est observé sur le spectre de masse APPI, très certainement car la première insaturation s'effectue dans un rapport déjà relativement faible (1/100 par rapport à l'espèce protonée). Par conséquent ou la deuxième dichlorocyclopropanation s'effectue et le signal n'est pas assez important pour être observé dans le spectre de masse APPI ou la seconde dichlorocyclopropanation ne s'effectue pas car l'énergie de la réaction de cette seconde insaturation avec le chloroforme n'est pas suffisante.

4. Etude de la DOPE avec le rayonnement synchrotron

La question s'est posée de savoir si la conformation de l'insaturation (*cis* ou *trans*) avait une incidence sur le rendement de la réaction de dichlorocyclopropanation (Z ou E). Par conséquent, les études ont été réalisées afin de comparer le rendement de la réaction sur les formes *cis* et *trans* de la molécule DOPE mais aussi de comprendre le mécanisme mis en jeu en faisant varier les longueurs d'onde sélectionnées du rayonnement synchrotron.

Les **Figures 46** et **47** présentent l'intensité relative de pic de l'ion m/z 826 correspondant respectivement à l'adduit au dichlorocarbène de la forme *cis* notée $[M_{cis}+H+CCl_2]^+$ et de la forme *trans* notée $[M_{trans}+H+CCl_2]^+$ en fonction de l'énergie de photon. L'apparition de l'adduit au dichlorocarbène se fait à 10,6 eV dans les deux cas (*cis* et *trans*), ce qui reste en accord avec les valeurs obtenues par Lee & Suto [Lee & Suto, 1987]. Par ailleurs, la formation de l'adduit au dichlorocarbène semble s'effectuer lorsque le rendement de l'espèce protonée est suffisant pour que la réaction de dichlorocyclopropanation puisse se faire ou être observée. Vu la valeur de l'EI à laquelle apparaît l'augmentation des ions fragments et de l'espèce protonée (EI = \sim 10,6 eV) qui correspond au seuil d'ionisation du méthanol, la source doit contenir un peu de ce solvant ce qui explique la protonation de la molécule.

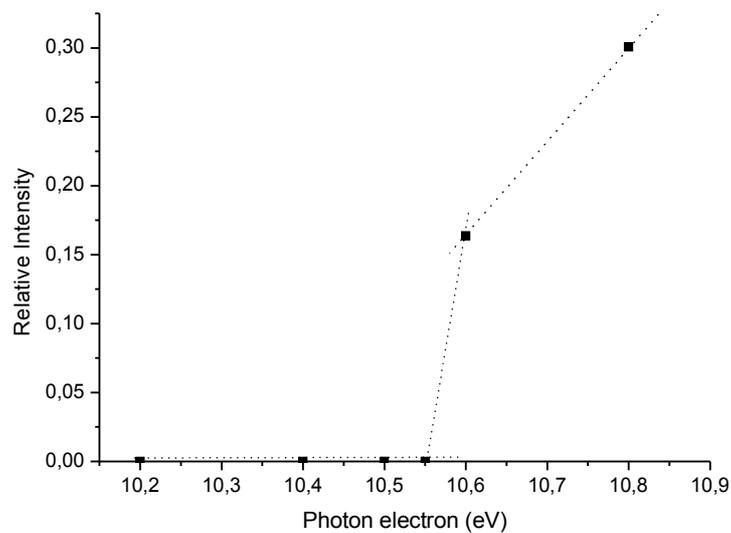


Figure 46 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 826 correspondant à l'adduit au dichlorocarbène de la forme *cis* noté $[M_{cis}+H+CCl_2]^+$ en fonction de l'énergie de photons. Le trait en pointillé sert à donner une ligne directrice visuelle.

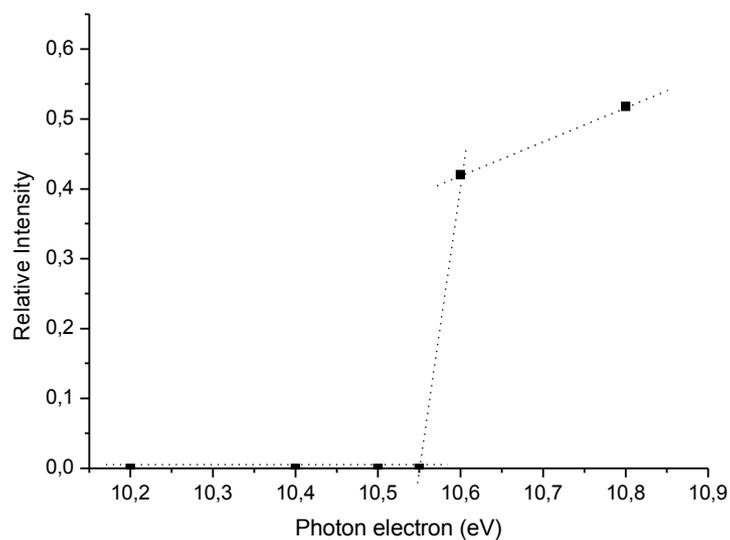


Figure 47 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 826 correspondant à l'adduit au dichlorocarbène de la forme *trans* noté $[M_{trans}+H+CCl_2]^+$ en fonction de l'énergie de photons. Le trait en pointillé sert à donner une ligne directrice visuelle.

Le rapport des intensités de l'adduit au dichlorocarbène avec le faisceau polychromatique (**Tableau 11**) sur l'espèce protonée dans le cas du DOPE *cis* est de 0,033 (6/178) et dans le cas DOPE *trans* 0,032 (9/275). Aucune différence notable dans les valeurs n'étant à souligner, la conclusion en est que la dichlorocyclopropanation n'est pas spécifique à une configuration particulière.

	<i>m/z</i> 826 (Counts per scan)	<i>m/z</i> 744 (Counts per scan)	rapport <i>m/z</i> 826/744
DOPE <i>cis</i>	6	178	0,033
DOPE <i>trans</i>	9	275	0,032

Tableau 11 : Intensité en « counts per scan » de l'adduit au dichlorocarbène (*m/z* 826) et de l'espèce protonée (*m/z* 744) et le rapport d'intensité de ces deux ions selon la DOPE *cis* et la DOPE *trans*.

5. Conclusion

La dichlorocyclopropanation d'un alcène, sans utiliser de nombreux intermédiaires réactifs, est une réaction originale et unique grâce à l'apport de photons provenant du faisceau lumineux du synchrotron SOLEIL. Le chloroforme est l'unique solvant utilisé et grâce à sa réaction de dissociation, un carbène singulet est libéré et disponible pour s'associer à une insaturation de l'analyte. D'autres expériences ont porté sur l'utilisation d'un autre solvant chloré comme le dichlorométhane. Malgré certains résultats obtenus dans la littérature [Lee & Suto, 1987] [Brownsword, 1997] la dissociation du dichlorométhane n'a pas permis d'obtenir un carbène réactif et la réaction de dichlorocyclopropanation n'a pas été observée dans les expériences menées. Par conséquent cette réaction du chloroforme sur un analyte alcène soumis au rayonnement synchrotron est une réaction nouvelle et originale menant à une chimie plus verte quant à l'utilisation d'intermédiaires réactifs toxiques. Cela est une première étape vers la compréhension de la photochimie du chloroforme.

23. Conclusions

La perte d'un radical méthyl a été détectée avec la molécule DOPC avec le faisceau polychromatique du rayonnement synchrotron à partir de 400°C dans le méthanol ainsi qu'avec la lampe au krypton. Cette perte est par conséquent une signature supplémentaire de la présence d'une fonction choline dans un phospholipide. La formation des ions m/z 308,3 dans le cas de la DOPE et m/z 322,3 pour la DOPMe, est obtenue par le mécanisme de thermospray uniquement lorsqu'il y a moins d'une fonction méthyl au niveau de la tête polaire. Seuls les spectres DOPC et DOPDe montrent une méthylation sur la fonction phosphate, provenant du solvant méthanol. L'ion fragment correspondant à la protonation de la tête polaire du DOPDe n'est détecté qu'à partir de deux fonctions N-méthyl. L'APPI ne permet pas de déterminer la position des chaînes d'acides gras en position *sn*-1 ou *sn*-2. Ce travail a permis de décrire des voies de fragmentation qui permettent de signer chaque molécule pour une meilleure reconnaissance des phospholipides.

REFERENCES

A

[Al Saad, 2003] K. A. Al Saad, V. Zabrouskov, W. F. Siems, N. R. Knowles, R. M. Hannan, H. H. Hill Jr., Structural Analysis of Phosphatidylcholines by Post-Source Decay Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 14, 2003, 373.

[Arduengo, 1997] A. J. Arduengo, F. Davidson, H. V. R. Dias, J. R. Goerlich, D. Khasnis, W. J. Marshall, T. K. Prakasha, An air stable carbene and mixed carbene "dimers", *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 1997, 12742.

[Asbury, 1999] G. R. Asbury, K. Al-Saad, W. F. Siems, R. M. Hannan, H. H. Hill Jr., Analysis of Triacylglycerols and Whole Oils by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 1999, 83.

B

[Benabdellah, 2009] F. [Benabdellah](#), H. [Yu](#), A. [Brunelle](#), O. [Laprévote](#), S. [De La Porte](#), MALDI reveals membrane lipid profile reversion in MDX mice, *Neurobiol. Dis.*, 2009, 252, 36.

[Benabdellah, 2010] F. [Benabdellah](#), A. [Seyer](#), L. [Quinton](#), D. [Touboul](#), A. [Brunelle](#), O. [Laprévote](#), Mass spectrometry imaging of rat brain sections: nanomolar sensitivity with MALDI versus nanometer resolution by TOF-SIMS, *Anal Bioanal Chem.*, 396, 2010, 151.

[Berry & Murphy, 2004] K. A. Z. Berry, R. C. Murphy, Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry of Glycerophosphoethanolamine Plasmalogen Phospholipids. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 15, 2004, 1499.

[Booker, 1992] M. L. Booker, V. W. LaMorte, S. A. Ahrendt, K. D. Lillemoe, H. A. Pitt, Distribution of Phosphatidylcholine Molecular Species Between Mixed Micelles and Phospholipid-Cholesterol Vesicles in Human Gallbladder Bile: Dependence on Acyl Chain Length and Unsaturation, *J. Lipid Res.*, 33, 1992, 1485.

[Brownsword, 1997] R. A. Brownsword, M. Hillenkamp, T. Laurent, R. K. Vatsa, H. R. Volpp, J. Wolfrum, Photodissociation dynamics of the chloromethanes at the Lyman-alpha wavelength (121.6 nm), *J. Chem. Phys.*, 106, 1997, 1359.

C

[Colson, 1993] A. O. Colson, B. Besler, M. D. Sevilla, Ab Initio Molecular Orbital Calculations on DNA Radical Ions. 3. Ionization Potentials and Ionization Sites in Components of the DNA Sugar Phosphate Backbone, *J. Phys. Chem.*, 97, 1993, 8092.

[Conquer, 2000] J. A. [Conquer](#), M. C. [Tierney](#), J. [Zecevic](#), W. J. [Bettger](#), R. H. [Fisher](#), Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment, *Lipids*, 35, 2000, 1305.

[Crawford, 1983] C. G. Crawford, R. D. Plattner, Ammonia Chemical Ionization Mass Spectrometry of Intact Diacyl Phosphatidylcholine, *J. Lipid Res.*, 24, 1983, 456.

D

[Dashti, 2011] M. [Dashti](#), W. [Kulik](#), F. [Hoek](#), E. C. [Veerman](#), M. P. [Peppelenbosch](#), F. [Rezaee](#), A phospholipidomic analysis of all defined human plasma lipoproteins, *Sci. Rep.* 1, 2011, 139.

[Delobel, 2005] A. Delobel, D. Touboul, O. Laprévotte, Structural Characterization of Phosphatidylcholines by Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 11, 2005, 409.

E

[Einicker-Lamas, 2003] M. [Einicker-Lamas](#), L. D. [Wenceslau](#), R. R. [Bernardo](#), L. [Nogaroli](#), A. [Guilherme](#), M. M. [Oliveira](#), A. [Vieyra](#), *J Biochem.*, 134 ,2003, 529.

[Ellison, 1987] D. W. Ellison, M. Flint Beal, J. B. Martin, Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease, *Brain Res.*, 417, 1987, 389.

F

[Fenn, 1989] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules, *Science*, 246, 1989, 64.

[Fenn, 1990] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray Ionization Principles and Practice, *Mass Spectrom. Rev.*, 9, 1990, 37.

[Ferreira, 2012] A. K [Ferreira](#), R. [Meneguelo](#), A. [Pereira](#), O. R. [Mendonça Filho](#), G. O. [Chierice](#), D. A. [Maria](#), Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study, *Anticancer Res.*, 32, 2012, 95.

[Fujiwara, 2002] T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, A. Kusumi, *J. Cell. Biol.*, 157, 2002, 1071.

G

[Giuliani, 2009] A. Giuliani, F. Jamme, V. Rouam,; F. Wien, J. L. Giorgetta, B. Lagarde, O. Chubar, S. Bac, I. Yao, S. Rey, C. Herbeaux, J. L. Marlats, D. Zerbib, F. Polack, M. Réfrégiers, DISCO : A Low-Energy Multipurpose Beamline At Synchrotron SOLEIL. *J. Synchrotron Rad.*, 16, 2009, 835.

[Gross, 2005] R. W. Gross, C. M. Jenkins, J. Yang, D. J. Mancuso, X. Han, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 77, 2005, 52.

H

[Harvey, 1995] D. J. Harvey, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Phospholipids *J. Mass Spectrom.*, 30, 1995, 1333.

[Hoffman, 1968] R. Hoffmann, [Trimethylene and the addition of methylene to ethylene](#), *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 1968, 1475.

[Hooijmans , 2008] C. R. Hooijmans, A. J. Kiliaan, Fatty acids, lipid metabolism and Alzheimer pathology, *Eur. J. Pharmacol.*, 585, 2008, 176.

[Hsu & Turk, 2000] F. F. Hsu, J. Turk, Characterization of Phosphatidylethanolamine as a Lithiated Adduct by Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry with Electrospray Ionization. *J. Mass Spectrom.*, 35, 2000, 596.

[Hsu & Turk, 2000] F. F. Hsu, J. Turk. Charge-Remote and Charge-Driven Fragmentation Processes in Diacyl Glycerophosphoethanolamine upon Low-Energy Collisional Activation: A Mechanistic Proposal, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11, 2000, 892.

[Hsu, 2003] H. H. Hsu, J. Turk, Electrospray Ionization/Tandem Quadrupole Mass Spectrometric Studies on Phosphatidylcholines: the Fragmentation Processes. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 4, 2003, 352.

[Hsu, 2009] F. F. Hsu, J. Turk, Electrospray Ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem Mass Spectrometry of Glycerophospholipids: Mechanisms of Fragmentation and Structural Characterization, *J. Chromatogr. B*, 877, 2009, 2673.

J

[Jackson, 1952] R. S. Jackson, C. F. Jr. Wilkinson, The Ratio Between Phospholipid And The Cholesterols In Plasma As An Index Of Human Atherosclerosis, *Ann. Intern. Med.*, 37, 1952, 162.

K

[[Kano-Sueoka](#), 1979] T. [Kano-Sueoka](#), D. M. [Cohen](#), [Z. Yamaizumi](#), [S. Nishimura](#), M. [Mori](#), [H. Fujiki](#), Phosphoethanolamine as a growth factor of a mammary carcinoma cell line of rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1979, 5741.

[[Karas](#), 1987] M. Karas, D. Bachman, U. Bahr, F. Hillekamp, Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Nonvolatile Compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process*, 78, 1987, 53.

[[Kaufmann](#), 1996] R. Kaufmann, T. Wingerath, D. Kirsch, W. Stahl, H. Sies, Analysis of Carotenoids and Carotenol Fatty Acid Esters by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI-Post-Source-Decay Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, 238, 1996, 117.

[[Klein](#), 1971] R. A. Klein, Mass Spectrometry of the Phosphatidylcholines: Dipalmitoyl, Dioleoyl, and Stearoyl-ooleyl Glycerylphosphorylcholine, *J. Lipid Res.*, 12, 1971, 123.

[[Klein](#), 1971] R. A. Klein, Mass Spectrometry of Phosphatidylcholines: Fragmentation Processes Dioleoyl and Stearoyl-Oleoyl Glycerylphosphorylcholine, *J. Lipid Res.* 12, 1971, 628.

L

[[Lee & Suto](#)] L. C. Lee, M. Suto, Fluorescence yields from photodissociative excitation of chloromethanes by vacuum ultraviolet-radiation, *Chem. Phys.*, 114, 1987, 423.

[[Lennard-Jones & Pople](#), 1951] J. Lennard-Jones, J. A. Pople, A survey of the principles determining the structure and properties of molecules - .1. The factors responsible for molecular shape and bond energies, *Discus. Faraday. Soc.*, 10, 1951, 9.

M

[Manicke, 2008] N. K. Manicke, J. M. Wiseman, D. R. Ifa, R. G. Cooks, Desorption Electrospray Ionization (DESI) Mass Spectrometry (MS/MS) of Phospholipids and Sphingolipids : Ionization , Adduct Formation, and Fragmentation, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19, 2008, 531.

[Murphy, 2001] R. C. Murphy, J. Fiedler, J. Hevko, Analysis of Nonvolatile Lipids by Mass Spectrometry, *Chem. Rev.*, 101, 2001, 479.

[Murphy, 2005] R. C. Murphy, C. R. Raetz, C. M. Reynolds, R. M. Barkley, Mass Spectrometry Advances in Lipidomics: Collision-Induced Decomposition of Kdo₂-Lipid A, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 77, 2005, 1331.

[Murphy, 1994] R. C. Murphy, K. A. Harrison, Fast atom Bombardment Mass Spectrometry of Phospholipids, *Mass Spectrom. Rev.*, 13, 1994, 57.

P

[Polonsky, 1980] J. Polonsky, M. Tencé, P. Varenne, B. C. Das, J. Lunel, J. Benveniste, Release of 1-*O*-alkylglyceryl 3-phosphorylcholine, *O*-deacetyl platelet-activating factor, from Leukocytes : Chemical Ionization Mass Spectrometry of Phospholipids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, 7019.

[Pulfer & Murphy, 2003] M. Pulfer, R. C. Murphy, Electrospray Mass Spectrometry of Phospholipids. *Mass. Spectrom. Rev.*, 22, 2003, 332.

R

[Ramos, 2008] R. G. Ramos, D. Libong, M. Rakotomanga, K. Gaudin, P. M. Loiseau, P. Chaminade, Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of Leishmania membrane phospholipids, *J. Chromatogr. A*. 1209, 2008, 88.

[Robb, 2000] D. B. Robb, T. R. Covey, A. Bruins, Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 72, 2000, 3653.

S

[Skell & Garner, 1956] P. S. Skell, A. Y. Garner, [Reactions of Bivalent Carbon Compounds. Reactivities in Olefin-Dibromocarbene Reactions](#), *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1956, 5430.

[Stubiger, 2007] G. Stubiger, O. Belgacem, Analysis of Lipids Using 2,4,6-Trihydroxyacetophenone as a Matrix for MALDI Mass Spectrometry, *Anal Chem.*, 79, 2007, 3206.

T

[Tanaka, 1988] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2, 1988, 151.

[Toback, 1976] F. G. [Toback](#), N. G. [Ordóñez](#), S. L. [Bortz](#), B. H. [Spargo](#), Zonal changes in renal structure and phospholipid metabolism in potassium-deficient rats, *Lab. Invest.*, 34, 1976, 115.

V

[Vernooij, 2002] E. A. A. M. Vernooij, J. F. H. M. [Brouwers](#), J. J. [Kettenes-van den Bosch](#), D. J. A. Crommelin, RP-HPLC/ESI MS determination of acyl chain positions in phospholipids, *J. Separ. Sci.*, 25, 2002, 285.

W

[Walsh, 1953] A. D. Walsh, The electronic orbitals, shapes, and spectra of polyatomic molecules .1. AH₂ molecules, *J. Chem. Soc.*, 1953, 2260.

Y

[Yao, 2005] C. Yao, F. Turecek, [Hypervalent ammonium radicals. Competitive N-C and N-H bond dissociations in methyl ammonium and ethyl ammonium](#), *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5, 2005, 912.

Chapitre 6 :

LES PEPTIDES

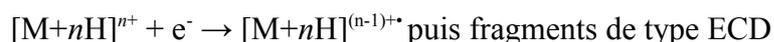
CHAPITRE 6 : LES PEPTIDES

24. Introduction

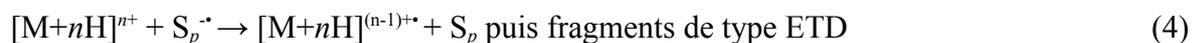
L'APPI a démontré être une technique capable d'analyser des peptides de synthèse ou de digestion trypsique [Delobel, 2003], [Debois, 2006], [Bagag, 2011]. Les précédents travaux ont été effectués avec une lampe au krypton dans le but d'approfondir la compréhension des réactions se déroulant dans la source APPI telles que la dissociation par capture d'électron/dissociation par transfert d'électrons (ECD/ETD) [Delobel, 2003], [Debois, 2006], [Berkout, 2008], [Vilkov, 2009], [Bagag, 2011]. Ainsi, les fragmentations conduisant à des ions de type *b/y* et *c* ont été décrites dans la littérature.

La comparaison entre les spectres obtenus avec le processus de thermospray et ceux obtenus avec l'APPI assistée d'un dopant montrent une disparition ou une forte diminution de l'abondance de l'espèce doublement chargée concomitante avec l'apparition des ions de type *c*. L'abondance des fragments augmente avec la quantité de dopant infusé alors que celle des ions multiprotonés diminue. La quantité de dopant doit être optimisée dans le but d'obtenir la meilleure intensité de fragments, trop de dopant pouvant supprimer le signal. La formation des ions de type *c* ne dépend pas de la nature du dopant. Cependant le toluène est le dopant de choix qui mène généralement à des spectres comportant le meilleur signal-sur-bruit. La disparition des ions multiprotonés est liée à la libération des photoélectrons dans le milieu pendant la photoionisation du dopant (réaction 1). L'espèce multiprotonée est le précurseur pour la formation des ions de type *c*. Pour les ions *b* et *y*, le site de protonation initial n'est pas le site qui conduit à la fragmentation mais c'est la mobilité du proton dans la séquence et notamment son attachement à l'azote de la liaison peptidique qui mène à la rupture de cette liaison.

La capture ou le transfert de photoélectrons aidée par l'espèce multichargée peut être assistée ou non par le solvant ou le gaz résiduel suivant les réactions suivantes :



(2)



D : dopant , M : analyte, S : solvant, S_p : cluster de solvant

Le dopant à partir de son seuil d'énergie d'ionisation est capable d'être photoionisé et pour produire des électrons (réaction 1). L'électron peut alors être capturé par le peptide protoné multichargé (réaction 2) pour conduire à l'ion à charge réduite $[M+nH]^{(n-1)+\bullet}$. L'espèce à charge réduite de la réaction 2 est un ion typique qui se dissocie en fragments de type *c* et *z* après capture électronique [Zubarev, 1998], [Kauppila, 2002], [Mihalca, 2004].

L'électron libéré lors de la réaction (1) peut aussi réagir avec des clusters de solvant (réaction 3) pour former un anion radicalaire qui peut par la suite réagir avec l'analyte multichargé pour conduire à l'ion à charge réduite qui va se dissocier après par transfert de charge [Syka, 2004], [Mikesh, 2006], [Coon & Syka, 2004 et 2005].

1. Formation des ions *y* et *b* par CID

Le mécanisme semblerait plus vraisemblablement être un de ceux par Dissociation Induite par Collision (CID) en plusieurs étapes, comme celui proposé par Paizs et Suhai concernant la formation de l'ion *b* [Paizs, 2005] (**Schéma 1**) le plus souvent avec un transfert de proton à partir du dopant. Ou encore celui où la fragmentation de la liaison de l'amide protonée mène aux séries d'ions complémentaires que sont les séries *y* et *b* [Syka, 2004] (**Schéma 1b**).

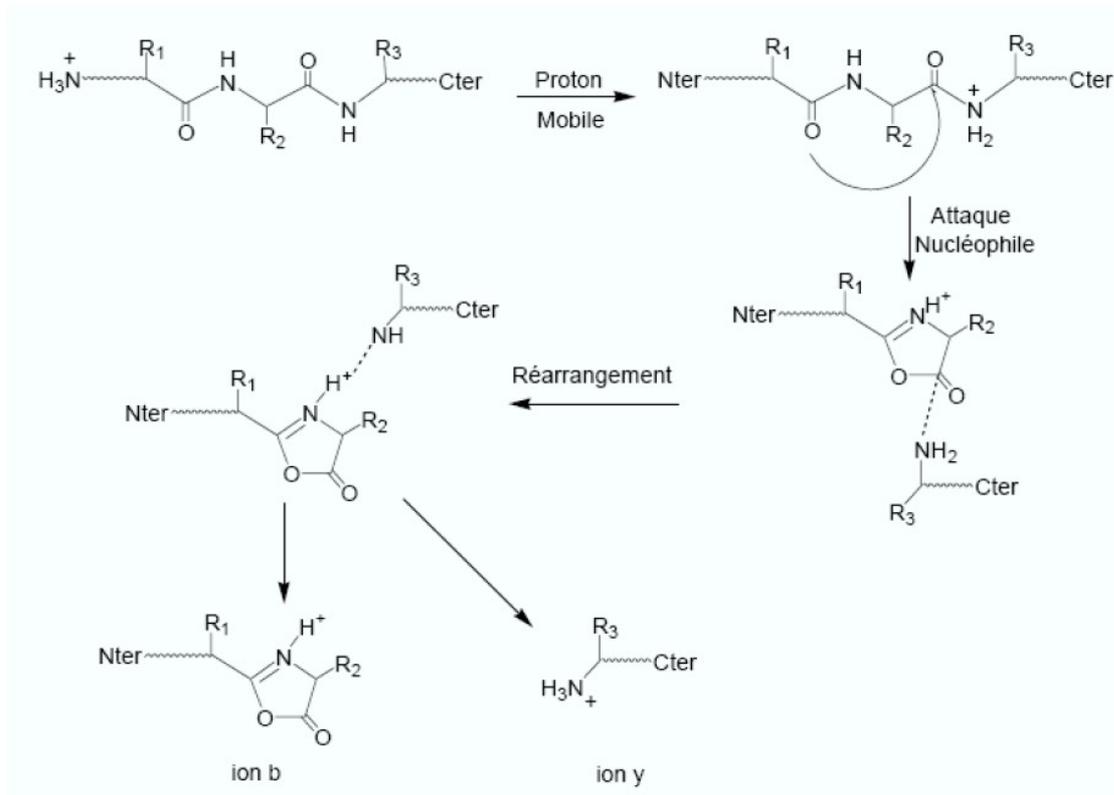


Schéma 1a : Mécanisme de formation des ions *y* et *b* selon [Paizs, 2005].

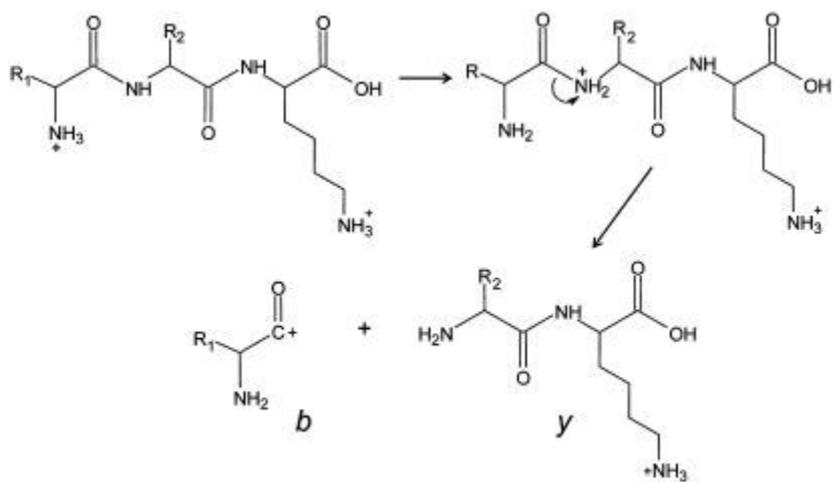


Schéma 1b : Schéma de fragmentation pour la production des ions de type *b* et *y* par CID à partir d'une espèce multichargée [Syka, 2004].

2. Formation des ions *c* et *z* par ECD ou ETD

Les ions de type *c* et ses ions complémentaires de type *z* peuvent être formés par un mécanisme d'ECD, [Zubarev, 1998], [Syrstad, 2005], [Patriksson, 2006], [Cooper, 2003 et 2005], [Mihalca, 2004], [Liu & Håkansson, 2007] ou un mécanisme d'ETD [Syka, 2004] [Mikesh, 2006]. Ces techniques de fragmentation permettent d'accéder à des types d'ions différents de ceux observés par fragmentation par collisions avec un gaz inerte comme la Dissociation Induite par Collision (CID). La technique ECD se distingue particulièrement des autres techniques puisqu'elle ne conduit pas au clivage de la liaison peptidique mais à celui de la liaison N-C_α du peptide en laissant intactes toutes les chaînes latérales. Une faible quantité d'énergie est donnée à l'ion, ce qui mène aux fragments de type *c* et *z* selon la position de la charge résiduelle. Le mécanisme intervenant lors de la rupture de la liaison N-C_α est sujet à de nombreuses controverses. Ce mécanisme se déroule grâce à des électrons de faible énergie qui réagissent avec des peptides cationisés dans la cellule d'un spectromètre de masse à transformée de Fourier à résonance cyclotronique (FT-ICR-MS). La réaction débute par l'attachement d'un électron à un peptide multi-protoné produisant ainsi un peptide cationisé contenant un électron supplémentaire. Le peptide à nombre impair d'électrons subit ensuite un réarrangement suivi d'une dissociation [Zubarev, 1998].

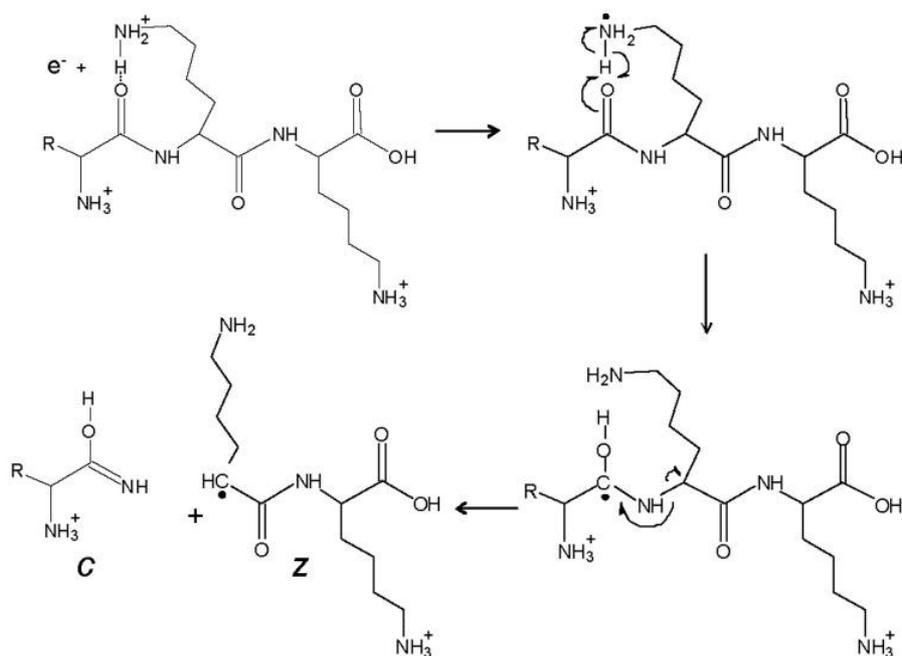


Schéma 2 : Mécanisme de l'ECD ou mécanisme « Cornell » proposé par Zubarev et Mc Lafferty [Zubarev, 1998]

La capture de l'électron se produit au niveau d'une liaison hydrogène entre l'azote de la chaîne latérale d'un lysine et le carbonyl d'une liaison amide du squelette peptidique. Un site anionique est alors formé au niveau de l'azote amide et l'hydrogène est transféré au carbonyl sous forme de radical aminoacétyl qui évolue grâce à la rupture N-C α . C'est le porteur de charge qui participe à la capture d'électron puis couplé au proton déclenche la dissociation

Sur la base de calculs théoriques, Syrstad et Turecek ont complété le modèle de Mc Lafferty & Zubarev (**Schéma 2**) en considérant la capture d'électron à partir d'un carbonyl (**Schéma 3**). Ils proposent deux mécanismes. L'un où l'amide superbasse résultant attire un proton à partir d'un site accessible, menant à la rupture de la liaison N-C α . Ce mécanisme permet d'expliquer la dissociation des peptides qui comporte une charge à une autre localisation que l'azote (**Schéma 3 à gauche**) [Chamot-Rooke, 2005]. Le deuxième

mécanisme proposé, fait intervenir un peptide dans lequel la capture de l'électron se fait par des amides solvatés de manière interne (*Schéma 3 à droite*). Le porteur de charge stabilise l'état amide, mais ne participe pas à la dissociation.

Schéma 3 : Mécanisme de l'ECD ou mécanisme « Utah-Washington » revu par Syrstad et Tureček [Syrstad, 2005] et Simons [Simons, 2005].

Turecek et *al.* suggèrent que les deux mécanismes d'ECD : celui qui se déroule à un centre de charge (H⁺) suivi par un transfert d'hydrogène (Cornell), et celui se déroulant sur une fonction amide par transfert de proton (Utah-Washington), sont possibles selon la nature du porteur de charge [Syrstad, 2005][Chen, 2006].

Une nouvelle technique utilisant la chimie ion/ion a fait suite au mécanisme d'ECD de Mc Lafferty & Zubarev [Syka, 2004], [Coon & Syka, 2004 et 2005], [Pitteri, 2005]. L'ETD qui transfère un électron d'un anion radicalaire à un peptide protoné (réactions 3 et 4). Ceci induit la fragmentation du squelette du peptide par un clivage de la liaison C α -N exactement comme en ECD (*Schéma 2*). De même, comme pour l'ECD, ce sont des ions complémentaires *c* et *z* qui sont formés au contraire des ions *b* et *y* que produit la technique de CID. Cette technique utilise une trappe ionique quadripolaire où le stockage d'électrons thermiques est problématique et donc la solution est d'utiliser des anions pour délivrer les électrons.

3. Formation des ions *a*, *y* et *b* par ECD

Cooper observa dernièrement la présence d'ion de type *b* par ECD comme dépendante du type du porteur de charge (la lysine par rapport à l'arginine) et la structure du peptide [Cooper, 2005]. Les ions produits, comme précédemment décrits, sont généralement observés

quand l'activation se fait par excitation vibrationnelle par CID. L'apparition des ions *b* est corrélée à la faible basicité en phase gazeuse et avec le fait que les ions *b* sont des produits de la partie N-terminale. De plus, les ions *b* sont accompagnés de pertes abondantes d'hydrogène et d'ammoniaque à partir de l'espèce à charge réduite [Haselmann & Schmidt] [Liu & Håkansson, 2007]. Cependant il est improbable que les ions *b* soient formés à partir des précurseurs ayant perdu une molécule d'ammoniaque mais plutôt à partir de la perte d'ammoniaque à partir des ions *c* correspondant [Cooper, 2005]. Deux mécanismes alternatifs ont été proposés. Le premier par Uggerud et *al.* à partir de calculs ab initio où les ions de type *b* peuvent être directement formés par capture d'électron si l'azote de la fonction amide est protoné [Bakken, 2004]. Le second par capture d'un électron par le précurseur $[M+nH]^{n+}$ suivie de la perte d'hydrogène, résultant en une excitation vibrationnelle des ions à nombre d'électrons pair $[M+(n-1)H]^{(n-1)+*}$ qui peuvent se dissocier grâce à un proton mobile à partir de l'espèce $[M+H]^{2+}$ comme par CID [Cooper, 2005].

Dernièrement Marshall et *al.* augmentèrent l'intensité des ions fragments de type *a* pour des peptides contenant des résidus basiques proche de la partie N-terminale sous forme acide libre. Dans ce cas d'ECD, il semblerait que la protonation se fasse à partir de l'azote amide (*Schéma 4*) [Tsybin, 2006].

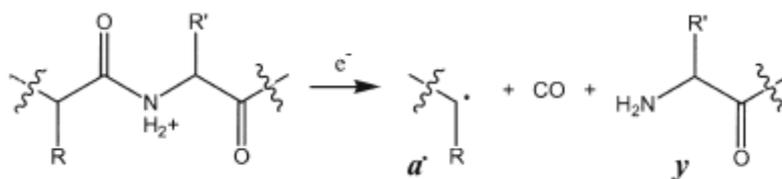


Schéma 4 : Mécanisme de fragmentation proposé pour la formation d'ion fragment *a* et *y*

[Tsybin, 2006].

4. Conservation des modifications post-traductionnelles (PTMs)

Si la fragmentation par collision permet d'obtenir des informations très intéressantes sur la structure primaire d'un peptide, voire dans certains cas reconstruire totalement sa séquence, elle n'est pas particulièrement bien adaptée pour les peptides portant des modifications post-traductionnelles labiles (glycosylations, phosphorylations...). En effet, par CID, la liaison la plus faible devient celle entre la modification et le squelette peptidique (*Schéma 5*). De ce fait, c'est souvent la première liaison qui se rompt lorsque l'on apporte de l'énergie au système, rendant très difficile la localisation de la modification dans la séquence. C'est avec des mécanismes comme l'ECD ou l'ETD que ce problème est contourné. Leur caractéristique remarquable est leur capacité à retenir et maintenir intact les modifications post-traductionnelles en induisant une rupture aléatoire sur la chaîne du peptide [Mikesh, 2006] [Syka, 2004] [Zubarev, 1999] [Zubarev, 2002].

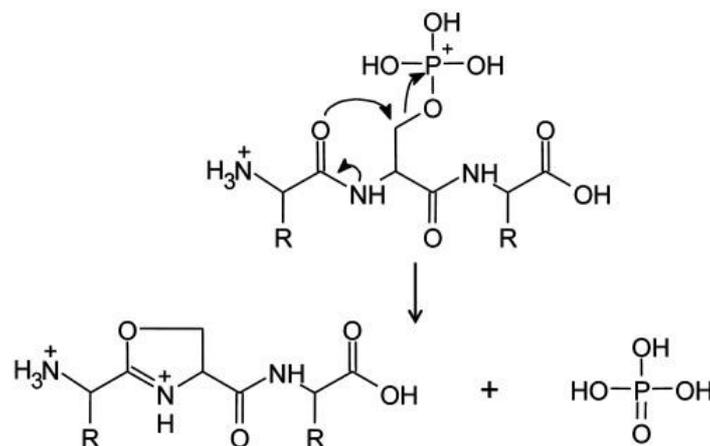


Schéma 5 : Mécanisme de fragmentation de la perte de l'acide phosphorique à partir d'un phosphopeptide multichargé par CID.

25. Etude des peptides avec le dopant toluene

Quatre peptides ayant des propriétés différentes ont été analysés au cours de cette thèse pour étudier leur comportement en APPI. Ils sont listés dans le *Tableau 1*.

Nom du peptide	Séquence	Masse monoisotopique (Da)
Substance P	RPKPQQFFGLM-NH ₂	1347,73
MEK1 peptide inhibitor I	MPKKKPTPIQLNP	1491,87
Myristoyl-MEK1	Myr-MPKKKPTPIQLNP	1702,25
Substrat de CDK5	PKtPKKAKKL	1218,73

Tableau 1 : Récapitulatif des quatre peptides étudiés avec leur séquence et masse

La Substance P est un neuropeptide possédant un intérêt particulier car il comporte deux prolines. La structure de cet acide aminé rend impossible la formation d'ions fragments de type *c*.

Le substrat de CDK5 (Cyclin Dependent Kinase 5) est le peptide substrat de la protéine CDK5 qui est une enzyme impliquée dans la dégénérescence des neurones. Comme il possède une fonction phosphate sur la thréonine, il est intéressant d'observer ainsi si les fragments conservent cette fonction. De plus ce peptide comporte aussi des prolines.

Le peptide inhibiteur I MEK1 est l'inhibiteur de la kinase MEK 1 capable de phosphoryler spécifiquement les résidus sérine, thréonine et tyrosine. Ce peptide a été choisi dans le but de comparer son spectre à celui du peptide inhibiteur I Myr-MEK1 possédant une chaîne d'acide gras sur la méthionine.

Quantité injectée :	20 μL à $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$
Solvant LC :	$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ à $400 \mu\text{L.min}^{-1}$
Dopants :	Toluène $50 \mu\text{L.min}^{-1}$

GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1	MCP
50	30	25	450	3	1200	10	50	15	2	2100

Les paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés lors de l'analyse des peptides, ont été ajustés afin d'obtenir un rapport signal/bruit satisfaisant tout en évitant des fragmentations de type CID en source.

Composés	EI (eV)
Anisole	8,2 eV
Toluène	8,83eV
$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$	10,84eV

Des billes d'Amberlite ont été ajoutées à l'échantillon afin de diminuer significativement l'intensité des pics correspondants aux adduits au sodium.

La nomenclature adoptée pour la fragmentation des peptides est celle proposée par Roepstorff et Fohlman [Roepstorff, 1984] et modifiée par Biemann [Biemann, 2002] (**Figure 1**).

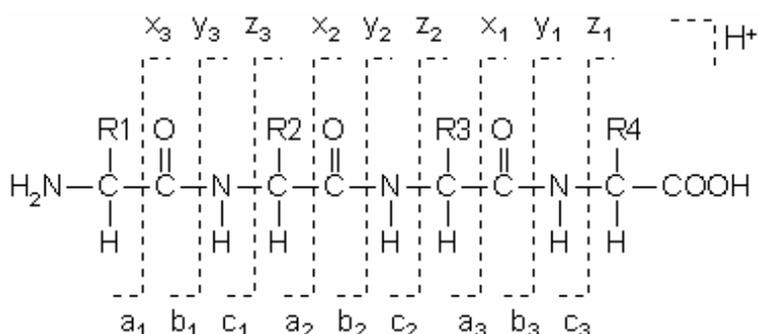


Figure 1 : Nomenclature pour la fragmentation des peptides.

Les ions sont notés a_i , b_i ou c_i s'ils comportent l'extrémité *N*-terminale et x_i , y_i ou z_i s'ils portent l'extrémité *C*-terminale. Le numéro indique le nombre d'acides aminés que contient l'ion. La rupture de la liaison peptidique conduit aux ions b et y [Paizs, 2005].

2. Etude de la substance P (RPKPQQFFGLM-NH₂)

1. Toluène comme dopant

Le spectre de masse SR-APPI de la substance P enregistré à 450 °C dans un mélange eau/méthanol (50/50, v/v) à 8,7 eV et le toluène comme dopant est montré sur la **Figure 2**.

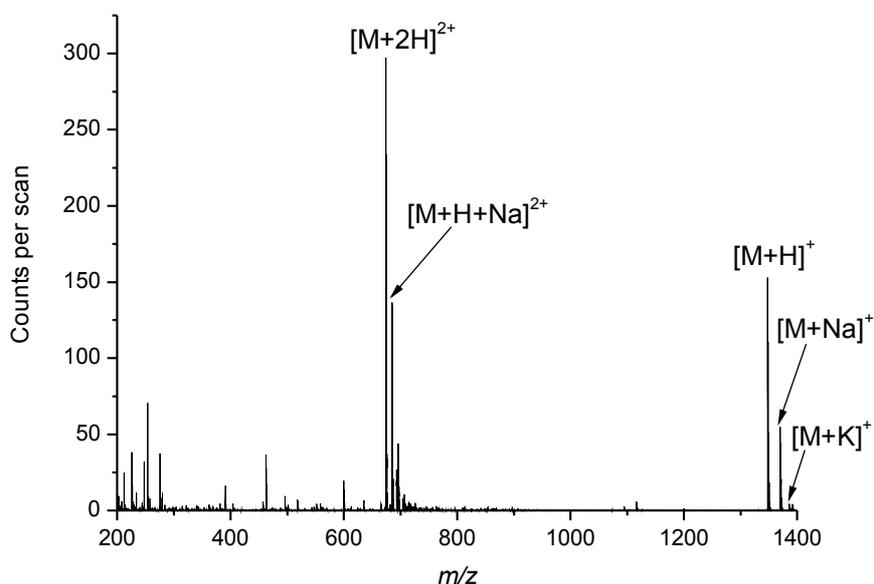


Figure 2 : Spectre de masse SR-APPI de la substance P à 450°C dans le mélange méthanol/eau (50/50, v/v) enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec une énergie des photons de 8,7 eV.

L'espèce protonée (m/z 1347,7), cationisée au sodium (m/z 1369,7), au potassium (m/z 1391,7), doublement protonée (m/z 674,2) et cationisé au sodium doublement chargé

(m/z 685,1) sont observées. Ces ions multichargés sont produits par thermospray, ils sont préformés en solution en fonction du pH et sont transférés en phase gazeuse par une désolvatation combinée à un transfert de protons indépendant du pH de la solution [Pilosof, 1984].

Le spectre de masse de la substance P enregistré à 450°C dans un mélange eau/méthanol (50:50, v/v) à une énergie de photons de 9,2 eV présente de nombreux signaux d'ions fragments (**Figure 3**).

a)

b)

Figure 3 : a) Spectre de masse SR-APPI de la substance P à 450°C dans le mélange méthanol/eau (50/50, v/v) enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec une énergie des photons à 9,2eV, b) agrandissement de la région m/z [200-780].

A cette énergie de photons, supérieure à l'énergie d'ionisation du toluène (IE = 8,83 eV), le spectre est différent de celui à 8,7 eV (**Figure 3**) et présente les espèces monochargées $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ (**Figure 3a**) et les ions doublement chargés $[M+2H]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$, $[M+H+K]^{2+}$ et $[M+H+Na]^{2+}$ (**Figure 3b**). A cette énergie de photons (IE = 9,2 eV), la photoionisation du dopant devient efficace, menant à la formation du radical cation D^+ et d'un électron libre qui va interagir avec l'espèce doublement chargée par un mécanisme de transfert d'électrons. Cette réaction permet d'observer simultanément aux espèces mono et multichargées, les ions fragments de la série b (b_2^+ , b_3^+ et b_4^+), de la série y (y_4^+ , y_5^+ et y_6^+), de la série c (c_4^+ et c_5^+) et les ions a_3^+ et $(z_4+3)^+$.

a)

c)

- b)
- d)
- e)

Figure 4 : Intensité relative du pic des ions correspondant à a) l'espèce doublement chargée, b) l'espèce simplement chargée c) l'ion fragment c_5 d) l'ion fragment b_5 étudiée avec le dopant toluène en fonction de l'énergie de photons. e) Rapport entre l'intensité du pic de l'ion $[M+H]^+$ et l'ion $[M+2H]^{2+}$ en fonction de l'énergie de photons.

Les **Figures 4a** et **b** présentent l'intensité relative de l'espèce protonée et l'espèce doublement chargée en fonction de l'énergie des photons. Une diminution linéaire commune de l'intensité du signal des ions $[M+H]^+$ et $[M+2H]^{2+}$ par un facteur de ~ 7 et $3,5$ respectivement est clairement observé. Chacun des ions présente deux ruptures de pente séparant le graphe en trois régions : une valeur stable de $8,5$ eV à $8,75$ eV puis de $8,75$ eV à $8,9$ eV diminution linéaire pour atteindre une valeur stable de nouveau à partir de $8,95$ eV.

Les intensités relatives des ions fragments c_5^+ (**Figure 4c**) et b_5^+ (**Figure 4d**), suivent les courbes inversement proportionnelles aux courbes précédentes. Après une phase stable de $8,5$ eV à $8,8$ eV, l'intensité augmente linéairement de $8,8$ eV à $8,9$ eV puis augmentent plus progressivement à partir de $8,9$ eV.

La tendance des courbes permet d'observer que l'apparition des ions fragments s'effectue à partir de la valeur de l'IE du dopant toluène.

L'étude du rapport de $[M+H]^+$ sur $[M+2H]^{2+}$ (**Figure 4e**) permet d'observer la diminution deux fois plus rapide de l'ion $[M+2H]^{2+}$ que l'ion $[M+H]^+$. L'observation est en accord avec le mécanisme d'ECD/ETD précédemment décrit. L'espèce multichargée capture plus facilement les électrons que le monochargé car il est plus électrostatique.

La **Figure 5** présente le spectre de masse SR-APPI de la substance P enregistré à 450°C dans le mélange eau/méthanol (50/50, v/v) en utilisant le faisceau polychromatique et le toluène

comme dopant. Le nombre de pics dans les basses masses donne un spectre très complexe difficilement interprétable.

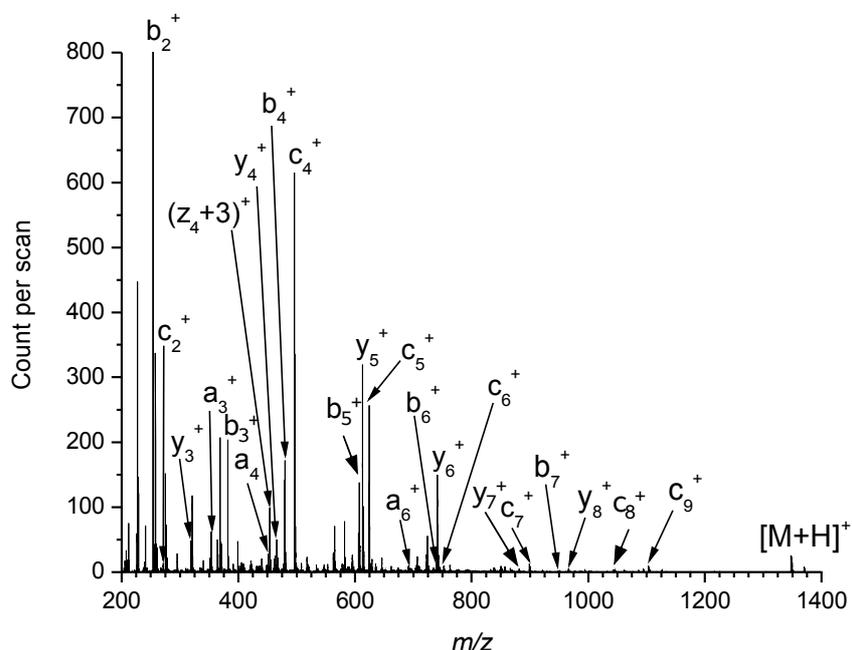


Figure 5 : Spectre de masse SR-APPI de la substance P à 450°C dans le mélange méthanol/eau (50/50, v/v) enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec le faisceau polychromatique.

Le spectre présente les séries *b*, *y* et *c* et indique l'absence de deux ions de la série des ions de type *c*, de c_2^+ à c_9^+ . L'ion c_3^+ n'est pas observé car il correspond à la rupture avant la proline [Debois, 2006], [Takayama, 2001]. Cependant, dans les présentes expériences, l'absence de l'ion c_3^+ et la faible intensité de l'ion fragment c_8^+ n'empêche pas la présence des ions fragments b_3^+ et b_8^+ . Les ions c_3^+ et c_8^+ sont soit fragmentés en source pour former les ions fragments b_3^+ et b_8^+ comme ions secondaires par dissociation, soit proviennent comme le propose Cooper *et al.* en 2005 directement d'un mécanisme d'ECD selon l'affinité protonique et une recombinaison énergétique de la séquence peptidique [Cooper, 2005].

Le spectre APPI enregistré avec la lampe au krypton en utilisant comme dopant le toluène effectué par Debois *et al.* [Debois, 2006], permet d'observer l'espèce doublement chargée $[M+2H]^{2+}$ malgré la présence d'une série *c* de c_4^+ à c_9^+ avec une distribution d'ions *b* et *y* intenses. La présence d'un unique ion *a* (l'ion a_6^+) avait été notée également. Ce modèle de fragmentation ECD/ETD contraste fortement avec le spectre ECD de la substance P doublement chargée (comportant soit une fonction carboxylique soit une amide) de Mihalca *et al.* [Mihalca, 2004] et où seule la série *c* est reportée. Tsybin *et al.* décrivent également une série d'ions *c* et modifient la fonction N-terminale par une fonction OH afin d'augmenter l'abondance des ions de la série *a* [Tsybin, 2006]. En revanche Axelsson *et al.* compare la technique d'ECD présentant majoritairement une série *c*, un ion intense y_6 et un ion z_9 ; avec la technique CID qui elle présente à fort voltage des ions *y*, *b* et *a* [Axelsson, 1999]. Jusqu'à présent non décrits comme provenant d'un mécanisme ECD ou CID pour la substance P, mais visibles également sur les spectres de Debois *et al.* [Debois, 2006], les ions *b/y* et *a* sont des ions minoritaires. Dans les expériences SR-APPI, la série *a* est représentée par les ions a_3^+ , a_4^+ , a_6^+ et un simple ion $(z_4+3)^+$ est présent également (**Figure 5**).

2. Acétone comme dopant

Les mêmes expériences ont été effectuées en utilisant différents dopants pour étudier leur effet sur la substance P. L'acétone produit des fragmentations quasi identiques à celles produites par le toluène avec une différence dans les intensités relatives. En revanche, l'anisole (avec un débit optimisé) produit une fragmentation peu abondante dans le cas de la substance P. L'anisole n'a donc pas été retenu comme dopant puisque les spectres générés étaient moins facilement interprétables contrairement à ce que Debois *et al.* décrivent en utilisant une normalisation du débit du dopant [Debois, 2006].

En revanche au contraire de l'étude faite avec le toluène, l'étude du rapport entre $[M+2H]^{2+}$ et $[M+H]^+$ avec l'acétone ne donne aucune valeur significative.

- e)
- a)
- b)
- c)
- d)

Figure 7 : Intensité relative du pic des ions correspondant à a) l'ion doublement chargé et b) l'ion simplement chargé et c) l'ion fragment c_5 , étudiée avec le dopant acétone en fonction de l'énergie de photons. d) rapport entre les intensité du pic de l'ion $[M+H]^+$ et l'ion $[M+2H]^{2+}$ en fonction de l'énergie de photons.

3. Etude du substrat de CDK5 (PKtPKKAKKL)

Ce peptide comporte une phosphorylation localisée sur le troisième acide aminé, une thréonine. Le but de l'étude est d'observer comment la modification post-traductionnelle réagit.

Le spectre de masse SR-APPI enregistré à une énergie de photons de 7,0 eV (**Figure 8**), c'est-à-dire avant le seuil d'ionisation du toluène, présente l'espèce protonée $[M+H]^+$ (m/z 1218,9), l'espèce protonée ayant perdu le groupement phosphate sous forme H_3PO_4 ou HPO_3 respectivement $[M+H-H_3PO_4]^+$ (m/z 1120,9) et $[M+H-HPO_3]^+$ (m/z 1138,9), l'espèce doublement chargée $[M+2H]^{2+}$ (m/z 609,9), ainsi que l'espèce doublement chargée sans phosphate $[M+2H-H_3PO_4]^{2+}$ (m/z 560,9).

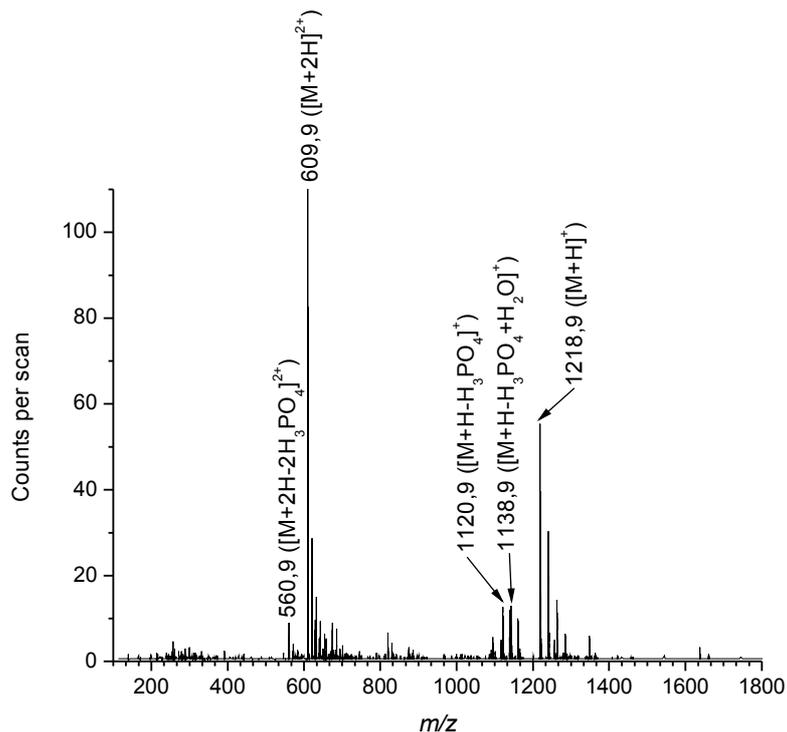


Figure 8 : Spectre de masse SR-APPI du substrat de CDK5 enregistré à 450°C dans le mélange eau/méthanol en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec une énergie des photons de 7,0 eV.

Le spectre de masse SR-APPI enregistré en mode d'ionisation positif à 450°C à une énergie de photons de 9,2 eV dans un mélange eau/méthanol présente des signaux de faible intensité d'ions fragments (**Figure 9**). Uniquement les ions b_2^+ et $(b_3-H_3PO_4)^+$ sont détectés. L'ion b_2^+ est l'ion correspondant au fragment comportant la séquence PK c'est-à-dire n'introduisant pas l'acide aminé thréonine phosphorylé. En revanche, l'ion b_3^+ comprenant cet acide aminé est visible sur le spectre sans phosphorylation $(b_3-H_3PO_4)^+$. De nouveau le fait que les électrons aient une énergie supérieure à l'énergie d'ionisation du toluène (8,83 eV) fait apparaître des signaux d'ions fragments comme pour la substance P. Le toluène joue ainsi un effet de donneur d'électrons encore dans cet exemple.



Figure 9 : Spectre de masse SR-APPI du substrat de CDK5 à 450°C dans le mélange eau/méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec une énergie des photons de 9,2 eV.

La **Figure 10** montre le spectre de masse SR-APPI de CDK5 enregistré à 450°C en mode d'ionisation positif dans un mélange méthanol/eau (50/50) en utilisant le faisceau polychromatique et avec le toluène comme dopant.

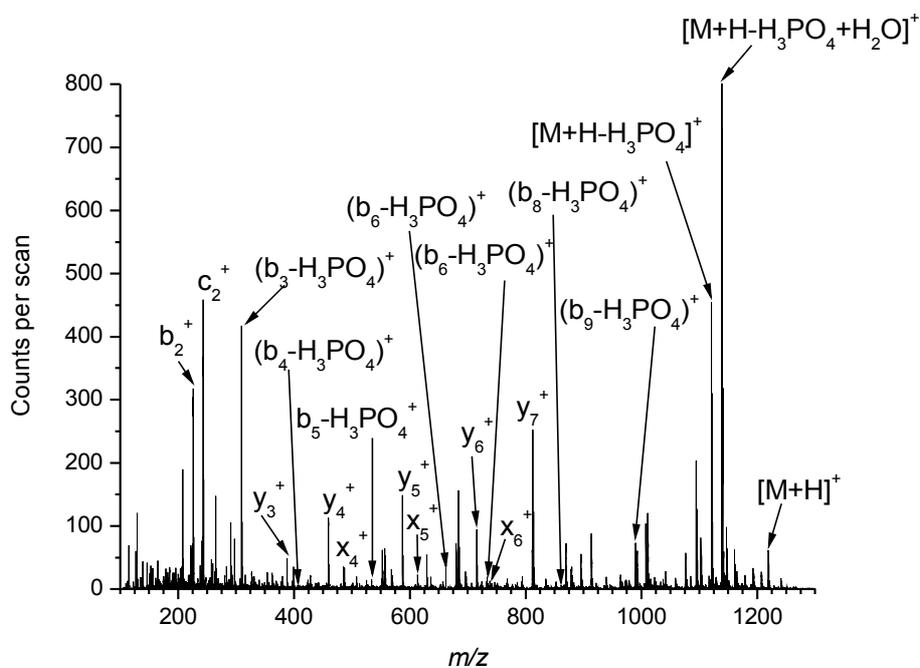


Figure 10 : Spectre de masse SR-APPI du substrat CDK5 à 450°C dans l'eau/méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant avec le faisceau polychromatique.

Ce spectre montre l'espèce protonée à m/z 1218,9 et la série d'ions fragments de y_3^+ à y_7^+ ne comportant pas la thréonine phosphorylée. L'ion à m/z 895,6 correspond à l'ion y_8^+

comprenant la thréonine ayant perdu la fonction phosphate. Avec une plus faible intensité, il présente une partie de la série des ions fragments de x_4^+ à x_6^+ . Les deux pics principaux du spectre correspondent, à partir de l'espèce protonée, à la perte de HPO_3 (m/z 1138,9) et H_3PO_4 (m/z 1120,9). Ces deux pics sont suivis par la série de fragments de type b , ayant tous perdus leur groupement phosphate. Cette observation avec une phosphothréonine est en accord avec ce que Lee et *al.* avaient rapporté pour un peptide comportant une phosphosérine. Ils avaient observé des pertes d'acide phosphorique des ions a , b , y et même c et z par ECD [Lee, 2007]. Par conséquent l'APPI est une technique qui ne permet pas de positionner les phosphorylations au contraire des expériences en ECD faites par McLachlin *et al.* [McLachlin, 2001].

4. Etude de l'inhibiteur de MEK1 (MPKKKPTPIQLNP) et son peptide inhibiteur myristoylé Myr-MEK1 (Myr-MPKKKPTPIQLNP)

1. *Inhibiteur de MEK1*

$[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$

b_{11}^{2+}

$[\text{M}+3\text{Na}]^{3+}$

$[\text{M}+3\text{K}]^{3+}$

$[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$

Figure 11 : Spectre de masse APPI (Flow Injection Analysis : FIAMS) du peptide inhibiteur de MEK1 dans le mélange H_2O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré en lampe éteinte (mode *lamp off*) avec comme dopant le toluène.

Le spectre de la **Figure 11** présente le spectre de masse APPI du peptide MEK1 en mode *lamp off* avec le toluène. Ce spectre comporte les signaux des espèces simplement, doublement et triplement chargées, ainsi que certains ions fragments, les ions b_{11}^{2+} et b_{12}^{2+} et le fragment interne KKKPTPIQL-H₂O. La présence de sodium dans le milieu, malgré la volonté de s'en affranchir à l'aide des billes d'Amberlite, conduit à l'apparition d'espèces $[M+Na]^+$ et $[M-H+2Na]^+$ en complément de l'espèce protonée $[M+H]^+$.

En revanche, le spectre de masse APPI, en mode *lamp on*, **Figure 12a**, montre la présence des espèces simplement chargées encore présentes : $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M-H+2Na]^+$. Les séries d'ions *b* et *c* apparaissent parallèlement à la disparition des espèces doublement et triplement chargées. Le spectre de la **Figure 12b**, qui est un agrandissement de la région [200-800], présente une série d'ions *b* (de b_2^+ à b_6^+) et une série d'ions *c* (de c_2^+ à c_6^+). L'absence de l'ion c_5^+ est dû à la présence de la proline qui rend impossible la rupture de la liaison peptidique (côté N-terminal) à cause de son cycle à 5 chaînons comportant la fonction amine. L'espèce protonée est de faible intensité ainsi que l'espèce doublement chargée. Le peptide cationisé par le sodium accompagne toujours l'espèce protonée malgré l'ajout de billes d'Amberlite.

KKKPTPI-CO+H⁺

a)

b)

a_9^+

$(a_9-H+Na)^+$

KKKPTP-CO+H⁺

Figure 12 : a) Spectre de masse APPI (FIAMS) du peptide inhibiteur de MEK1 dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré en lampe allumée (mode *lamp on*) avec comme dopant le toluène, b) agrandissement du spectre de masse de la région *m/z* [100-950].

2. Peptide inhibiteur myristoylé de MEK 1 (Myr-MEK1)

Afin de faciliter et alléger l'écriture des fragments comportant la myristoylation sur les spectres, une nomenclature a été adoptée ; chaque ion fragment comportant cette myristoylation sera ainsi annoté par une étoile.



Figure 13 : Spectre de masse APPI (FIAMS) du peptide inhibiteur Myr- MEK1 dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré en lampe éteinte (mode *lamp off*) avec comme dopant le toluène.

La **Figure 13** représente le spectre APPI du peptide MEK1 myristoylé en mode *lamp off* avec le toluène. Ce spectre est quasi similaire à celui obtenu dans les mêmes conditions avec le MEK1 mais décalé de +210,4 u.m.a. La seconde différence repose sur l'intensité de l'espèce triplement protonée qui se trouve être aussi élevée que celle de l'espèce doublement protonée. Par conséquent, c'est la modification apportée en N-terminal qui permet de favoriser les espèces triplement chargées aux espèces doublement chargées.

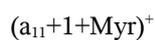
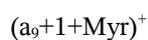


Figure 14 : Spectre de masse APPI (FIAMS) du peptide inhibiteur Myr-MEK1 dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré en lampe allumée (mode *lamp on*) avec comme dopant le toluène.

En revanche les expériences nano-ESI avec le LTQ-Orbitrap de la **Figure 15** présentent un spectre avec deux pics principaux. Le signal de l'espèce simplement chargée a totalement diminué pour laisser place au pic majoritaire qui est l'espèce triplement chargée et, en plus faible intensité, l'espèce doublement chargée.

L'espèce doublement chargée, (m/z 851,5) (**Figure 16**) génère de nombreux fragments par CID ; des ions y simplement et doublement chargés, sans perte de neutre ou avec perte d'ammoniaque et d'eau. La présence des ions y , ne comportant pas de myristoylation au contraire des ions b et c (**Figure 14**), permet ainsi de localiser la myristoylation sur la partie N terminale du peptide.

La myristoylation, groupement peu labile, a donc été conservé sur la chaîne peptidique aussi bien en APPI qu'en nanoESI.



Figure 15 : Spectre de masse nano-ESI du peptide inhibiteur Myr-MEK1 dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré par le LTQ-Orbitrap.



Figure 16 : Spectre nano-ESI/MS-MS de l'espèce doublement chargée $[M+H]^{2+}$ du peptide Myr-MEK1 (m/z 851,5) (CID = 25 u.a. et temps d'activation = 33 ms) dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré par le LTQ-Orbitrap

5. Conclusion

La photoionisation à pression atmosphérique en mode positif des peptides a permis d'augmenter les informations sur les espèces présentes dans le milieu et leur structure. Avec la lampe au krypton comme avec le faisceau synchrotron, de nombreux et abondants fragments *c* et *b/y* sont observés. La présence de fragments peu communs tels que les ions fragments de type *c*, espèces plus couramment rencontrées en MS/MS de haute énergie [Papayannopoulos, 1995] ou en ECD/ETD, est particulièrement remarquable. En photoionisation à pression atmosphérique, la formation de ce type d'ions en mode positif trouve son origine dans un processus d'ECD/ETD sur une espèce multichargée à l'aide de photoélectrons qui sont relargués dans le milieu à partir de la photoionisation du dopant. Avec le faisceau du synchrotron il est possible d'étudier l'effet du dopant sur la fragmentation. Il a été observé que la technique APPI ne permet pas de conserver sur certains ions fragments les groupements acide phosphorique mais conserve des groupements moins labiles comme la myristoylation. Approfondir l'étude des PTMs par d'autres modifications comme les sulfonations (encore plus labiles que les phosphorylations) ou les glycosylations permettrait d'étendre les connaissances sur l'APPI et mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. Il serait également intéressant à partir de travaux précédents où l'ajout de TFA avait augmenté la formation d'ions *c* d'étudier avec la lumière synchrotron l'implication exacte de l'acide sur cette accroissement d'intensité.

REFERENCES

A

[Axelsson, 1999] J. Axelsson, M. Palmblad, K. Håkansson, P. Håkansson, Electron Capture Dissociation of Substance P Using a Commercially Available Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13, 1999, 474.

B

[Bagag, 2011] A. Bagag, A. Giuliani, O. Lapr evote, Atmospheric Pressure Photoionization of Peptides, *Int. J. Mass Spectrom.*, 299, 2011, 1.

[Bakken, 2004] V. Bakken, T. Helgaker, E. Uggerud, Models of fragmentations induced by electron attachment to protonated peptides, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 5, 2004, 625.

[Berkout, 2008] V. Berkout, V. Doroshenko, Fragmentation of phosphorylated and singly charged peptide ions via interaction with metastable atoms, *Int. J. Mass Spectrom.*, 278, 2008, 150.

[Biemann, 2002] K. Biemann, Four decades of structure determination by mass spectrometry: From alkaloids to heparin, *J. Am. Soc. Mass Spec.*, 13, 2002, 1254.

[Bos, 2006] S. J. Bos, S. M. van Leeuwen, U. Karst, From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 2006, 85.

C

[Chamot-Rooke, 2005] J. Chamot-Rooke, G. van der Rest, J. P. Le Caer, S. Bay, J. Lemoine, *Proceedings of the 53th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Characterization of Glycosylated and Phosphorylated Peptides: Chemical Derivatization vs Electron Capture Dissociation: San Antonio, TX, 2005.

[Chen, 2006] X. H. Chen, F. Turecek, The Arginine Anomaly: Arginine Radicals are Poor Hydrogen Atom Donors in Electron Transfer Induced Dissociations. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 2006, 12520.

[Coon & Syka, 2004] J. J. Coon, J. E. P. Syka, J. C. Schwartz, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, Anion dependence in the partitioning between proton and electron transfer in ion/ion reactions, *Int. J. Mass Spectrom.*, 236, 2004, 33.

[Coon & Syka, 2005] J. J. Coon, J. E. P. Syka, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, Tandem mass spectrometry for peptide and protein sequence analysis, *Biotechniques*, 38, 2005, 519.

[Cooper, 2003] H. J. Cooper, R. R. Hudgins, K. Håkansson, A. G. Marshall, Secondary fragmentation of linear peptides in electron capture dissociation, *Int. J. Mass Spectrom.*, 228, 2003, 723.

[Cooper, 2005] H. J. Cooper, Investigation of the Presence of *b* Ions in Electron Capture Dissociation Mass Spectra, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16, 2005, 1932.

D

[Debois, 2006] D. Debois, A. Giuliani, O. Laprévotte, Fragmentation Induced in Atmospheric Pressure Photoionization of Peptides, *J. Mass. Spec.*, 41, 2006, 1554.

[Delobel, 2003] A. Delobel, F. Halgand, B. Laffranchise-Gosse, H. Snijders, O. Laprévotte, Characterization Of Hydrophobic Peptides by Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 75, 2003, 5961.

[Demirev, 2000] P. A. Demirev, Generation of hydrogen radicals for reactivity studies in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14, 2000, 777.

G

[Gunawardena, 2005] H. P. Gunawardena, M. He, P. A. Chrisman, S. J. Pitteri, J. M. Hogan, B. D. M. Hodges, S. A. McLuckey, Electron Transfer versus Proton Transfer in Gas-Phase Ion/Ion Reactions of Polyprotonated Peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 36, 2005, 12627.

[Giuliani, 2006] A. Giuliani, D. Debois, O. Lapr evote, Study of bisquaternary ammonium salt by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 12, 2006, 189.

H

[Haselmann & Schmidt, 2007] K. F. Haselmann, M. Schmidt, Do b-ions occur from vibrational excitation upon H-desorption in electron capture dissociation?, *Rapid Commun. Mass Spec.*, 21, 2007, 1003.

K

[Kauppila, 2002] T. J. Kauppila, T. Kuuranne, E. C. Meurer, M. N. Eberlin, T. Kotiaho, R. Kostianen, Atmospheric Pressure Photoionization Spectrometry. Ionization Mechanism and the Effect of Solvent on the Ionization of Naphthalenes, *Mass Anal. Chem.*, 74, 2002, 5470.

L

[Lee, 2007] S. Lee, S. Ahn, Y. H. Yim, B. Kim, H. Y. So, H. B. Oh, Neutral Loss of Phosphopeptides upon Electron Capture Dissociation with a Hot Dispenser Cathode, *Bull. Korean Chem. Soc.* 28, 2007, 1195.

[Leymarie, 2003] N. Leymarie, C. E. Costello, P. B. O'Connor, Electron capture dissociation initiates a free radical reaction cascade, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2003, 8949.

[Liu & Håkansson, 2007] H. Liu, K. Håkansson, Abundant *b*-Type Ions Produced in Electron Capture Dissociation of Peptides Without Basic Amino Acid Residues, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 2007.

M

[McLachlin, 2001] D. T. McLachlin, B. T. Chait, Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass Spectrometry, *Chem. Biol.*, 5, 2001, 591.

[Mihalca, 2004] R. Mihalca, A. J. Kleinnijenhuis, L. A. McDonnell, A. J. R. Heck, R. M. A. Heeren, Electron Capture Dissociation at Low Temperatures Reveals Selective Dissociations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 2004, 1869.

[Mikesh, 2006] L. M. [Mikesh](#), B. [Ueberheide](#), A. [Chi](#), J. J. [Coon](#), J. E. [Syka](#), J. [Shabanowitz](#), D. F. [Hunt](#). The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1764, 2006, 1811.

P

[Papayannopoulos, 1995] I. A. Papayannopoulos, The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides, *Mass Spectrom. Rev.*, 14, 1995, 49.

[Patriksson, 2006] A. Patriksson, C. Adamsa, F. Kjeldsen, J. Raber, D. van der Spoel, R. A. Zubarev, Prediction of N-C α bond cleavage frequencies in electron capture dissociation of Trp-cage dications by force-field molecular dynamics simulations, *Int. J. Mass Spectrom.*, 248, 2006, 124.

[Pilosof, 1984] D. Pilosof, H. Y. Kim, D. F. Dyckes, M. L. Vestal, Determination of nonderivatized peptides by thermospray liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 56, 1984, 1236.

[Pitteri, 2005] S. J. Pitteri, P. A. Chrisman, S. A. McLuckey, Electron-transfer ion/ion reactions of doubly protonated peptides: effect of elevated bath gas temperature. *Anal. Chem.*, 77, 2005, 5662.

R

[Roepstorff, 1984] P. Roepstorff, J. Fohlman, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides, *Biomedical Mass Spectrometry*, 11, 1984, 601.

S

[Syka, 2004] J. E. P. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt; Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry, *PNAS*, 26, 2004, 9528.

[Syrstad, 2005] E. A. Syrstad, F. Tureček, Toward a General Mechanism of Electron Capture Dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16, 2005, 208.

T

[Takayama, 2001] M. Takayama, In-Source Decay Characteristics of Peptides in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 2001, 420.

[Tsybin, 2006] Y. O. Tsybin, K. F. Haselmann, M. R. Emmett, C. L. Hendrickson, A. G. Marshall, Charge Location Directs Electron Capture Dissociation of Peptide Cations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 17, 2006, 1704.

V

[Vilkov, 2009] A. N. Vilkov, V. V. Laiko, V. M. Doroshenko, Peptide fragmentation induced by radicals at atmospheric pressure, *J. Mass. Spectrom.*, 44, 2009, 477.

Z

[Zubarev, 1998] R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty, Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 3265.

[Zubarev, 1999] R. A. Zubarev, N. A. Kruger, K. E. Fridriksson, M. A. Lewis, D. M. Horn, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, Electron capture dissociation of gaseous multiply-charged proteins is favored at disulfide bonds and other sites of high hydrogen atom affinity. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1999, 2857.

[Zubarev, 2002] R. A. Zubarev, K. F. Haselmann, B. Budnik, F. Kjeldsen, F. Jensen, Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation: a historical perspective and modern ideas, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 8, 2002, 337.

CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

L'objectif de ce travail a été de poursuivre l'étude par photoionisation à pression atmosphérique (APPI) de biomolécules plus ou moins polaires afin d'en élargir le champ d'application. Ce travail a commencé il y a quelques années au sein de l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN et le but est de montrer que cette source APPI est un outil très efficace pour l'étude des mécanismes de formation des ions ainsi que pour l'élucidation des voies de fragmentation. En effet, l'APPI est une technique utile pour obtenir une information structurale alternative aux autres techniques (electronebullisation, MALDI,..) et offre donc de nouvelles solutions pour mieux comprendre le comportement de molécules biologiques sous irradiation UV et à pression atmosphérique.

La finalité est de comprendre les phénomènes de fragmentation sous APPI afin de pouvoir les contrôler en utilisant les paramètres appropriés pour chaque type de molécules étudiées.

Dans un premier temps, les expériences faites à l'aide de la lampe au krypton ont permis d'obtenir des spectres riches de fragments divers voire même exotiques et caractéristiques d'une longueur d'onde fixée à 10,0 eV et minoritairement à 10,6 eV. Dans un second temps, l'utilisation du rayonnement synchrotron a donné l'avantage d'ajouter une dimension supplémentaire à ces spectres APPI-MS qui est la variation de longueur d'onde. Ce nouveau paramètre apporte des informations complémentaires grâce à l'étude de l'évolution des réactions mises en jeu selon les longueurs d'ondes choisies.

Au cours de ce travail, il a donc été démontré que l'utilisation combinée de la source APPI et du rayonnement synchrotron est un outil très efficace pour la caractérisation de nouvelles molécules grâce à cette grande variation de longueur d'ondes possible et qu'elle apporte même des informations supplémentaires à celles obtenues avec la lampe au krypton à même longueur d'onde.

Ces travaux ont permis de mettre à jour une nouvelle chimie portant aussi bien sur des phospholipides, des nucléotides, que des peptides et autres classes de composés. Le rayonnement synchrotron a permis ainsi de démontrer les rôles respectifs des photons ultraviolets lors des réactions nébullisat-photons sur chacune des structures moléculaires étudiées mais aussi sur le solvant et dopant ajoutés. Ceci a été faisable en étudiant l'évolution de l'intensité des ions en fonction de la longueur d'ondes utilisée et des différents seuils d'ionisation comme celui du méthanol (cas des peptides), ou certaines fonctions chimiques mettant en lumière le site d'ionisation de la molécule (cas des phospholipides) ou encore du dopant, guidant l'élucidation de la réaction sur un mécanisme radicalaire assisté (cas de la guanine).

L'étude des mécanismes APPI a donc mené à la mise en évidence de réactions mettant en jeu des électrons, comme pour les phospholipides, ou menant à des ions fragments radicalaires provenant de réactions jamais observées auparavant avec les sources d'ions connues comme l'impact électronique, électronébulisation ou le MALDI, ni en spectrométrie de masse en tandem. L'APPI a permis aussi de proposer des mécanismes réactionnels à partir de molécules neutres dans le cas des phospholipides, à partir de molécules monochargées comme pour la guanine, ou de molécules multichargées comme pour les peptides. Certains des ions fragments générés proviennent de processus radicalaires à partir d'électrons libres ou de radicaux H[•] ou de réactions de transfert de charge ou de transfert de proton à partir du solvant ou du dopant. Ces expériences ont pu mettre en évidence la présence de seuils énergétiques pour la réaction de transfert d'hydrogène.

Pour la suite de ce travail, d'autres classes de molécules seraient intéressantes à étudier avec cette technique comme les sucres en mode positif, les spectres en mode négatif ayant été trop complexes à interpréter, ou les acides nucléiques, ou encore d'autres classes de peptides ou de molécules insaturées pour mieux appréhender le mécanisme réactionnel de

dichlorocyclopropanation. Les perspectives les plus intéressantes restent encore dans le couplage du rayonnement synchrotron avec la LC et l'APPI. En effet, l'avantage analytique d'un tel couplage serait d'aller au delà de la limitation de l'APPI pour l'étude de molécule de haut poids moléculaire et apporterait information et compréhension des propriétés réactionnelles pour chacun des peptides obtenus à partir de la protéine digérée selon la longueur d'onde.

D'autres perspectives seraient de pouvoir continuer le travail déjà mené sur les biomolécules mais à des valeurs d'énergies d'ionisation supérieures à celles qui ont été expérimentées en utilisant le pompage différentiel. L'étude de la photochimie des solvants comme l'eau et des gaz serait alors possible.

L'APPI a prouvé à travers ce travail et au vu du domaine d'application encore vaste, qu'il semble évident qu'il reste à cette technique un bel avenir devant elle, et aux vues des résultats originaux et encourageants qu'elle n'a pas encore suffisamment pris toute son ampleur dans la communauté scientifique.

FIGURES

CHAPITRE 1 : LES SPECTROMETRES DE MASSE

Figure 1 : Schéma explicatif d'un spectromètre de masse.

Figure 2 : Photographie du spectromètre de masse MALDI ToF-ToF 4800 par AB Sciex.

Figure 3 : Schéma de principe du mécanisme MALDI montrant l'irradiation, la désorption, la désolvatation et l'ionisation par laser pulsé sur le dépôt échantillon-matrice.

Figure 4 : Composants basiques d'un ToF/MS linéaire.

Figure 5 : Composants basiques d'un ToF/MS reflectron.

Figure 6 : Principe de l'extraction retardée [Salpin, 2003].

Figure 7 : Schéma du spectromètre de masse 4800 MALDI ToF-ToF (d'après AB Sciex).

Figure 8 : Schéma de principe d'un détecteur composé de deux galettes de micro-canaux en série et d'une anode.

Figure 9 : Photographie du spectromètre de masse LTQ-XL-Orbitrap par Thermo Scientific.

Figure 10 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap.

Figure 11 : Schéma de principe de l'ionisation electrospray, d'après [Kearle, 2000].

Figure 12 : Trappe linéaire ou 2D avec deux fentes dans deux barres opposées laissant passer les ions jusqu'aux détecteurs D_1 et D_2 .

Figure 13 : Comparaison du diagramme de stabilité d'une trappe 3D (à gauche) et d'une trappe 2D (à droite) d'après [de Hoffmann, 2005].

Figure 14 : Schéma de principe d'un analyseur Orbitrap.

Figure 15 : Le Q-Star Pulsar i par Applied Biosystems Sciex.

Figure 16 : Schéma de principe du spectromètre de masse Qstar pulsar i.

Figure 17 : Schéma d'un analyseur quadripolaire d'après [Watson, 1997].

Figure 18 : Diagramme de stabilité d'un ion de masse m donnée selon x ou y dans un quadripôle. Les zones de stabilité sont entourées et notées A à D. La zone A (agrandie) est la zone couramment utilisée dans les spectromètres de masse. La partie hachurée correspond à U positif, d'après [March, 1989].

Figure 19 : Droite de fonctionnement. La résolution entre ces ions est d'autant plus grande que la pente de la droite est élevée.

Figure 20 : Schéma de principe d'un analyseur temps-de-vol à injection orthogonale.

Figure 21 : Schéma agrandi sur la zone du couplage du quadripôle avec la cellule de collision q_2 et du ToF (pulseur, extraction retardée) illustrant les impulsions d'ions par la cellule de collision [Chernushevich, 2001].

Figure 22 : Schéma des différences de potentiel appliquées entre les différentes lentilles du Qstar (OR : orifice, SK : skimmer, Q_0 : quadripôle 0, IQ_1 : interface quadripôle 1, RO_1 : quadripôle 1, IQ_2 : interface quadripôle 2, RO_2 : quadripôle 2) [Bagag, 2008].

Figure 23 : Schémas du détecteur à double MCP (Multiple Channel Plate, Galette de micro-canaux) en chevron avec anode séparée en quatre quadrants (d'après la documentation IonWerks).

CHAPITRE 2 : L'APPI (Photo-Ionisation à Pression Atmosphérique)

Figure 1: Diagramme énergétique de la distance interatomique d'une molécule en fonction de l'énergie. P_{Iv} indique la transition verticale et P_{Ia} la transition adiabatique.

Figure 2 : Schéma de la source Photospray™ commercialisée par AB Sciex.

Figure 3: Schéma de principe de la source Photomate™ par Syagen Technologies inc., d'après les documents Agilent (<http://www.chem.agilent.com>).

Figure 4 : Lampe de photoionisation Cathodeon™ utilisée avec la source d'ions APPI.

Figure 5 : Fenêtre de transmission à travers le saphir, LiF et MgF₂.

Figure 6 : Schéma d'une ligne de lumière (http://www.epsim.fr/IMG/pdf_machine_Fiche_prof.pdf).

Figure 7: Représentation schématique des éléments optiques de la ligne DISCO, D : diaphragme; CF : doigt froid; Mx : miroirs; Gx : réseaux; HFP : point focal horizontal; VFP : point focal vertical; CX1 : station expérimentale, SRCD; CX2 : station expérimentale APEX; CX3 : station expérimentale Microscopie. Les distances du point de source sont indiquées en mm pour certains éléments [Giuliani, 2009].

Figure 8 : Schéma présentant les énergies d'ionisation des molécules présentes dans la source d'ion APPI (solvants, dopants, composants de l'air).

Figure 9 : Spectre d'émission de la lampe au Krypton de la source Photospray™, d'après les documents Cathodeon (<http://www.cathodeon.com>).

Figure 10 : Représentation schématique de la μ APPI [Kauppila, 2004c].

Figure 11 : Vue schématique d'une source APLI. Le laser est représenté par le cercle relié à la flèche présentant la formation d'ions. PV=valve pulsée; DP=étape de pompage différentiel; IS= source d'ion; IO= optiques pour les ions; A=analyseur; +/- = fort potentiel de tension d'électrode répulsif / extraction. Les zones en pointillées indiquent les régions à la valeur ou au-dessus de la valeur de la pression atmosphérique [Constapel, 2005].

Figure 12 : Vue schématique de la source DAPPI.

CHAPITRE 3 : LES ACETOGENINES D'ANNONACEAE

Figure 1 : Photographie a) d'un fruit du corossolier (ou corossol) et b) fruit de l'asiminier.

Figure 2 : Spectre de masse ESI-MS de l'annonacine enregistré avec le LTQ-Orbitrap.

Figure 3 : Spectre de masse ESI-MS/MS (CID = 50 u.a. et temps d'activation = 33 ms) de l'annonacine protonée ($[M+H]^+$) enregistré avec le LTQ-Orbitrap.

Figure 4 : Spectre de masse ESI-MS/MS (CID = 50 et temps d'activation = 33 ms) de l'annonacine cationisée au sodium ($[M+Na]^+$) enregistré avec le LTQ-Orbitrap.

Figure 5a : Spectre de masse ESI-MS de l'annonacine avec un sel de lithium ajouté enregistré avec le LTQ-Orbitrap.

Figure 5b : Spectre de masse ESI-MS/MS (CID = 50 et temps d'activation = 33 ms) de l'annonacine cationisée au lithium ($[M+Li]^+$) avec le LTQ-Orbitrap.

Figure 6 : Spectre de masse MS de l'annonacine en mode d'ionisation négatif avec le LTQ-Orbitrap.

Figure 7 : Spectre de masse ESI-MS/MS (CID = 50 et Activation Time = 33 ms) de l'annonacine déprotonée ($[M-H]^-$) avec le LTQ-Orbitrap.

Figure 8 : Spectre de masse MALDI-MS de l'annonacine (intensité de laser = 4500).

Figure 9 : Spectre de masse MALDI-MS/MS de l'annonacine cationisée au sodium ($[M+Na]^+$) (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

Figure 10 : Spectre MALDI-MS d'une solution d'annonacine après ajout d'un sel de lithium (intensité de laser = 4500).

Figure 11 : Distribution isotopique théorique de l'annonacine.

Figure 12 : Spectre de masse MS/MS de l'annonacine cationisée au lithium ($[M+Li]^+$) en mode *CID off*.

Figure 13 : Spectre de masse MALDI-MS/MS de l'annonacine cationisée au lithium ($[M+Li]^+$), en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

Figure 14 : Spectre de masse ESI-MS de l'annonacine dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) à une concentration de 20 ng/μL.

Figure 15 : Spectre de masse ESI-MS/MS de l'annonacine cationisée au lithium (m/z 603,28) $[M+Li]^+$ à CE = 60 eV, enregistré dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) à une concentration de 5 ng/μL.

Figure 16 : Spectre de masse APPI (FIAMS) de l'annonacine enregistrée dans le mélange H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) + 0.1% TFA à 300°C la lampe éteinte (mode *lamp off*) à une concentration de 25 ng/μL sans dopant.

Figure 17 : Spectre de masse APPI (FIAMS) de l'annonacine enregistrée dans le mélange H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) + 0.1% TFA à 300°C avec la lampe allumée (mode *lamp on*) à une concentration de 25 ng/μL sans dopant.

Figure 18 : Spectre de masse APPI (FIAMS) de l'annonacine enregistrée dans le mélange H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) + 0.1% TFA à 300°C avec la lampe éteinte (mode *lamp off*) à une concentration de 5 ng/μL avec une solution de sel de lithium à 100 ng/μL sans dopant.

Figure 19 : Spectre de masse APPI (FIAMS) de l'annonacine enregistrée dans le mélange H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) + 0.1% TFA à 300°C avec la lampe allumée (mode *lamp on*) à une concentration de 5 ng/μL avec une solution de sel de lithium à 100 ng/μL sans dopant.

Figure 20 : Spectre MALDI-MS/MS de l'annonacinone cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

Figure 21 : Spectre MALDI-MS/MS de la *cis*- and *trans*-annonacine cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

Figure 22 : Spectre MALDI-MS/MS de la narumicine-2 cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

Figure 23 : Spectre MALDI MS/MS de la squamocine cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

Figure 24 : Spectre MALDI-MS/MS de la désacétyl-uvaricine cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

Figure 25 : Spectre MALDI-MS/MS de la montécristine cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on*, (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

Figure 26 : Spectre MALDI-MS/MS de la diépomuricanine cationisée au lithium $[M+Li]^+$ en mode *CID on* (intensité de laser de 4500, énergie de collision = 2 keV, gaz = argon à $3.6 \cdot 10^{-6}$ hPa).

CHAPITRE 4 : LA GUANINE

Figure 1 : Spectres de masse APPI de la guanine enregistré dans l'eau à 400°C.

Figure 2 : Spectre de masse APPI de la guanine enregistré dans le méthanol à 400°C.

Figure 3 : Spectres de masse APPI de la guanine enregistré à 400°C en présence d'anisole.

Figure 4 : Spectre de masse SR-APPI de la guanine enregistré à 450°C dans le mélange H₂O/CH₃OH (50/50 , v/v) sans dopant et avec une énergie des photons de 8,0 eV.

Figure 5 : Intensité du pic de la guanine protonée étudiée par SR-APPI-MS à 450°C dans le mélange H₂O/CH₃OH (50/50, v/v) sans dopant en fonction de l'énergie des photons (les pointillés permettent de suivre plus aisément l'évolution de la courbe).

Figure 6 : Intensité des pics de la guanine protonée étudiée par SR-APPI-MS à 450°C dans le mélange H₂O/CH₃OH (50/50 , v/v) avec l'anisole comme dopant en fonction de l'énergie des photons (les pointillés permettent de suivre plus aisément l'évolution de la courbe).

Figure 7 : Spectre de masse SR-APPI de la guanine enregistré à 450°C dans le mélange H₂O/CH₃OH (50/50 , v/v) avec l'anisole comme dopant à 9,0 eV.

Figure 8 : Ratio (%) entre l'intensité du pic de l'ion m/z 151 (M^+) et m/z 152 ($[M+H]^+$) en fonction de l'énergie des photons enregistré par SR-APPI-MS avec l'anisole comme dopant (les pointillés permettent de suivre plus aisément l'évolution de la courbe).

CHAPITRE 5 : LES PHOSPHOLIPIDES

Figure 1 : Structure générale de la famille des phospholipides avec :

R_1 = Chaîne carbonée : *ether gras, vinyl ether gras, acyle gras,*

R_2 = Chaîne carbonée : *acyle gras,*

R_3 = Groupe polaire : *choline, éthanolamine, inositol, sérine, glycérol,*

[Pulfer & Murphy, 2003].

Figure 2 : Représentation de la DOPC.

Figure 3 : Spectre de masse ESI-MS/MS de la DOPC (m/z 786,6) enregistré sur le LTQ-Orbitrap à une énergie CID=40. (R = chaîne grasse C₁₇H₃₃).

Figure 4 : Formation de l'ion m/z 184 à partir de la phosphatidylcholine [Hsu & Turk, 2003].

Figure 5 : Spectres de masse APPI de la DOPC à (a) 300°C, (b) 400°C, (c) 500°C avec le MeOH comme solvant LC et sans dopant.

Figure 6 : Mécanisme pour la formation de l'ion m/z 490 [Delobel, 2005].

Figure 7 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec le faisceau polychromatique.

Figure 8 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec une énergie de photons de 9,0 eV.

Figure 9 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec une énergie de photons de 10,0 eV.

Figure 10 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif sans dopant et avec une énergie des photons de 10,8 eV.

Figure 11 : Formation de l'ion $[M+H-183]^+$ à partir d'une phosphatidylcholine, [Hsu & Turk, 2003].

Figure 12 : Formation de l'ion $[M+H-183]^+$ à partir d'une phosphatidylcholine [Delobel, 2005].

Figure 13 : Intensité relative de l'ion m/z 603,5 en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Figure 14 : Intensité relative de l'ion m/z 772,6 en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Figure 15: Rapport (%) entre les intensités de l'ion m/z 603 ($[M+H-183]^+$) correspondant à la perte de la tête polaire et de l'ion m/z 772 ($[M+H-CH_3]^+$) correspondant à la perte du radical méthyl en fonction de l'énergie de photon enregistré par SR-APPI-MS. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Figure 16 : Mécanisme proposé de la perte du radical à partir de l'espèce protonée.

Figure 17 : Mécanisme proposé de la perte de la tête polaire à partir de l'ion déméthylé m/z 772.

Figure 18 : Intensité relative de l'ion m/z 504,3 correspondant à la perte de la chaîne C18:1 en *sn*-1 ou *sn*-2 en fonction de l'énergie de photon. Le trait sert à donner une ligne directrice.

Figure 19 : Transmission enregistrée de 50 à 250 nm dans l'air à une atmosphère (1013 hPa) avec une fenêtre en MgF₂ séparant la ligne du pompage différentiel.

Figure 20 : Mécanisme pour la formation de l'ion m/z 504 à partir de la DOPC [Hsu & Turk, 2003].

Figure 21 : Réaction chimique proposée pour la méthylation à partir de l'ion phosphocholine m/z 184.

Figure 22 : Spectre de masse APPI de la DOPC à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant avec le faisceau polychromatique.

Figure 23 : Représentation de la DOPDe.

Figure 24 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPDe à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif sans dopant avec le faisceau polychromatique.

Figure 25 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 170 correspondant à l'ion phospho-N,N-diméthylethanolamine en fonction de l'énergie de photons. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Figure 26 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 184 correspondant à l'ion phosphocholine en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Figure 27 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 603 correspondant à la perte de la tête polaire de la DOPDe $[M+H-169]^+$ en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Figure 28 : Intensité relative du pic de l'espèce protonée $[M+H]^+$ à m/z 772 en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Figure 29 : Représentation de la DOPMe.

Figure 30 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPMe à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif sans dopant avec le faisceau polychromatique.

Figure 31 : Mécanisme proposé pour l'ion m/z 322. L'annotation [*] correspond à la référence de [Berry & Murphy, 2004].

Figure 32 : Représentation de la DOPE.

Figure 33 : Spectres de masse APPI de la DOPE à (a) 300°C, (b) 400°C, (c) 500°C avec le MeOH comme solvant LC et sans dopant.

Figure 34 : Spectre ESI-MS/MS de la DOPE protonée (m/z 744) (CID=40) enregistré avec le LTQ-Orbitrap. R étant la chaîne d'acide gras C18 :1

Figure 35 : Spectre de masse SR-APPI de la DOPE à 450°C dans le méthanol enregistré en mode d'ionisation positif sans dopant avec le faisceau polychromatique.

Figure 36: Intensité relative du pic de l'ion m/z 603 $[M+H-141]^+$ en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Figure 37 : Mécanisme proposé pour la perte du radical hydrogène à partir de l'espèce protonée.

Figure 38: Mécanisme proposé pour l'ion m/z 308 pour la DOPE. L'annotation [*] correspond à la référence de [Berry & Murphy, 2004].

Figure 39 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 308 correspondant en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé permet de suivre plus aisément l'évolution de la courbe.

Figure 40 : Représentation de la a) C18:1 – C16:0 PC et b) C16:0 - C18:1 PC.

Figure 41: Spectre de masse APPI de la (a)18:1 – 16:0 PC et la (b) 16:0 – 18:1 PC à 450°C avec le MeOH utilisé comme solvant LC sans dopant avec la lampe au krypton.

Figure 42 : Spectre de masse SR-APPI de la (a) 18:1 – 16:0 PC et la (b) 16:0 – 18:1 PC à 450°C avec le MeOH utilisé comme solvant LC sans dopant avec le rayonnement synchrotron.

Figure 43 : Mécanisme réactionnel stéréosélectif de dichlorocyclopropanation du carbène singulet sur un alcène d'après [Skell & Garner, 1956] et [Hoffman, 1968].

Figure 44 : Zoom de la région [740-840] du spectre de masse APPI du DOPE à 450°C avec le chloroforme utilisé comme éluant et solvant sans dopant avec la lampe au krypton.

Figure 45 : Distribution isotopique de l'adduit CCl_2 du DOPE après traitement (smooth et baseline subtract). Les cercles indiquent la distribution théorique pour ce fragment.

Figure 46 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 826 correspondant à l'adduit au dichlorocarbène de la forme *cis* noté $[\text{M}_{cis}+\text{H}+\text{CCl}_2]^+$ en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé sert à donner une ligne directrice visuelle.

Figure 47 : Intensité relative du pic de l'ion m/z 826 correspondant à l'adduit au dichlorocarbène de la forme *trans* noté $[\text{M}_{trans}+\text{H}+\text{CCl}_2]^+$ en fonction de l'énergie de photon. Le trait en pointillé sert à donner une ligne directrice visuelle.

CHAPITRE 6 : LES PEPTIDES

Figure 1 : Nomenclature pour la fragmentation des peptides.

Figure 2 : Spectre de masse SR-APPI de la substance P à 450°C dans le mélange méthanol/eau (50/50, v/v) enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec une énergie des photons de 8,7 eV.

Figure 3 : a) Spectre de masse SR-APPI de la substance P à 450°C dans le mélange méthanol/eau (50/50, v/v) enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec une énergie des photons à 9,2eV, b) agrandissement de la région m/z [200-780].

Figure 4 : Intensité relative du pic des ions correspondant à a) l'espèce doublement chargée, b) l'espèce simplement chargée c) l'ion fragment c_5 d) l'ion fragment c_5 étudié avec le dopant toluène en fonction de l'énergie de proton. e) rapport entre l'intensité du pic de l'ion $[M+H]^+$ et l'ion $[M+2H]^{2+}$ en fonction de l'énergie de proton.

Figure 5 : Spectre de masse SR-APPI de la substance P à 450°C dans le mélange méthanol/eau (50/50, v/v) enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec le faisceau polychromatique.

Figure 6 : Spectre de masse SR-APPI de la substance P à 450°C dans le mélange méthanol/eau (50/50, v/v) enregistré en mode d'ionisation positif avec l'acétone comme dopant et avec le faisceau polychromatique.

Figure 7 : Intensité relative du pic des ions correspondant à a) l'ion doublement chargé et b) l'ion simplement chargé et c) l'ion fragment c_5 étudié avec le dopant acétone en fonction de l'énergie de proton. d) rapport entre les intensité du pic de l'ion $[M+H]^+$ et l'ion $[M+2H]^{2+}$ en fonction de l'énergie de proton.

Figure 8 : Spectre de masse SR-APPI du substrat de CDK5 enregistré à 450°C dans le mélange eau/méthanol en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec une énergie des photons de 7,0 eV.

Figure 9 : Spectre de masse SR-APPI du substrat de CDK5 à 450°C dans le mélange eau/méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant et avec une énergie des photons de 9,2 eV.

Figure 10 : Spectre de masse SR-APPI du substrat CDK5 à 450°C dans l'eau/méthanol enregistré en mode d'ionisation positif avec le toluène comme dopant avec le faisceau polychromatique.

Figure 11 : Spectre de masse APPI (FIAMS) du peptide inhibiteur de MEK1 dans le mélange H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré en lampe éteinte (mode *lamp off*) avec comme dopant le toluène.

Figure 12 : a) Spectre de masse APPI (FIAMS) du peptide inhibiteur de MEK1 dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré en lampe allumée (mode *lamp on*) avec comme dopant le toluène, b) agrandissement du spectre de masse de la région *m/z* [100-950].

Figure 13 : Spectre de masse APPI (FIAMS) du peptide inhibiteur Myr- MEK1 dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré en lampe éteinte (mode *lamp off*) avec comme dopant le toluène.

Figure 14 : Spectre de masse APPI (FIAMS) du peptide inhibiteur Myr-MEK1 dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré en lampe allumée (mode *lamp on*) avec comme dopant le toluène.

Figure 15 : Spectre de masse nano-ESI du peptide inhibiteur Myr-MEK1 dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré par le LTQ-Orbitrap.

Figure 16 : Spectre nano-ESI/MS-MS de l'espèce doublement chargée [M+H]²⁺ du peptide Myr-MEK1 (*m/z* 851,5) (CID = 25 u.a. et temps d'activation = 33 ms) dans H₂O / MeOH (1/1 ; v/v) enregistré par le LTQ-Orbitrap

TABLEAUX

CHAPITRE 1 : LES SPECTROMETRES DE MASSE

Tableau 1 : Liste des matrices utilisées lors de la préparation des expériences sur les acétogénines avec leur structure, masse et coefficient d'extinction.

Tableau 2 : Les paramètres instrumentaux que l'utilisateur peut modifier à partir de [Bagag, 2008].

CHAPITRE 2 : L'APPI (Photo-Ionisation à Pression Atmosphérique)

Tableau : Energies d'ionisation de divers composés organiques (valeurs obtenues sur le NIST Webbook, [http : //webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov)).

Tableau 2 : Quelques données concernant les lampes de photoionisation Cathodeon™ (http://www.alphalight.co.kr/web_data/down/Specialist.pdf).

Tableau 3 : Energies d'ionisation de divers composés organiques, présentés par rapport à l'énergie des photons fournis par les lampes à Ar, Kr et Xe (valeurs obtenues sur le NIST Webbook, [http : //webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov)).

Tableau 4 : Récapitulatif des dopants usuels et utilisés lors de cette thèse avec leur formule chimique et structure.

Tableau 5 : Réactions observées en photoionisation à pression atmosphérique en mode d'ionisation négatif d'après [Kauppila, 2004b].

Tableau 6 : Champ d'application de l'APPI avec les sources utilisées, le dopant utilisé et la polarité des molécules étudiées.

CHAPITRE 3 : LES ACETOGENINES D'ANNONACEAE

Tableau 1 : Sous-types de la méthyl-lactone actuellement répertoriée pour les acétogénines de type Annonaceae d'après [Bermejo, 2005].

Tableau 2: Liste des huit acétogénines utilisées lors de l'étude comparative des quatre spectromètres de masse.

Tableau 3: Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse de l'annonacine avec le LTQ-Orbitrap.

Tableau 4 : Récapitulatif des ions étudiés en fonction de l'énergie de collision et du temps d'activation.

Tableau 5 : Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par le MALDI ToF-ToF de l'annonacine.

Tableau 6 : Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par le MALDI ToF-ToF de l'annonacine.

Tableau 7 : Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par l'ESI-Q-Star lors de l'analyse de l'annonacine.

Tableau 8 : Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par l'ESI-Q-Star lors de l'analyse de l'annonacine.

Tableau 9 : Paramètres expérimentaux et instrumentaux de l'APPI-Q-Star utilisés lors de l'analyse de l'annonacine.

Tableau 10: Paramètres expérimentaux utilisés pour l'analyse par l'APPI-Q-Star lors de l'analyse de l'annonacine.

CHAPITRE 4 : LA GUANINE

Tableau 1 : Récapitulatif des 5 nucléobases, leur structure et implication dans l'ADN/ARN.

Tableau 2 : Energies d'ionisation (EI) et affinités protoniques (AP) des nucléobases et des molécules de dopants. Valeurs obtenues sur le *NIST Webbook* [Linstrom, 2005] à l'exception de l'AP du radical méthoxyphenyl qui a été trouvé d'après [Kauppila, 2004].

Tableau 3 : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse de la guanine.

Tableau 4 : Valeur de l'enthalpie de réaction de transfert d'hydrogène calculée avec les valeurs extrêmes d'EI de la guanine (**Tableau 2**) et rapport des intensités du cation radicalaire moléculaire sur la molécule protonée pour chaque base dans l'eau et dans le méthanol.

Tableau 5 : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse de la guanine.

Tableau 6 : Récapitulatif des réactions mises en jeu lors de l'étude de la guanine avec le mélange de solvants MeOH/H₂O et l'anisole par SR-APPI.

Tableau 7 : Récapitulatif des énergies d'ionisation (EI) et affinités protoniques (AP) des nucléobases et molécules de dopant et solvant. Les données proviennent de NIST database à l'exception de l'AP du radical methoxyphenyl [Kauppila, 2004].

CHAPITRE 5 : LES PHOSPHOLIPIDES

Tableau 1 : Liste des fonctions chimiques possibles au niveau des résidus R₁, R₂ et R₃ d'un phospholipide.

Tableau 2 : Liste des huit phospholipides étudiés dans ce chapitre.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des ion-fragments obtenus lors des diverses fragmentations sur le lipide DOPC.

Tableau 4 : Energies d'ionisation de divers composés organiques (valeurs obtenues sur le NIST Webbook, [http : //webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov)) à l'exception du phosphate [Colson, 1993].

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des ion-fragments obtenus lors des diverses fragmentations sur les phospholipides. De nombreux ions des spectres DOPDe, DOPMe, DOPE sont communs à ceux de la DOPC par conséquent n'ont pas été répétés.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des ion-fragments obtenus lors des diverses fragmentations sur les phospholipides. De nombreux ions des spectres C18:1 – C16:0 PC et C16:0 - C18:1 PC sont communs à ceux de la DOPC par conséquent n'ont pas été répétés.

Tableau 7 : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés lors de l'analyse du phospholipide DOPE.

Tableau 8 : Energies d'ionisation des carbènes et du chloroforme. Valeurs obtenues sur le *NIST Webbook* [Linstrom, 2005] [Lee & Suto, 1987] [Brownsword, 1997].

Tableau 9 : rendements quantiques f_H en fonction de la longueur d'onde (nm) et l'énergie des photons (eV).

Tableau 10 : Enthalpies de formation (ΔH_R^{298}) et énergie disponible pour la réaction photochimique après photoabsorption (E_{ex}) [Brownsword, 1997].

Tableau 11 : Intensité en « counts per scan » de l'adduit au dichlorocarbène (m/z 826) et de l'espèce protonée (m/z 744) et le rapport d'intensité de ces deux ions selon la DOPE *cis* et la DOPE *trans*.

SCHEMAS

CHAPITRE 3 : LES ACETOGENINES D'ANNONACEAE

Schéma 1 : Représentation de la lévodopa.

Schéma 2 : Représentation linéaire de l'annonacine.

Schéma 3 : Schéma de l'annonacine comportant les fragments caractéristiques illustrant la nomenclature proposée par Laprévotte et Das [Laprévotte, 1994].

Schéma 4 : Principaux fragments formés lors d'une expérience ESI-MS/MS sur l'ion m/z 603,4 $[M+Li]^+$ de l'annonacine.

Schéma 5 : Schéma de fragmentation des principaux ions formés lors d'expériences CID (basse énergie de collision) sur l'ion $[M+Li]^+$ de l'annonacine.

Schéma 6 : Mécanisme proposé pour la perte du radical méthyl à partir de l'annonacine cationisée au lithium.

Schéma 7: Principaux fragments formés lors d'une expérience MALDI-MS/MS sur l'ion à m/z 603, 4 $[M+Li]^+$ de l'annonacine en mode *CID on* (intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2keV, gaz = argon à $3.6.10^{-6}$ hPa).

Schéma 8 : Mécanisme proposé pour la formation de l'ion à m/z 118.

Schéma 9 : Principaux fragments formés lors d'une expérience MALDI- MS/MS sur l'espèce cationisée au lithium ($[M+Li]^+$) de a) l'annonacine b) l'annonacinone, c) la *cis* and *trans* annonacine, d) la narumicine-2, e) la squamocine, f) la désacétyl-uvaricin, g) la montécristine, h) la diépomuricanine (mode *CID on*, intensité de laser = 4500, énergie de collision = 2keV, gaz = argon à $3.6.10^{-6}$ hPa).

CHAPITRE 6 : LES PEPTIDES

Schéma 1a : Mécanisme de formation des ions *y* et *b* selon [Paizs, 2005].

Schéma 1b : Schéma de fragmentation pour la production des ions de type *b* et *y* par CID à partir d'une espèce multichargée [Syka, 2004].

Schéma 2 : Mécanisme de l'ECD ou mécanisme « Cornell » proposé par Zubarev et Mc Lafferty [Zubarev, 1998]

Schéma 3 : Mécanisme de l'ECD ou mécanisme « Utah-Washington » revu par Syrstad et Tureček [Syrstad, 2005] et Simons [Simons, 2005].

Schéma 4 : Mécanisme de fragmentation proposé pour la formation d'ion fragment *a* et *y* [Tsybin, 2006].

Schéma 5 : Mécanisme de fragmentation de la perte de l'acide phosphorique à partir d'un phosphopeptide multichargé par CID.

