

# Spectrométrie de Masse

## I – Définition

La **spectrométrie de masse (MS)** est une méthode de mesure des **rapports masse sur charge ( $m/z$ )** de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentation (technique destructive, impossible de récupérer les échantillons).

Plusieurs informations peuvent être disponibles :

- ✓ la masse moléculaire d'un composé : **pic moléculaire**,
- ✓ la masse des fragments de ce composé,
- ✓ une mesure quantitative de ce composé...



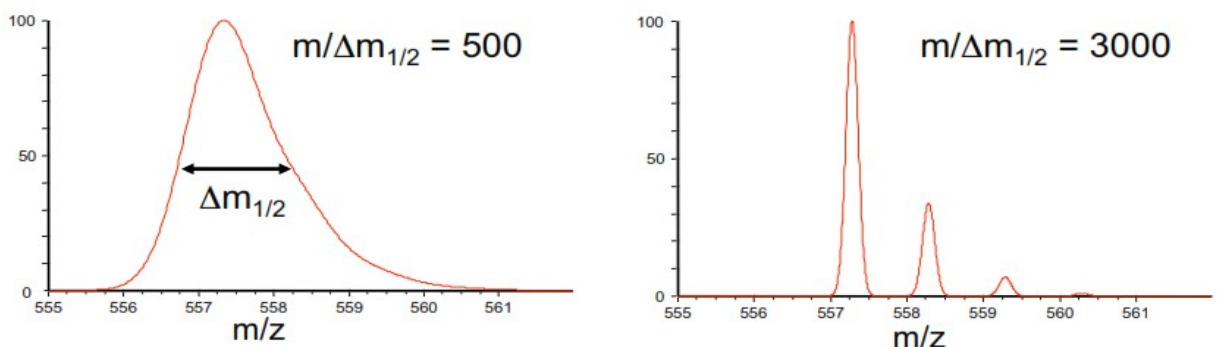
**Masse moyenne** = « masse du chimiste » prend en compte tous les isotopes.

**Masse mono-isotopique** = « masse du physicien » le 1<sup>er</sup> isotope (la masse la plus basse)

**Résolution** =  $m/\Delta m_{1/2}$  donne une idée de la précision d'une analyse

Avec **500** de résolution, on **ne peut pas trouver de formule brute**.

Avec **3 000** de résolution, on **peut définir une formule brute**. Ici, les pics reflètent la même molécules mais avec des masses différentes (ex :  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ).



Leucine enkephaline (YGGFL)

On pourra donc analyser l'abondance isotopique d'une molécule = analyser les pics supérieurs avec les pics moléculaires.

Différents pics (si on a un appareil de haute résolution) :

- m
- m+1 : intensité du pic m par rapport au pic m+1 = nombre de carbone
- m+2 : intensité du pic m par rapport au pic m+2 = nombre d'oxygène et d'azote
- ....

Par exemple, pour la molécule  
 $C_6H_3Cl_3$

La **masse moyenne** ou « **masse du chimiste** » est :

$$6 \times (12,01115) + 3 \times (1,000797) + 3 \times (35,453) = 181,428$$

Donc MW = 181,428  $g \cdot mol^{-1}$

La **masse mono-isotopique** ou « **masse du physicien** » est :

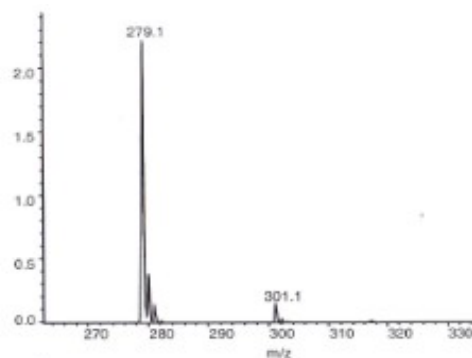
$$6 \times (12,0000) + 3 \times (1,00078) + 3 \times (34,9989) = 179,9990 \text{ (masse exacte) avec ou sans la résolution du quadropole}$$

Soit 180,0 **daltons**

## Visualisation des spectres de masse

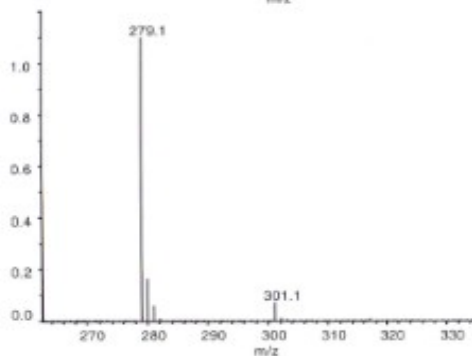
### ☐ Spectre profile

- ✓ Le mode le plus riche
- ✓ Permet de bien visualiser les signaux
- ✓ Permet de différencier des pics réels d'artefacts

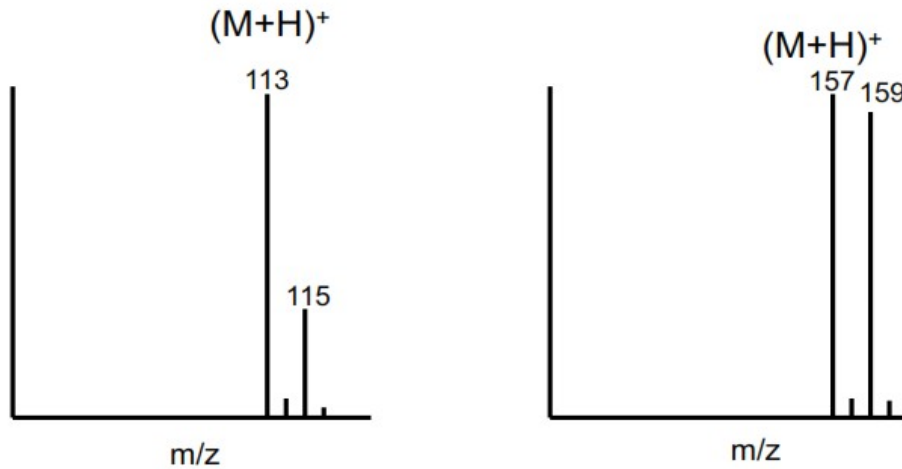


### ☐ Spectre bâton

- ✓ Corresponds au sommet ou au centroïde des pics de masse.
- ✓ Economique en espace disque.

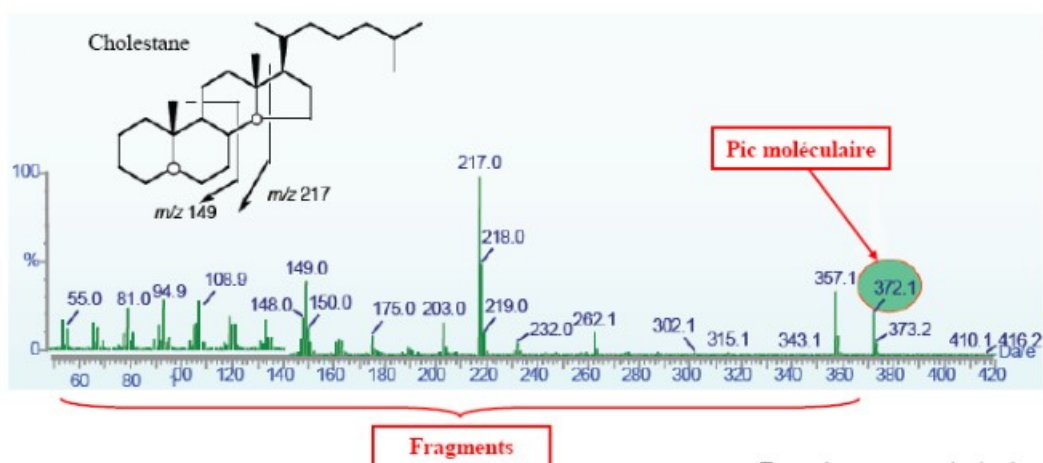


## Distribution isotope



Ici avec le **Cl** :  $m = 113$  ;  $m+1 = 114$  ;  $m+2 = 115$  ;  $m+3 = 116$   
 et avec le **Br** :  $m = 157$  ;  $m+1 = 158$  ;  $m+2 = 159$  ;  $m+3 = 160$   
 Soit **157** molécule avec le  $^{79}Br$  et **159** molécule avec le  $^{81}Br$  (50/50 de répartition)  
 Donc si un seul pic, la molécule aurait pour masse moyenne  $158 \text{ g.mol}^{-1}$   
 et en masse mono-isotopique, on aurait 157 daltons.

- La **valeur  $m/z$**  du pic moléculaire permet de calculer la **masse moléculaire**.
- Les **pics de fragmentation** permettent de reconstituer une partie de la **structure**.
- L'**intensité des pics** permet de faire de l'**analyse quantitative**.



Exemple: spectre en ionisation par impact électronique du cholestane

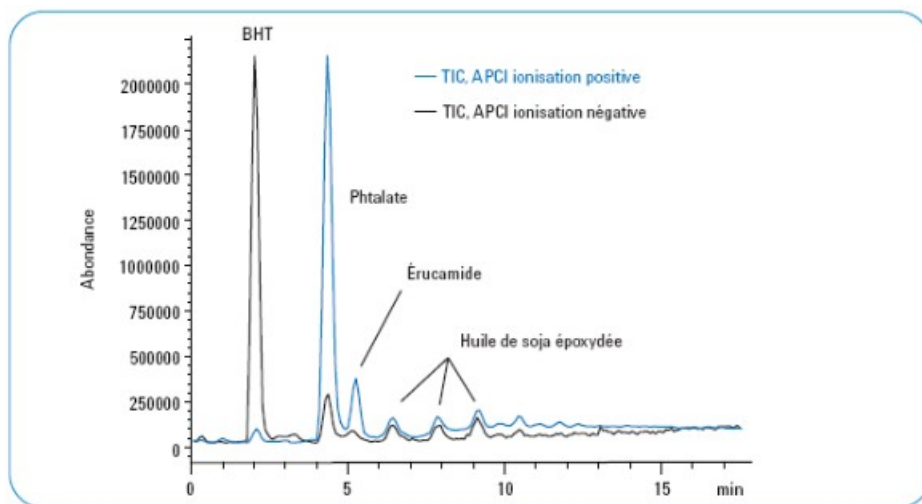
Possibilité de faire des ionisations positives (molécules +) ou négative (molécules -). Par HPLC, on sépare les molécules, en spectrométrie de masse, on les identifie et on les quantifie. En fonction de la technique d'ionisation, on ne détecte pas les mêmes molécules.

En spectrométrie de masse, si une molécule n'est pas ionisée, on ne peut pas l'analyser. Si on analyse des ions, certaines molécules s'analyseront bien en ionisation positive et d'autres en ionisation négative. Par exemple :

- ➔ les protéines peuvent facilement avoir des charges : ionisations positive et négative
- ➔ les polysaccharides simple (ex : cellulose non chargé) : ionisation négative (forcer à arracher un  $H^+$  avec  $CH_2OH \rightarrow CH_2O^-$ ) ou si on veut les analyser en ionisation positive, on ne les verra pas sous forme  $MH^+$  mais sous forme de contre ion  $M+Na$

Par exemple, le glucose en ionisation négative :  $MH = 179$

ou en ionisation positive :  $MH+Na = 180 + 23$  (23 étant la masse du Sodium)



Par **spectrométrie de masse (MS)**, on améliore considérablement la technique d'analyse de détection. Si on a une seule détection par UV visible, on n'est pas capable de les identifier, par contre avec un détecteur de masse, lorsqu'on va identifier spécifiquement chaque masse on peut les séparer et les quantifier séparément même si elles sont toutes dans le même temps de rétention.

= couplage **HPLC/MS** seule technique qui peut le faire pour les identifier et les quantifier.

Vérifier les valeurs de test :

- ➔ que le système est préalablement purifié,
- ➔ qu'il n'y a pas de polluant,
- ➔ que la quantité de l'eau présente dans le détecteur d'analyse est très faible,
- ➔ mesure de la quantité d'eau,
- ➔ possible de mesurer la résolution (basse ou haute).

## II – Le principe

Un spectromètre de masse mesure la masse de molécules isolées. Pour cela, il doit assurer les opérations suivantes :

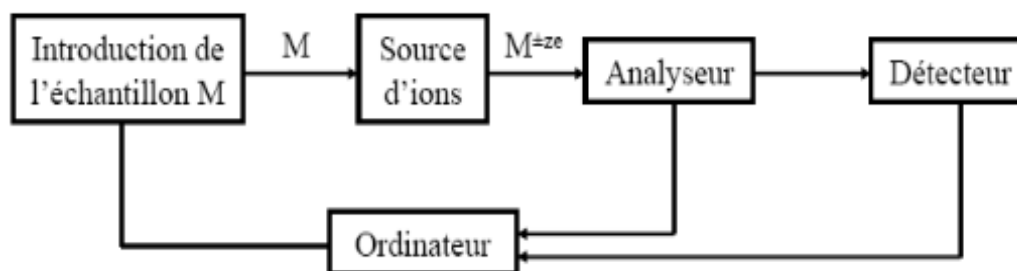
1. **Volatiliser** : Séparer les molécules les une des autres : on passe de l'état de matière condensée à un état gazeux. Cela signifie que les molécules qui vont être détectées en MS doivent être volatiles.
  - Pour les petites molécules < 500 daltons, pas de souci pour volatiliser les molécules.
  - Pour des protéines, des pigments, ce n'est pas si simple que ça.
  - Même sur les petites molécules (glucose : 180 daltons), ce n'est pas facile non plus.
2. **Ioniser** : Transformer des molécules en ions, car un spectromètre de masse fonctionne grâce à des champs électriques et même électro-magnétique. Il faut pouvoir les séparer et les identifier.
3. **Mesurer les rapports  $m/z$**  : La masse moléculaire est calculée à partir du rapport masse ( $m$ )/charge ( $z$ ) et cette détection doit être quantitative.

## III – L'instrumentation

Il y a différents éléments dans un spectromètre de masse :

- ✓ un **système d'introduction de l'échantillon M** : faire entrer la substance M à analyser dans le spectromètre de masse.
  - Par exemple : une HPLC qui est juste avant un MS ou une chromatographie en phase vapeur.
- ✓ une **source d'ions** : sert à produire des ions à l'état gazeux, d'extraire les ions formés et les acheminer vers l'analyseur.
  - éventuellement, en même temps que la molécule va être ioniser, on va pouvoir être en phase vapeur. En fonction des techniques d'ionisation, il va se produire la fragmentation mais pas toujours, cela dépendra des appareils utilisés.
  - il existe de nombreuses méthodes d'ionisation adaptées à la nature de l'échantillon et au type d'analyse à effectuer.
- ✓ un **analyseur** : on a donc un mélange d'ions que l'on va devoir séparer en fonction de la masse et de la charge. C'est un balayage d'un champ magnétique ou électrique ou électro-magnétique.
  - éventuellement, si la fragmentation ne s'est pas réalisée avant, elle peut le faire à cette étape.
  - il y a différents types d'analyseurs : ce qui ne font que séparer les ions et ceux qui permettent aussi de fragmenter ces ions.
- ✓ un **ensemble de détection d'ions** : sert à recueillir les ions séparés par l'analyseur pour produire un courant électrique proportionnel au nombre d'ions (l'intensité du pic = intensité de l'ion).
  - pic total d'ion du chromatographe = quantité électrique d'ion qui est proportionnel au nombre d'ion.

→ souvent un détecteur ampérométrique (quantification et identification / détection des ions).



→ Pour éviter toutes collisions avec des molécules résiduelles, « source, analyseur et collecteur » du spectromètre de masse sont maintenues **sous vide** par un système de pompage fonctionnant en permanence.

→ Le système le plus simple est le CPG/SM ou GC/MS (par rapport au système LC/MS) car pour pouvoir faire de la spectrométrie de masse, on doit mettre en phase vapeur les molécules. Il faut juste les ioniser avant. De plus, c'est moins cher. Petite molécule.

#### **IV – Les sources d'ions**

Il existe de **nombreux types de sources d'ions** et chacun de ces types de sources repose sur un principe physique différent.

Le principe physique qui permet de **volatiliser** et d'**ioniser** un type de composé est choisi par l'opérateur en fonction des caractéristiques de la molécule à analyser (pigments, arômes, ...)

Les étapes de volatilisation et d'ionisation se font successivement ou simultanément selon le type de source.

Les **critères de choix principaux** sont :\*

- la **volatilité et la stabilité thermique du composé à analyser**
- sa **labilité chimique** (stable ou dégradé)
- les **fonctions chimiques présentes et leur aptitude à induire une ionisation**
- la **taille des molécules**
- les **quantités de produits disponibles**
- le **type d'introduction souhaité** (directe ou en couplage chromatographe)

<b>Échantillon</b>	<b>Méthode d'ionisation (abréviation)</b>
Vaporisation (petites molécules volatiles)	Impact électronique (EI)

Échantillon	Méthode d'ionisation (abréviation)
< à 500 Da)	Ionisation chimique (CI)
Impossible ou difficile à vaporiser (> à 500 Da)	Ionisation de champ (FI) Ionisation à pression atmosphérique (API) Ionisation électro-spray (ESI) Désorption de champ (FD) Désorption / ionisation laser (MALDI) Spectrométrie de masse d'ion secondaire (SIMS) Bombardement d'atomes rapides (FAB) Ionisation chimique directe (DCI) Désorption thermique (TD) Ionisation par thermos-spray (TSI)

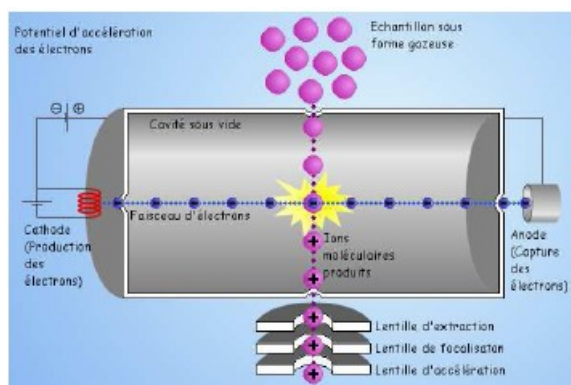
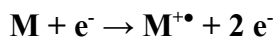
## 1 – Ionisation par impact électronique (EI)\*

L'échantillon gazeux est introduit dans la source où ses molécules (<à 500 g.mol<sup>-1</sup> ou 500 Da) sont frappées par un faisceau d'électrons de **70 eV** d'énergie cinétique (référence). Mais si certaines molécules ne s'ionisent pas, on peut forcer l'ionisation en augmentant l'intensité d'ionisation et passer à **150~200 eV**. Cependant, à **10 ou 15 eV**, on peut former des **ions négatifs** (mais c'est très rare).

Il se forme alors des **ions positifs à 70 eV** :

### Définition :

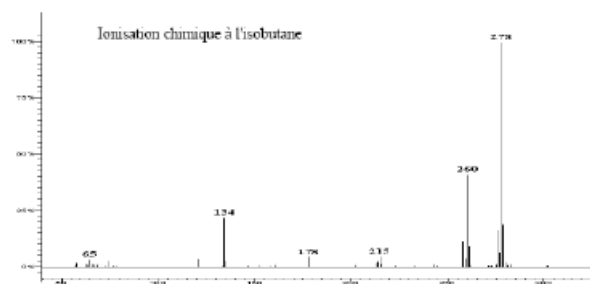
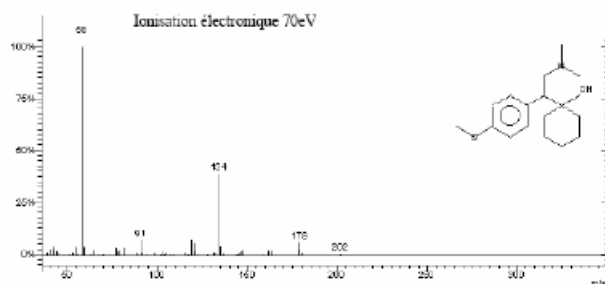
Un électron qui va rentrer en collision avec la molécule (M) va arracher un électron, dans une zone riche en électron, de la molécule. Exemple du carbonyle (C=O : 8 e<sup>-</sup> en jeu).



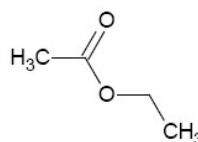
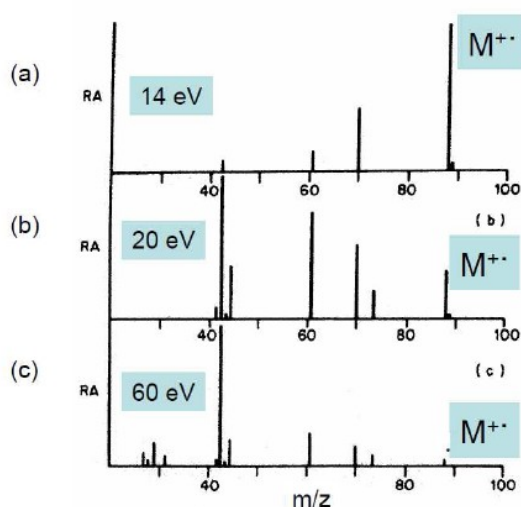
Les cations radicaux peuvent ensuite se fragmenter suivant leur énergie interne. **C'est une technique destructive qui permet de fabriquer beaucoup de fragments.** Couplage GC/MS (chromatographie phase gaz + SM) préférentiellement.

L'EI conduit ainsi à un spectre assez fourni, avec de **nombreux fragments**, très riche en **informations structurales**. Le nombre d'ions formés est proportionnel à la pression de l'échantillon (concentration de la molécule en phase vapeur) et au courant électronique (plus on augmente le volant, plus on va fragmenter) : c'est une **méthode quantitative**.

Cette méthode d'ionisation est **universelle** : la variété des ions formés dépend de l'énergie cinétique des électrons ( $\pm 70$  eV), propriété utile pour l'étude des structures moléculaires.



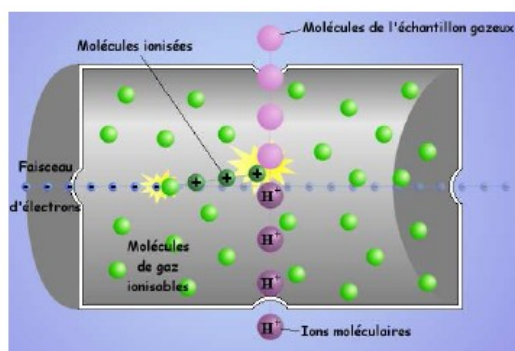
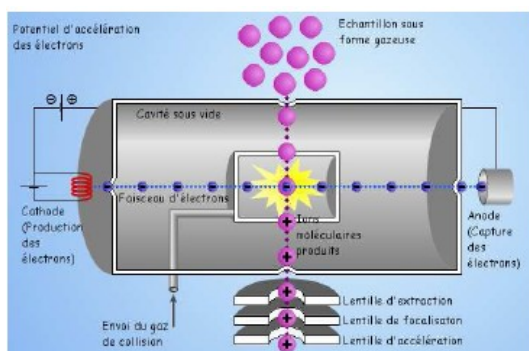
Spectres de masse de la venlafaxine ( $M = 277$  g.mol<sup>-1</sup>)



**Résumé :** Création de beaucoup de fragments donc possibilité de savoir la formule développée de la molécule.

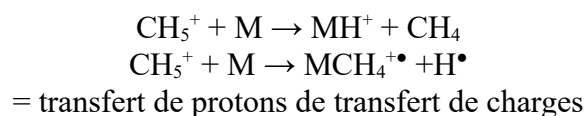
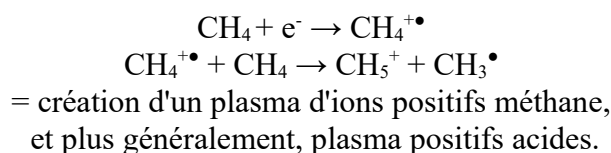
## 2 – Ionisation chimique positive (PCI) (technique complémentaire à l'EI)\*

La substance à analyser est injectée dans la source avec un large excès de gaz (méthane, ammoniac, isobutane, ...). Le gaz (ionisé en premier par l'EI), ionise la substance par transfert de charge. Couplage GC/MS (chromatographie phase gaz + SM) préférentiellement. Utilisé pour des molécules de bas poids moléculaires (< à 500 Da).



Exemple du méthane





**Plasma** = mélange d'ions en phase vapeur

$\text{M}^{+\bullet}$  = pic moléculaire ou poids de la molécule

$\text{MH}^+$  = ion « pseudo-moléculaire » à M+1

$\text{MCH}_4^{+\bullet}$  = ion « pseudo-moléculaire » à M+16 (C = 12 et 4H = 4)

L'ion  $\text{MH}^+$  qui **n'est pas radicalaire** a moins tendance à se fragmenter que l'**ion moléculaire**  $\text{M}^{+\bullet}$  en ionisation électronique → cette ionisation douce permet d'obtenir un ion « pseudo-moléculaire » (M+1).

**Résumé** : on a accès à la masse de la molécule et donc à la formule brute.

### 3 – Ionisation par désorption

- technique adaptée aux molécules pas ou peu volatiles
- adapté aux macromolécules (> à 500 Da) : protéines, polysaccharides, pigments, lipides, vitamines et acides nucléiques (molécules organiques ou pas)
- capable d'analyser les molécules sensibles à la chaleur (thermosensible)
- pas de couplage / tandem car c'est une poudre

On utilise préférentiellement **3 techniques** :

1. le **FAB** : Bombardement d'atomes rapides (à la fois pour les matériaux et un petit peu pour les biomolécules). **Canon à Argon ou Xénon.**
2. le **MALDI** : Ionisation par désorption (rayon) laser assistée d'une matrice. Concerne toutes les biomolécules (peptides, protéines, glycoprotéines et oligonucléotides). Majoritairement utilisé par les biochimistes. La matrice est le glycérol. **Canon à photon en UV ou IR.**
3. le **SIMS** : Ionisation secondaire par spectrométrie de masse (pour les matériaux, molécules inorganiques). **Canon à Argon ou Césium.**

Pour ces 3 techniques de ionisation, le principe est le même. C'est-à-dire que l'on va déposer une molécule sous forme de poudre sur une matrice (glycérol ou paranitrophénol ou thioglycérol), puis on va déposer le tout sur une lame de verre (le plus souvent). Le dépôt ou spot formé est appelé une cible. Pour le **MALDI**, le laser vise la cible pour désorber les molécules et ainsi former des ions.

La séparation de molécules par cette technique est plus « douce » qu'avec les autres méthodes (EI et PCI), donc il n'y aura pas de fragmentation ou très peu de fragmentation (encore moins que dans l'ionisation positive).

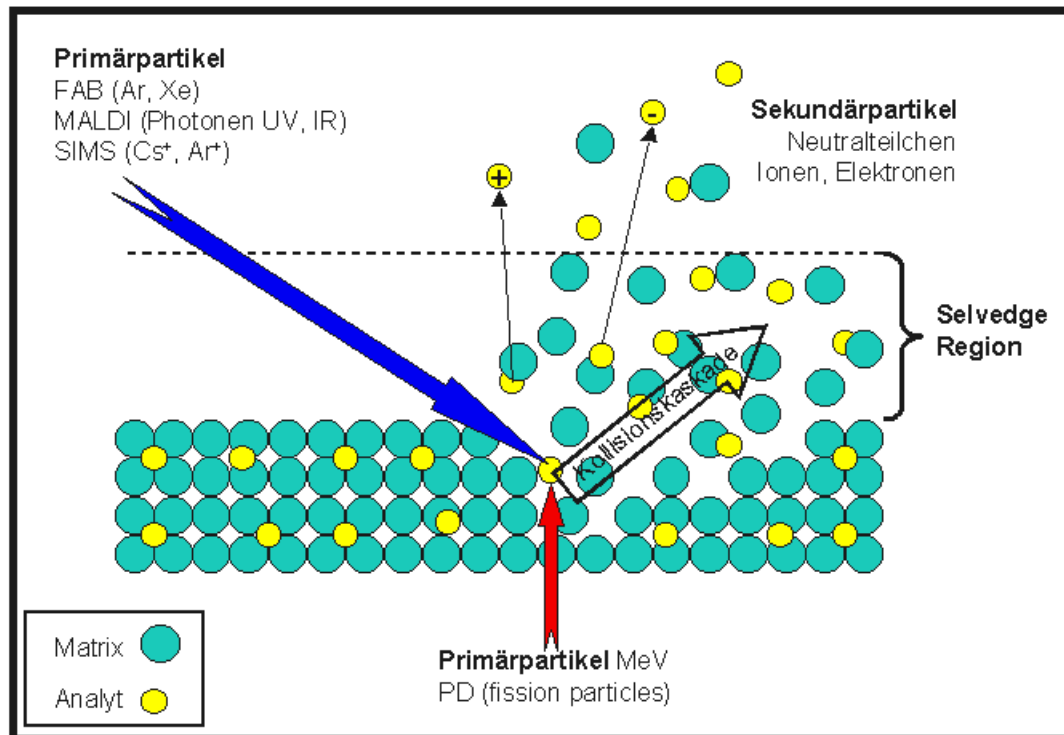
Le **TOF** (qui est souvent couplé au **MALDI**) est un système de détection et de séparation des ions en fonction du temps (le temps que met la molécule qui a été désorbée pour

atteindre le récepteur). La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge.

En règle générale :

- ➔ les molécules les plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur
- ➔ les molécules les plus petites mettront moins de temps à atteindre le détecteur

Une fois l'ion arrivé au détecteur (ampérométrique), le signal est amplifié. Le détecteur va transformer ces ions en courant électrique. Puis le tout est traité par un logiciel qui permettra de donner son résultat sous forme de spectre.

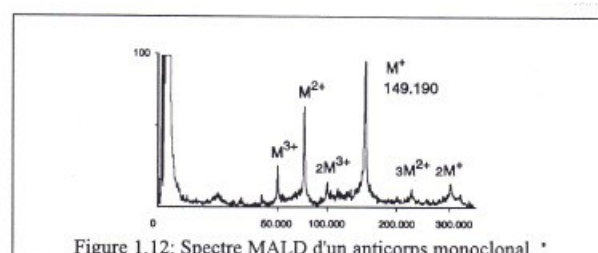
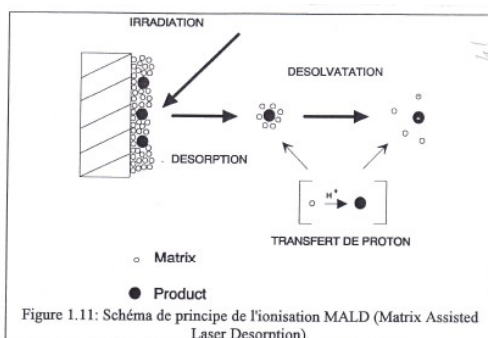


La désolvatation (élimination du solvant) est un système qui va chauffer la source pour éliminer le solvant. Ici, le solvant c'est la matrice donc le glycérol. C'est souvent de l'He ou de l'N à haute  $T^\circ$  qui est présente dans la source avec certains courants parallèles à la sortie des ions.

Au fur et à mesure que l'on chauffe, on a perte de la matrice. \*Au court de cette désolvatation, il se passe un **transfert de protons** (protons du glycérol qui passent sur la molécule : 1 ou plusieurs).

Dans le spray, il va se créer, en fonction de la concentration initiale de la molécule que l'on a mis dans la matrice, il va y avoir, en plus, des **adduits** (= association de plusieurs molécules entre-elles).

On obtient donc des ions « pseudo-moléculaires » ( $M+2$  par ex ou  $2M$ ,  $3M$ , etc.).



On utilise cette technique pour avoir le poids moléculaire de la molécule.

Pour chaque pic (**adduit**), on va calculer la masse, et donc en faisant la moyenne de tous les pics du spectre, on aura la masse moyenne totale de la molécule. Donc ça sera beaucoup plus précis.

**Résumé :** On dépose des molécules à une certaine concentration (la concentration est importante si on veut obtenir des adduits). On bombarde ces molécules pour les désorber de la matrice. On obtient des gouttelettes (sorte de spray) de glycérol. Puis on les désolvate avec de l' $N$  qui permet d'éliminer le glycérol qui est collé aux molécules et cela entraîne un transfert de charge du glycérol vers la molécule (M). Le tout sous vide. Au cours de ce transfert de charge, on crée des molécules qui sont ionisées et, éventuellement, qui sont sous forme d'adduits (2M, 3M, 4M) et derrière, on va détecter des ions. Plus il y aura d'adduits et plus il y aura d'ions, plus on pourra avoir une précision sur l'analyse de la molécule.

Détail sur le **MALDI-TOF** : le **TOF** est un système pour monter (sur un rapport de  $m/z$ ) jusqu'à 300~400 000  $m/z$  (très très haute valeur de masse).

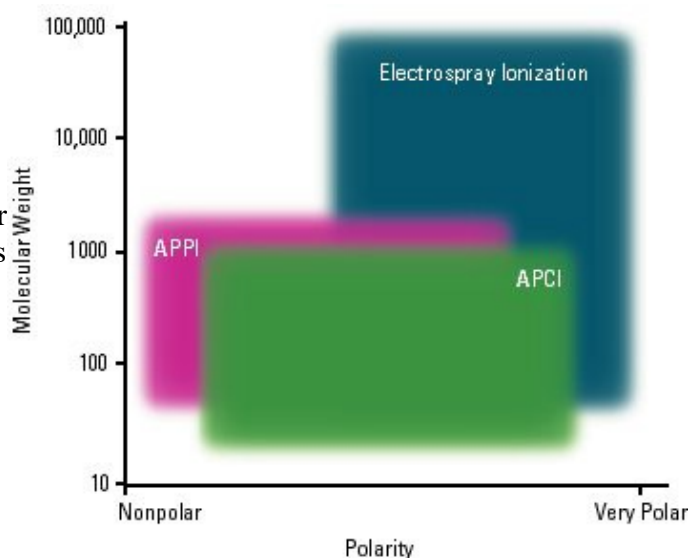
Le **bruit de fond** correspond au **glycérol** présent dans la **matrice** qui n'a pas été totalement éliminé.

#### 4 – Ionisation par nébulisation

Se décompose en **3 techniques complémentaires** :

1. **ESI** : Electronébulisation (Electrospray)
2. **APCI** : Ionisation chimique à pression atmosphérique (biomolécules)
3. **APPI** : Photo-ionisation à pression atmosphérique (photons, molécules inorganiques ou matériaux)

Ces différentes techniques sont utilisées par rapport à la nature de la molécule (poids moléculaire et polarité).

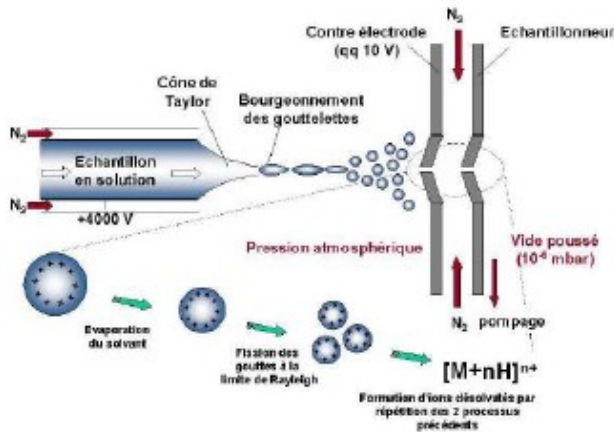


## Principe de base de l'électro spray (ESI) :

Une solution (molécules en phase liquide) est pulvérisée dans une chambre. Un courant de gaz sec ( $N_2$ ) évapore progressivement le solvant = **étape de désolvatation**.

Un potentiel de quelques kV est appliqué à la sortie du capillaire, ce qui permet de charger les gouttelettes.

Les gouttelettes chargées (de plus en plus petites) sont dirigées par un champ électrique vers l'analyseur.



**Débit d'analyse d'HPLC :  $500\mu L \cdot min^{-1}$  au maximum**

L'idéal c'est de diminuer ce débit.

→ plus le débit est faible, meilleur est le spray.

Molécules adaptées au couplage chromatographie liquide + spectrométrie de masse (HPLC/MS ou LC/MS)

On va donc faire des adduits. Cette association est fonction de la concentration de la molécule. On aura

donc le même type de spectre que pour le MALDI.

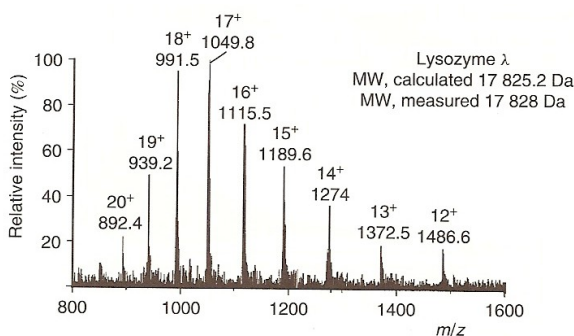
Pour que le transfert de charge fonctionne bien, le solvant d'HPLC doit contenir de 0,05 à 0,1 % d'acide (acide formique, TFA, acide acétique). Cela permet une meilleure séparation en affinant les billes de chromatographie mais aussi d'avoir un solvant chargé qui favorise les transferts de protons sur les gouttes. En fonction du type d'acide, on a  $\pm$  déprotonisation des molécules qui sont présentes.

*Quelle est la différence entre l'électro-spray et l'APPI ou l'APCI ?*

C'est exactement le même principe. La seule différence c'est que, supposons que le transfert de charge ne soit pas suffisamment important (pas assez de charge qui passe du solvant vers la molécule) parce que la molécule est difficile à ioniser, par exemple, un polymère de cellulose (ce n'est pas le cas des protéines). Donc pour **favoriser l'ionisation**, on a soit :

- un gaz réactif chimique (**méthane**) qui vient se mélanger au spray : **APCI**
- une lampe qui envoie des **photons** UV visible dans le spray : **APPI**

Mais du coup, on est limité sur la masse de la molécule à analyser.



*Spectre ESI du lysozyme  $\lambda$*

$$M + 17H^+ = (M + 17)^{17+}$$
$$1049,8 = (17825 + 17)/17$$

L'avantage d'avoir plusieurs pics, c'est que l'on peut calculer la masse de chaque pic puis faire la moyenne des pics pour avoir une masse moléculaire plus précise. La technique de l'électro-spray est très utile pour savoir si on a des protéines natives ou dénaturées.

Étant donné que l'on peut mettre, à peu près, une charge (proton) par acide aminé. On a donc :

- protéines natives : quelques charges
- protéines dénaturées : beaucoup de charges

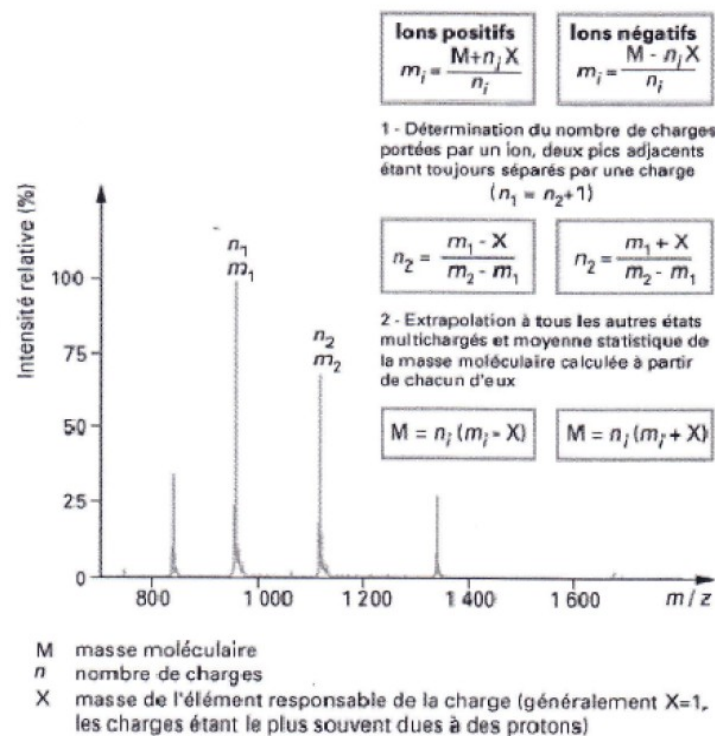
Du coup, au niveau du spectre :

- protéines natives : peu de pics avec des hautes valeurs de  $m/z$
- protéines dénaturées : beaucoup de pics avec des faibles valeurs de  $m/z$

Cela permet d'analyser et d'identifier si la protéine ou le polysaccharide ou autres biomolécules (ADN, ARN) est sous forme native ou pas ou encore associer.

=> outil **puissant pour connaître la structure 3D de la molécule.**

Calcul de la masse :



### Conclusion sur les sources d'ions :

Les « **ionisations dures** » génèrent souvent des ions moléculaires, à nombre impair d'électrons, qui se fragmentent beaucoup et parfois même totalement avant d'avoir eu le temps de sortir de la source. *Exemple* : EI

Les « **ionisations douces** » génèrent des ions moléculaires à nombre pair d'électrons, qui sont relativement stables et qui ont des durées de vie suffisantes pour traverser l'analyseur, arriver jusqu'au détecteur, et donc être mesurés. *Exemple* : PCI, MALDI, Electrospray.

Type d'ionisation	« dure »	« douce »
Masse moléculaire	Oui, peu ou pas	Oui
Fragmentation	Oui	Peu ou pas
Mesure quantitative	Oui	Oui

## Bilan

Ionisation	Méthodes d'ionisation
« très dure »	Plasma induit couplé (Induced Coupled Plasma : ICP-MS)
« dure »	Impact électronique (EI)
« assez douce »	Ionisation chimique (CI) Ionisation de champ (FI) Ionisation à pression atmosphérique (APPI) Désorption de champ (FD) Spectrométrie de masse d'ion secondaire (SIMS) Bombardement d'atomes rapides (FAB) Ionisation chimique directe (DCI) Désorption thermique (TD) Ionisation par thermos-spray (TSI)
« douce »	Désorption / ionisation laser (MALDI) Ionisation électrospray (ESI)

## IV – Analyseurs

Il existe **différents types d'analyseurs**. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais tous les analyseurs mesurent des valeurs  $m/z$ .

**B** : Déflexion par un champ magnétique (c'est l'analyseur le plus ancien)

**Q** : Déflexion par un champ quadripolaire (système que l'on rencontre le plus) : 3 000  $m/z$  en moyenne

**IT** : Confinement dans un piège à ions (Ion Trap) : 3 000  $m/z$  en moyenne

**TOF** : Mesure d'un temps de vol (Time Of Flight) : 300 000  $m/z$  en moyenne

**FT-ICR** : Résonance Cyclotronique d'Ions à Transformée de Fourier : domaine inorganique

**Orbitrappe** ... idem

Les ions formés dans la source sont dirigés (extraction et focalisation) vers l'analyseur par des champs électrostatiques qui peuvent être de **quelques volts (Q,IT, FT-ICR) ou de plusieurs dizaines de kilovolts (TOF, B)**. La vitesse de déplacement des ions dans l'analyseur dépend de l'intensité du champ d'extraction, de la charge et de la masse de l'ion.

Les **caractéristiques principales d'un analyseur** sont :\*

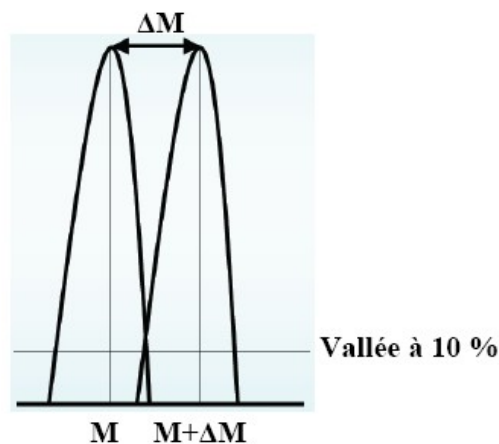
- La **résolution R** (haute résolution : 5 chiffres après la virgule ; basse résolution : 3 chiffres après la virgule → quadripôle)
- La **gamme m/z** qu'il peut analyser
- La **rapidité de balayage en m/z** : augmente la précision ± de bruit de fond
- La **sensibilité**
- La **vitesse avec laquelle les ions le traversent** : cas du piège à ion (à l'intérieur de la trappe à ion, la vitesse est = à 0, garder l'ion pour pouvoir le re fragmenter par la suite, piège par rapport au poids moléculaire)

Souvent, avec un même analyseur, on peut augmenter l'une de ces caractéristiques aux dépens des autres, mais seulement dans certaines limites. Chaque type d'analyseur a son « point fort ».

## 1 – La résolution R

La résolution mesure l'aptitude d'un analyseur à séparer 2 ions de masse aussi voisines que possible.

$$R = M / \Delta M$$



Analyseurs	Résolution	Gamme m/z
Quadripôle (Q)	2 000	8 000
Magnétique (EB)	20 000	20 000
Temps de vol (TOF)	20 000	500 000
Trappe ionique	5 000	6 000
Cyclotron à résonance des ions (FT-ICR)	100 000	4 000

- ➔ **Quadripôle & Trappe ions** : résolution assez précise à 3 chiffres après la virgule
- ➔ **Time Of Flight** : résolution précise jusqu'à 6 chiffres après la virgule
- ➔ **Cyclotron** : précis jusqu'à 12 chiffres après la virgule
- ➔ **Trappe ion** est la seule technique qui permet d'avoir l'enchaînement des acides aminés et la structure primaire de la molécule.

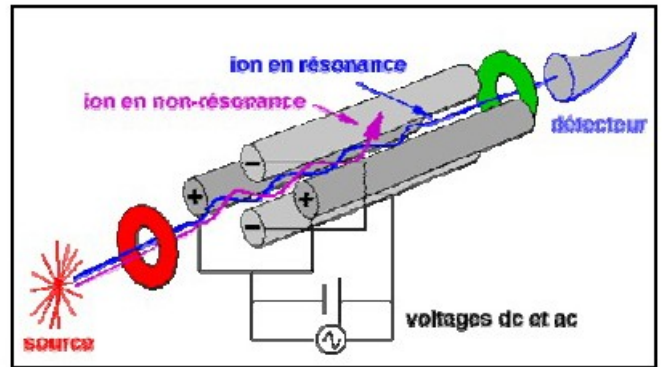
Très utile car plus on a de chiffre après la virgule, plus on aura de précision sur la formule brute des grosses molécules.

## 2 – Analyseur quadripolaire

*Ou octopôle (8 barres)*

4 barres métalliques parallèles (l= 5 à 20 cm) raccordées électriquement 2 à 2.

Sur les champs électriques, on surimpose une tension alternative.

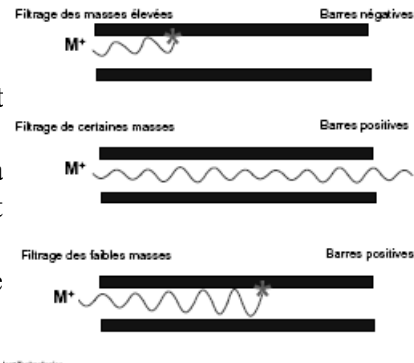


*Comment fonctionne un filtre de masse quadripolaire ?*

On veut faire passer les ions progressivement jusqu'à la sortie en jouant sur la charge de ces ions.

On fait avancer les ions en changeant la polarité des barres. L'ion est attiré par la charge inverse et repoussé par sa même charge.

Un courant électrique ou un gaz chargé passe au milieu (He ou N).



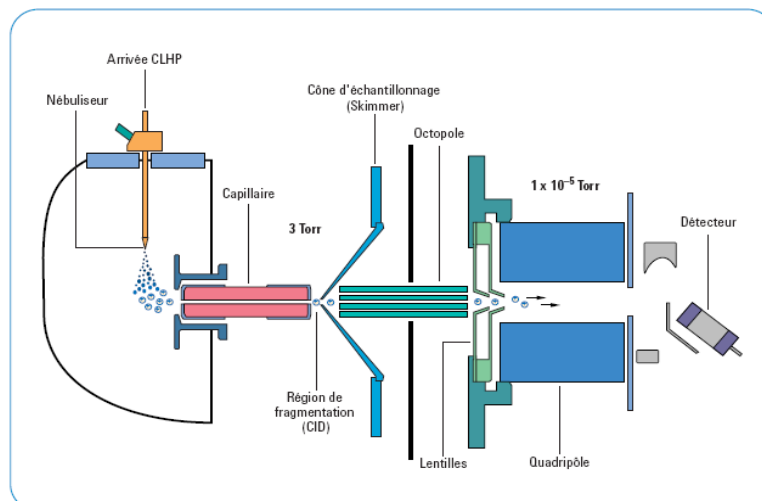
Sur ces barres électriques (courant électrique ou magnétique ou électromagnétique), alternance de courant avec des tension différentes. Chaque barre va changer (un coup + un coup - ; faible ou forte tension) et cela va avoir un impact sur les ions qui vont avancer et qui vont être  $\pm$  dirigé dans ce tube.

- La **séparation** se fait en fonction de la **masse** (variation de l'intensité du champ électrique) ou de la **charge**

Au début, on va faire sortir que les ions positif d'une masse identifier  $> 150$  (par ex). Puis, dans un deuxième temps, l'appareil fera sortir les ions  $> 250$ , etc ... c'est à dire que les ions vont sortir progressivement en fonction du réglage de l'appareil. Mais au final, tous les ions sortiront et seront détectés.

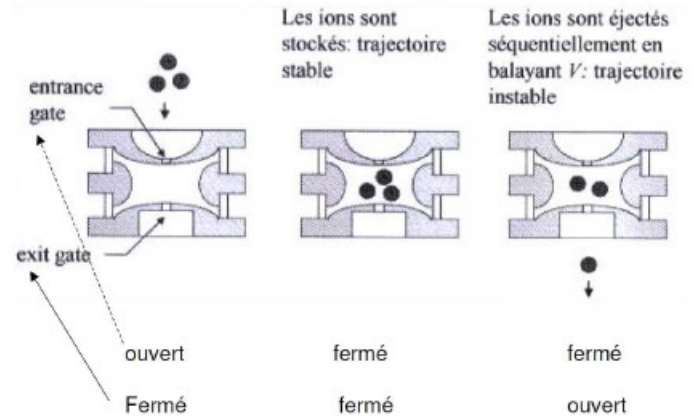
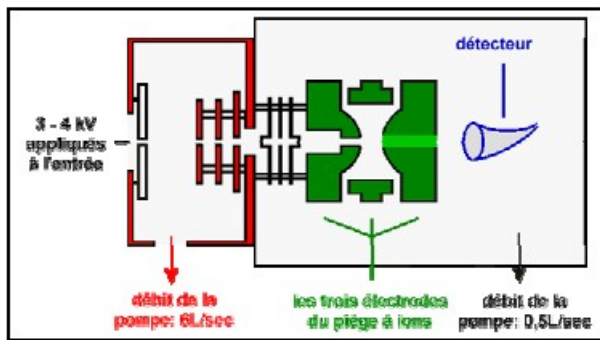
- Les **petites molécules chargées** sortent en **premier**
- Les **grosses molécules chargées** sortent en **deuxième**

*Système de Quadripôle*





### 3 – Système trappe à ion ou analyseur de piège à ions (ion trap)



Sur les 4 cotés de la trappe (sphère), on va avoir un courant électrique / magnétique / électro-magnétique.

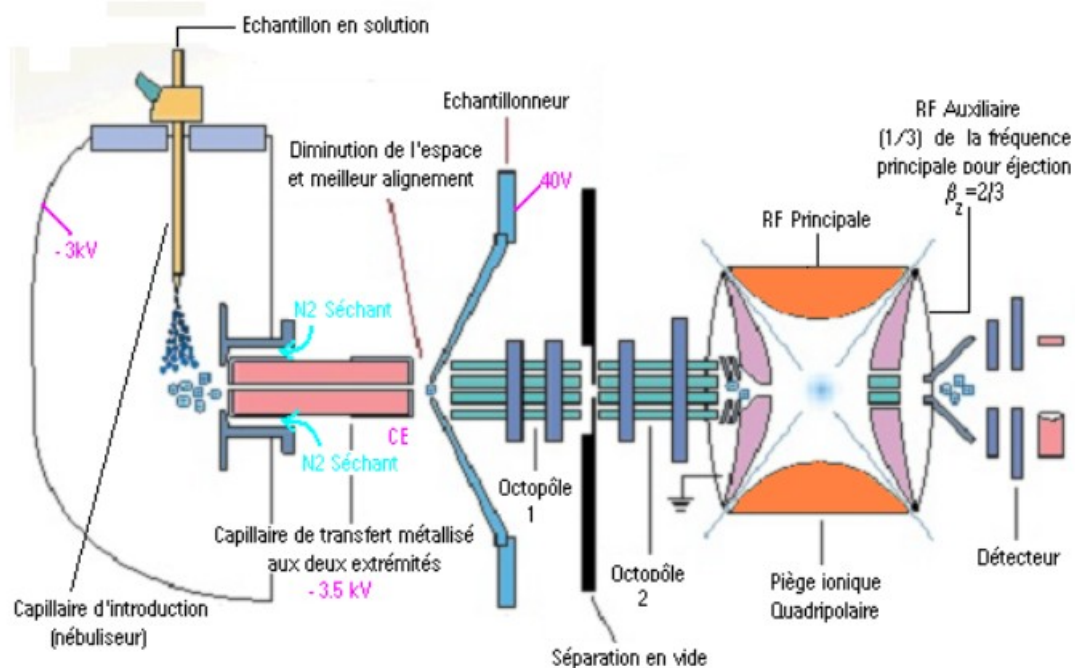
Lorsque l'on piège des ions, on décide lesquels on garde de ceux que l'on laisse partir. Donc, au final, on ne détecte que ce que l'on veut détecter.

Le piège est constitué de 3 électrodes (ou 4) entre lesquelles on applique une tension en radiofréquence pour maintenir l'ion dans la trappe et éviter, ainsi, les collisions avec les parois.

Un balayage de l'amplitude de la radiofréquence entraîne l'expulsion des ions piégés vers le détecteur les uns après les autres

L'intensité et la charge du champ électrique permettent la séparation. Cette technique est très utile pour les grosses molécules comme les protéines.

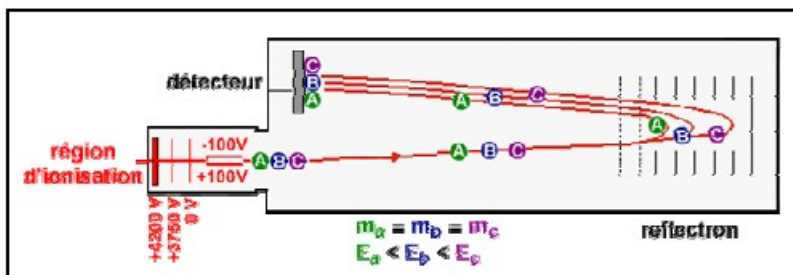
#### Système de couplage Quadripôle + trappe ions



#### 4 – Time of Flight (TOF)

Les ions de rapport  $m/z$  différents se déplacent à des vitesses différentes (acquises dans la phase d'accélération).

Le tube de vol est libre de tout champ (juste un champ électrique). Les ions de rapport  $m/z$  le plus petit parviendront au détecteur les premiers.



Il est associé au MALDI, à l'IE, au FAB, à l'ESI (électro-spray) ou au PCI et aussi à la chromatographie phase gaz.

Les ions entrent dans le TOF, ils sont attirés  $\pm$  par une plaque chargée au fond du TOF, puis quand ils sont très proche de cette plaque, la polarité est inversée. Les ions vont alors vers le détecteur.

Leur temps de vol dépend de cette attraction à la plaque. Plus ils sont attirés, plus ils mettront de temps à être détecté (leur chemin sera plus long). Et inversement. De même, plus l'ion est petit, plus vite il sera détecté. Plus l'ion est gros, moins vite il sera détecté.

- La séparation se fait en fonction de la **masse**.

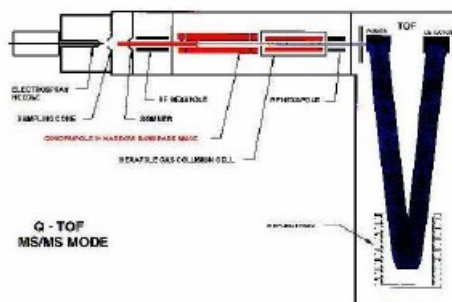
#### 5 – Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Permet de sélectionner un ion par une 1<sup>ère</sup> spectrométrie de masse (MS1), le fragmenter, effectuer une 2<sup>ème</sup> spectrométrie (MS2) de masse sur les fragments ainsi généré.

Elle peut être réalisée à l'aide de nombreux appareils combinant des secteurs magnétiques, électriques, quadripolaire ou des temps de vol, mais également, au sein d'un même analyseur sans le cas d'une trappe d'ions.

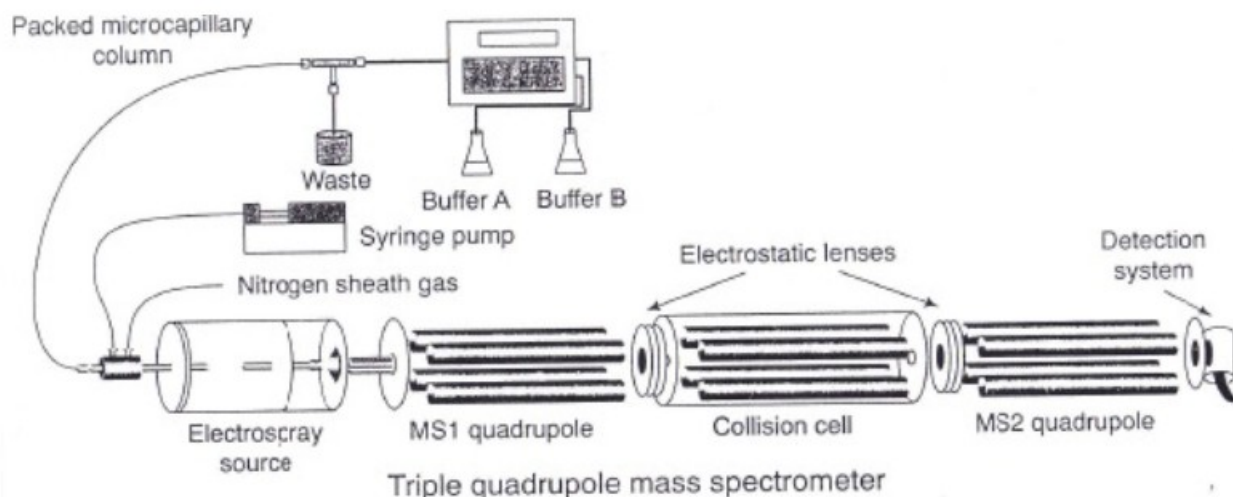
Association de plusieurs analyseurs :

- Triple quadripôle = 3 quadripôles en série
- TOF-TOF = 2 TOF en série
- TOF-Quadripôle = 2 systèmes en série
- MS<sup>n</sup> (trappe d'ions) = spectrométrie de masse en tandem



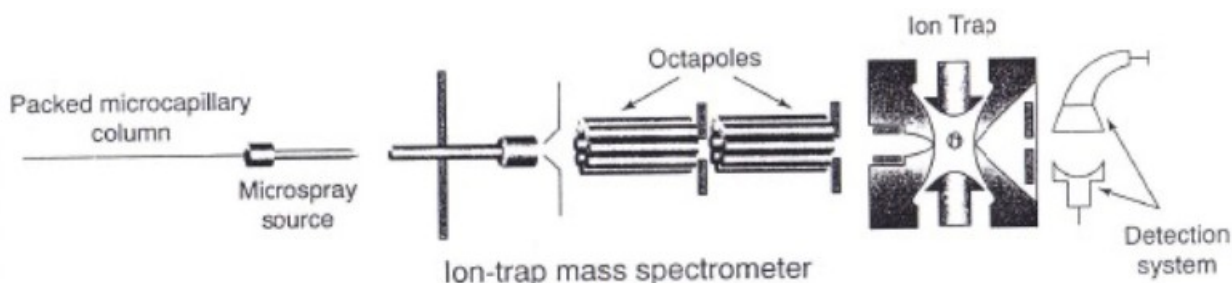
Pour un Triple quadripôle, pour un TOF-TOF et pour un TOF-Quadripolaire, on pourra avoir concrètement, MS1 pour un 1<sup>er</sup> spectre de masse et MS2 pour un 2<sup>ème</sup> spectre de masse pour la même molécule.

Avec la trappe d'ion, on peut faire n spectre de masse → indispensable pour identifier la structure primaire des molécules et surtout de **grosses molécules** comme les protéines.



1. Le 1<sup>er</sup> quadripôle nous donne un 1<sup>er</sup> spectre de masse (MS1).
2. Le quadripôle 2 est appelé « cellule de collision » : Tous les ions qui sortent séparés du 1<sup>er</sup> spectre et lorsqu'ils rentrent dans le 2<sup>ème</sup> quadripôle, ils vont être bombardés par un gaz d'He ou d'Ar. Ce gaz va agir sur les fragments créés dans le 1<sup>er</sup> quadripôle pour refragmenter les molécules et les fragments. Il va y avoir une création d'ions fils.
3. Le 3<sup>ème</sup> quadripôle sert à séparer les fragments qui ont été créés dans la cellule de collision (ou 2<sup>ème</sup> quadripôle) et créer autant de spectre de masse que de fragment (MS2).

➤ La [Ar] influe la fragmentation : plus la [c] est élevée, plus on aura des fragments



## V – Les détecteurs

Le détecteur fournit des **signaux électriques** qui sont enregistrés sous la forme de **spectre de masse** par le logiciel d'acquisition de l'ordinateur qui pilote l'appareil.

Il existe différents détecteurs :

- Cylindre de Faraday
- Multiplicateur d'électrons secondaires
- Multiplicateur magnétiques
- Channeltron
- Galette de microcanaux

## VI – En résumé

**Action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée**  
➔ formation initiale d'ions, à l'état gazeux, à partir de l'échantillon

1. Faible quantité d'échantillon M introduit dans une enceinte à vide poussé ( $10^{-5}$  Pa)  
→ volatilisation puis ionisation et fragmentation
2. Accélération des ions formés sous l'action d'un champ électrique qui accroît leur énergie cinétique
3. Séparation des ions en fonction de leur rapport  $m/z$  (sauf pour le TOF : seulement par la masse) en étudiant leurs trajectoires dans des champs électriques et magnétiques
4. Détection des ions en sortie du spectromètre de masse par un détecteur sensible aux charges électriques
5. Traitement du signal pour obtenir un spectre de masse → spectre des abondances relatives

## VII – Interprétation de spectre de masse

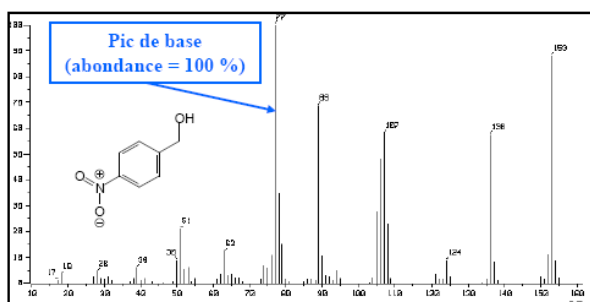
### 1 – Identification des pics spécifiques correspondant au bruit de fond

Le spectre est composé de pics caractéristiques du fond :

- Pics des gaz ionisants  
( $O_2$   $m/z = 32$ ,  $N_2$   $m/z = 28$ , Ar  $m/z = 40$ , ... )
- Pics des composés libérés par la phase stationnaire d'une colonne GC  
(dérivés silylés  $m/z = 207, 281$ ...)
- Pics des impuretés du solvant pour la LC-MS
- Pics de la matrice (en FAB et MALDI)

### 2 – Recherche du pic le plus intense

**Pic de base (100%) :** formation du fragment le plus probable donc le plus facile à former lors de l'ionisation de la molécule.



L'identification de ce pic est **très important** !

Spectre de masse (EI) de l'alcool p-nitrobenzylique  
(MM = 153)

### 3 – Identification du pic moléculaire

Le pic moléculaire ou pic apparenté est généralement le plus lourd ou presque le plus lourd si le spectre présente des satellites isotopiques ( $M+1$ ,  $M+2 \rightarrow$  petits pics à droite du spectre) et / ou des adduits ( $2M$ ,  $3M$ ).

Il peut être de faible intensité (voire absent) si la molécule est fragile (surtout en EI).

- ➔ **Intensité très faible** si la molécule a de nombreuses **ramifications**
- ➔ **Intensité forte** si la molécule a de nombreuses **insaturations** (double ou triple liaisons)

Avec des techniques d'ionisation tels que le FAB, le MALDI, l'API, ... peuvent apparaître des pics correspondant à des dimères ( $2M$ ) ou trimère ( $3M$ ) voire des adduits de  $M$  avec des ions présents. *Exemple* :  $M+Na$  c'est le sodium qui permet de ioniser les polysaccharides et d'identifier un sucre en mode positif.

**Le pic moléculaire à rechercher diffère selon la technique d'ionisation !**

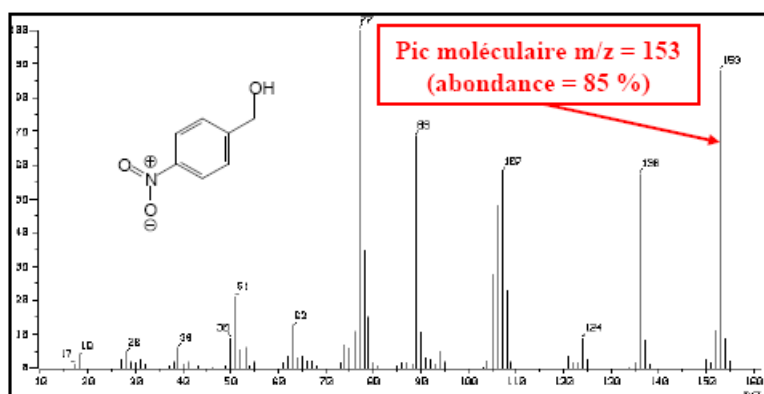
**Si on est en PCI : on cherche un adduit  $(M+H)^+$  ou  $M$ +gaz vecteur**

**Si on est en EI : on cherche un cation radical  $M^{+\bullet}$**

\* En impact électronique (EI) :

Le pic moléculaire est un **radical-cation** provenant de l'arrachement d'un électron à la molécule neutre  $M^{\bullet+}$

$M^{+\bullet}$  : la molécule entière (après perte d'un électron) est chargée positivement (+) et comporte un électron non apparié (•).

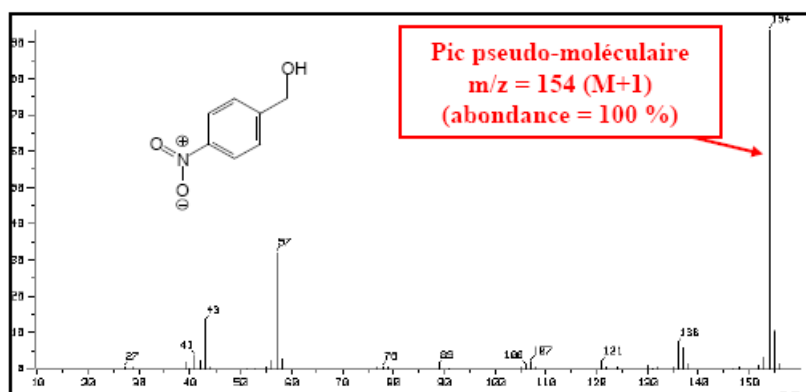


*Spectre de masse (EI) de l'alcool p-nitrobenzylique  
(MM = 153)*

\* En ionisation chimique (CI) :

Il y a apparition d'ions pseudo-moléculaires suite à :

- l'ajout d'un proton sur  $M \rightarrow (M+H)^+$  de masse ( $M+1$ ) en mode positif
- la perte d'un proton sur  $M \rightarrow (M-H)^+$  de masse ( $M-1$ ) en mode négatif



*Spectre de masse (CI) de l'alcool p-nitrobenzylique (MM = 153)*

#### 4 – Utilisation des massifs isotopiques (moyenne ou haute résolution)

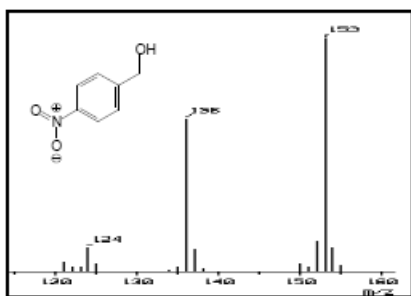
Les isotopes naturels générant des pics de masse proche à M+1 ou M+2 d'abondance caractéristique de la composition des fragments principaux et de la composition en atomes de la molécule).

On porte à 100 % l'abondance d'un pic de masse M et on normalise les pics de masse M+1 et M+2 par rapport à l'intensité de M\*.

Dans le cas du pic moléculaire, on peut obtenir de cette façon la formule brute de la molécule recherchée.

\*L'intensité réelle du pic moléculaire lors de l'interprétation du spectre de masse est de 85 %. Lorsque l'on va vouloir analyser l'**abondance isotopique**, on va dire que ce 85 % c'est 100 %. On va le normaliser.

$$(7 \times 100) / 85 = 8,2$$



m/z		Abondance (%)	
M	153	85	100
M+1	154	7,0	8,2
M+2	155	0,8	0,9

*Spectre de masse (EI) de l'alcool p-nitrobenzylique (MM = 153)*

Grâce à l'intensité de l'abondance isotopique du M+1, M+2, M+3, ... on va pouvoir connaître la formule brute de la molécule.

Plus on sera en haute résolution et plus on aura des valeurs très précises, après la virgule, de la masse de la molécule et, par conséquent, on aura plus de chance d'avoir la bonne formule développée.

## Formules de Mac Lafferty

Cas d'une molécule composé de C, H, O, N, ...

Elément	Symbole	Z	A	Ab (%)	A	Ab (%)	A	Ab (%)
Hydrogène	H	1	1	99,985	2	0,015		
Carbone	C	6	12	98,90	13	1,10		
Azote	N	7	14	99,634	15	0,366		
Oxygène	O	8	16	99,762	17	0,038	18	0,200

Calcul approché du nombre de C, H, O et N



$$\frac{Ab(M+1)}{Ab(M)} = (1,1.n_C)\% + (0,015.n_H)\% + (0,038.n_O)\% + (0,366.n_N)\%$$

**La présence d'atomes de F, Cl, Br, I, P ne change rien puisqu'ils n'ont pas d'isotope de masse M+1.**

Calcul approché du nombre de C et N



Si la masse moléculaire (MM) est paire, alors  $n_N = 0 ; 2 ; 4 \dots$

Si la masse moléculaire (MM) est impaire, alors  $n_N = 1 ; 3 ; 5 \dots$

$$\frac{Ab(M+1)}{Ab(M)} = (1,1.n_C)\% + (0,366.n_N)\%$$

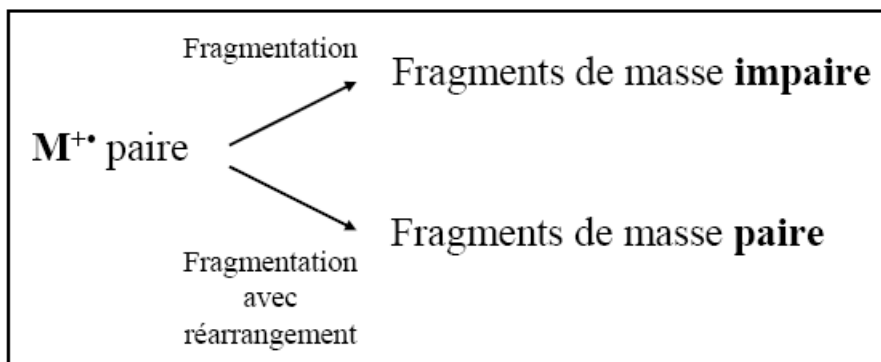
Calcul approché du nombre d'oxygène (O)

$$\frac{Ab(M+2)}{Ab(M)} = (0,2.n_O)\% + (1,1.n_C)^2/200$$

## Utilisation des massifs isotopiques



La masse molaire d'une molécule organique qui contient C, H, O, N, Si, I, S, F, Cl, Br ... est **toujours paire** (ion moléculaire pair) **sauf** si elle contient un **nombre impair d'atomes N**.



Cas d'une molécule composé de C, H, O, N ...

m/z		Abondance (%)	
M	153	85	100
M+1	154	7,0	8,3
M+2	155	0,8	0,9

*alcool p-nitrobenzylique (MM = 153) → C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>*

Toujours se demander dans quelle technique d'ionisation on se trouve.

- Si on est en EI, la masse est égale au M soit 153.
- Si on est en PCI, la masse M aurait été égale à 152 soit (M+H)<sup>+</sup>.


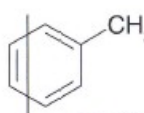
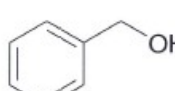
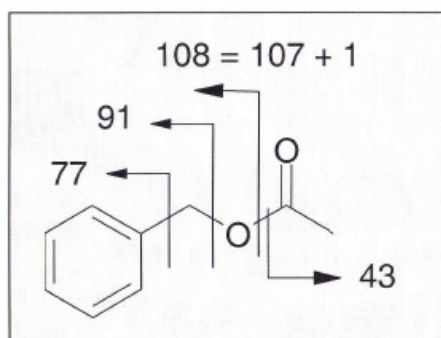
Ici, on est en EI, donc la masse est impaire donc le nombre d'N est impair.

$$\frac{Ab(154)}{Ab(153)} = 8,3 \approx (7 \times 1,1) + (7 \times 0,015) + (1 \times 0,366) + (3 \times 0,038) = 8,29$$

$$\frac{Ab(155)}{Ab(153)} = 0,9 \approx (3 \times 0,2) + (7 \times 1,1)^2/200 = 0,90$$



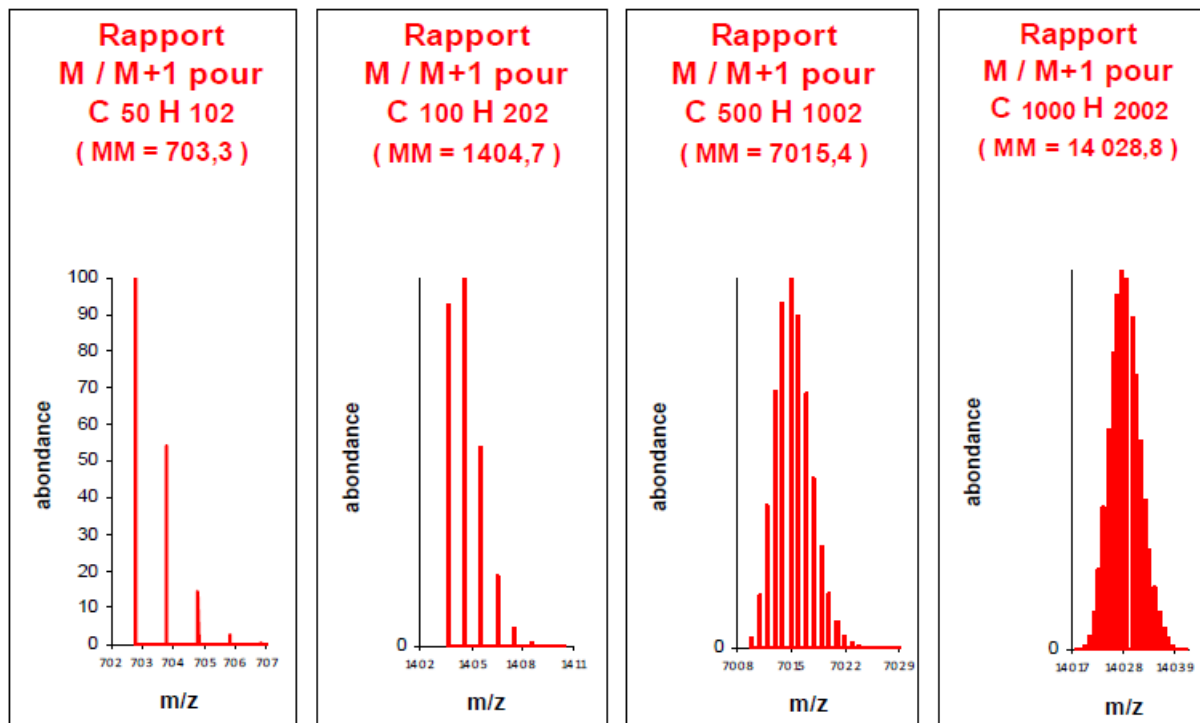
**Utilisation des massifs isotopiques  
pour la détermination de la formule brute de la molécule.**

		M	
			$M + 1 (\%) = 1.1 \text{ nb C} + 0.36 \text{ nb N}$ $M + 2 (\%) = (1.1 \text{ nb C})^2 / 200 + 0.2 \text{ nb O}$
m / z	%		
43	<b>73</b>		$M + 1 (\%) = 1.1 \text{ nb C} + 0.36 \text{ nb N}$ $M + 2 (\%) = (1.1 \text{ nb C})^2 / 200 + 0.2 \text{ nb O}$  $150 : M (\%) = 100 \%$ $151 : M + 1 (\%) = 9.9 \%$ $152 : M + 2 (\%) = 0.9 \%$  <div style="text-align: center;">↓</div> $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$ PM 150
52	23		
65	18		
77	22		
91	<b>71</b>		
107	20		
108	<b>100</b>		
150	28.7		
151	2.84		
152	0.26	108 = 107 + 1	

Plus le poids de la molécule est élevée, plus il y a de possibilité de formule brute.

Autre exemple : *Allure du massif isotopique de molécules contenant un nombre croissant d'atomes de carbone.*

Si le nombre de carbone augmente, la probabilité de trouver plusieurs  $^{13}\text{C}$  dans une même molécule augmente → le nombre de satellites isotopiques augmente aussi.



- **Molécules à 50 C** : à côté du M+1, apparition de satellites M+2, M+3, ... non négligeables
- **Molécules à 1 000 C** : la valeur de masse moyenne (MM) s'éloigne de celle de M – Distribution gaussienne des satellites – Le plus abondant a une masse proche de la masse moyenne.

#### Cas particulier d'une molécule composé de Cl et/ou Br

La présence de  $^{35}\text{Cl}$  et de  $^{37}\text{Cl}$  ou de  $^{79}\text{Br}$  et de  $^{81}\text{Br}$  (éléments ayant 2 isotopes abondants) produit dans le spectre de masse des amas isotopiques caractéristiques.

Isotope	Abondance (%)
$^{35}\text{Cl}$	75,77
$^{37}\text{Cl}$	24,23
$^{79}\text{Br}$	50,69
$^{81}\text{Br}$	49,31

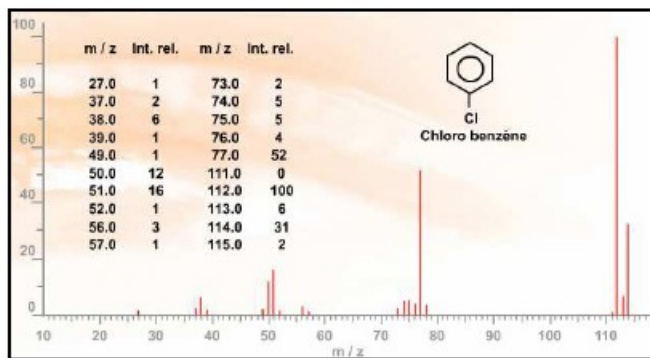
(M/M+2) = 3/1

(M/M+2) = 1/1

Les massifs de pics caractéristiques ont des valeurs de m/z séparées de 2 unités.

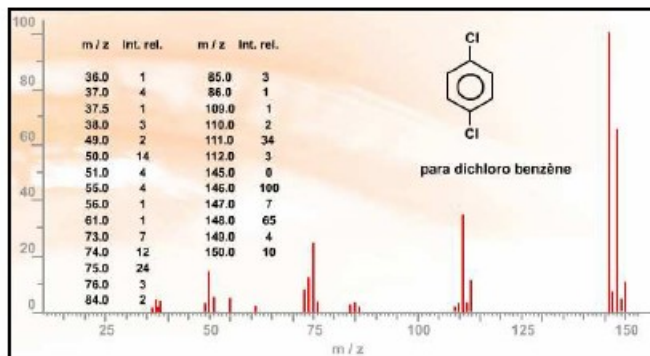
→ Lorsque l'on sera en présence d'un Br ou d'un Cl, le M+2 sera plus grand que le M+1.

## Cas d'une molécule composé de Cl



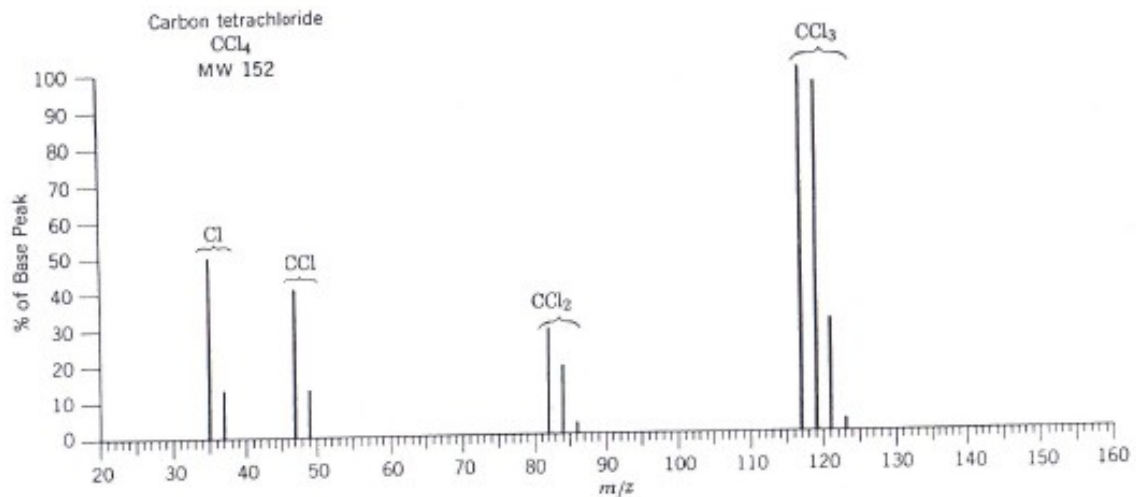
1 Chlore :  $(0,75 + 0,25)^1$

Isotope	Abondance (%)	
P	75	100
P+2	25	33

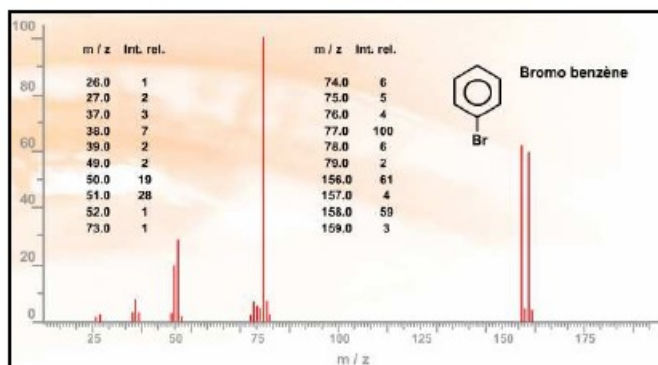


2 Chlore :  $(0,75 + 0,25)^2$

Isotope	Abondance (%)	
P	$75^2$	100
P+2	$2 \times 25 \times 75$	66,7
P+4	$25^2$	11,1

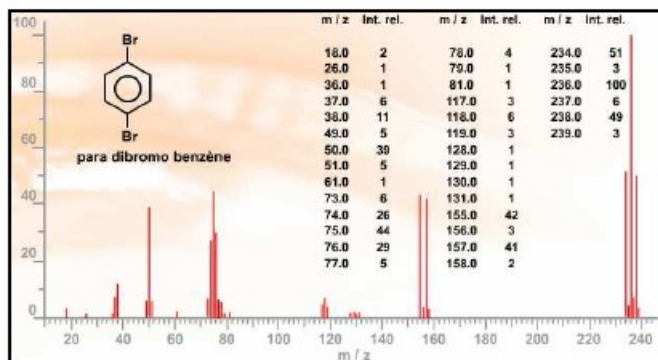


## Cas d'une molécule composé de Br



1 Brome :  $(0,5 + 0,5)^1$

Isotope	Abondance (%)	
P	50	100
P+2	50	100



2 Brome :  $(0,5 + 0,5)^2$

Isotope	Abondance (%)	
P	$50^2$	50
P+2	$2 \times 50 \times 50$	100
P+4	$50^2$	50

## 5 – Calcul de l'indice de saturation

Si on considère une molécule composée de :

- X atomes tétravalents (C, Si)
- Y atomes trivalents (N, P)
- Z atomes monovalents (H, Cl, Br, F, I, ...)

Le nombre d'insaturation (NI) de cette molécule s'écrit :

- Double liaison → 1 insaturation
- Triple liaison → 2 insaturations
- Noyau aromatique → 4 insaturations
- ...

$$NI = \frac{2X + 2 - Z + Y}{2}$$

## 6 – « Règles » de fragmentation

Il existe des « règles de fragmentation » qui permettent d'identifier une substance inconnue à partir de l'étude de sa fragmentation.

1. C'est l'ion dont le neutre (ou radical) a le plus bas potentiel d'ionisation qui se forme préférentiellement.

En EI, on a  $M^{+}$  :

→ la charge + : va aller dans la zone la plus riche en électrons

→ le • (électron) : va aller du côté de la molécule qui a la capacité à capter le moins la charge + = coté qui a le plus bas potentiel d'ionisation = la molécule va devenir neutre

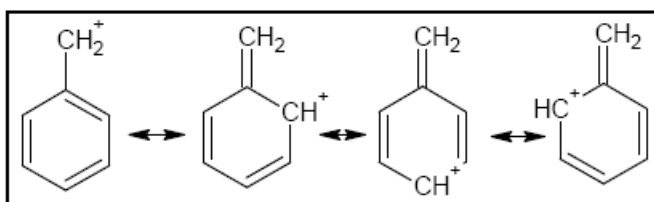
2. Plus l'énergie de liaison est faible, plus la fragmentation est rapide.

→ liaisons simples : fragmentation rapide

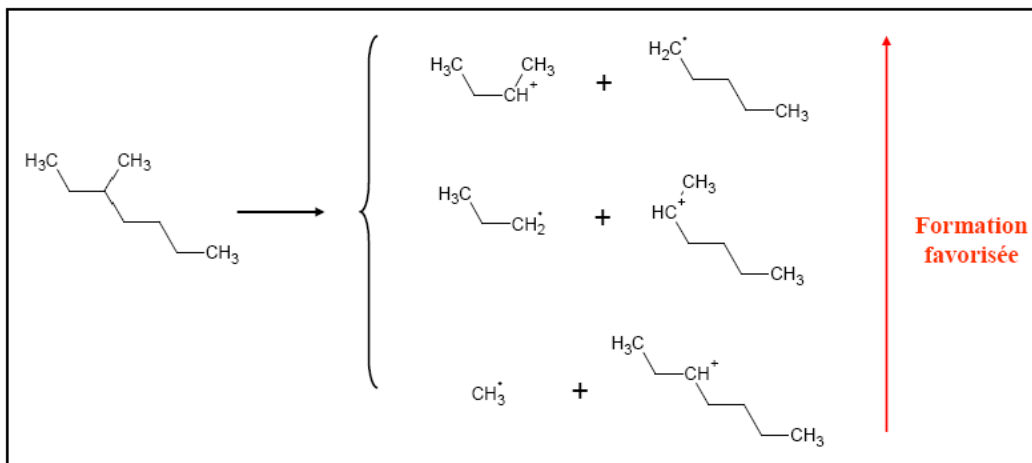
→ liaisons doubles ou triples : fragmentation lente

3. Il y a stabilisation de l'ion formé par résonance.

→ dans le cas d'insaturations



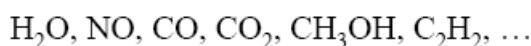
4. La perte des neutres (ou radicaux) les plus gros est favorisée.



5. La perte d'une molécule neutre (ou radical) est favorisée sur le plan thermodynamique.

M-18 = perte d'un  $H_2O$  par la présence d'un OH

→ permet d'identifier la présence de fonction OH dans une molécule



6. La formation de liaisons nouvelles est favorisée sur le plan thermodynamique (réarrangements)

Il existe 2 types de clivage :



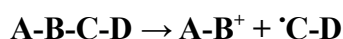
Clivage homolytique  
(rétention de charge)



Clivage hétérolytique  
(migration de charge)

B plus électronégatif que A

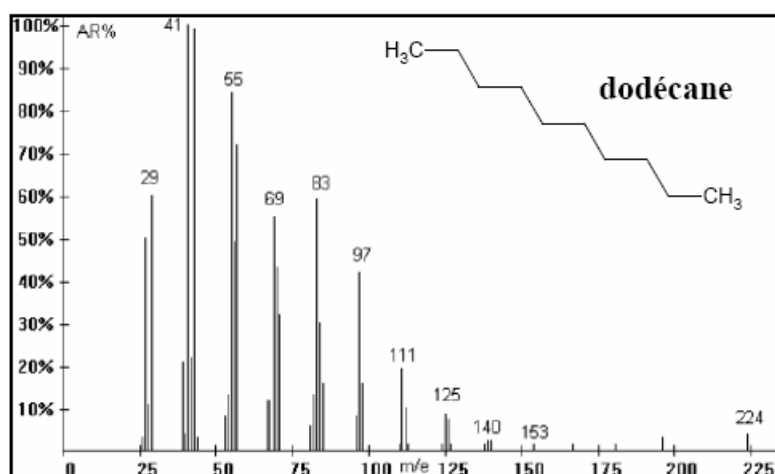
Fragmentation avec une rupture de liaison  $\sigma$



Exemple : alcanes

Les pics sont séparés  
par  $\Delta m = 14$

Perte de  $CH_2$  (toutes les liaisons  
sont équivalentes)



→ Exemple d'AG ou d'hydrocarbure : grand fragment qui va se re fragmenter en série, jusqu'à trouver une taille qui fait qu'il va avoir tendance à se stabiliser par effet de résonance.

Les fragments les plus stables sont les C3 / C4 (avec une préférence pour le C3) : intensité majeure des pics.

Inversement, le C6 n'est pas très stable et va avoir tendance à se couper et à former un C5. Le C5 n'est pas forcément plus stable, il va donc se fragmenter et donner un C4. Le C4 commence à se stabiliser mais il va encore se fragmenter pour donner un C3. Le C3 va rester car il est stable.

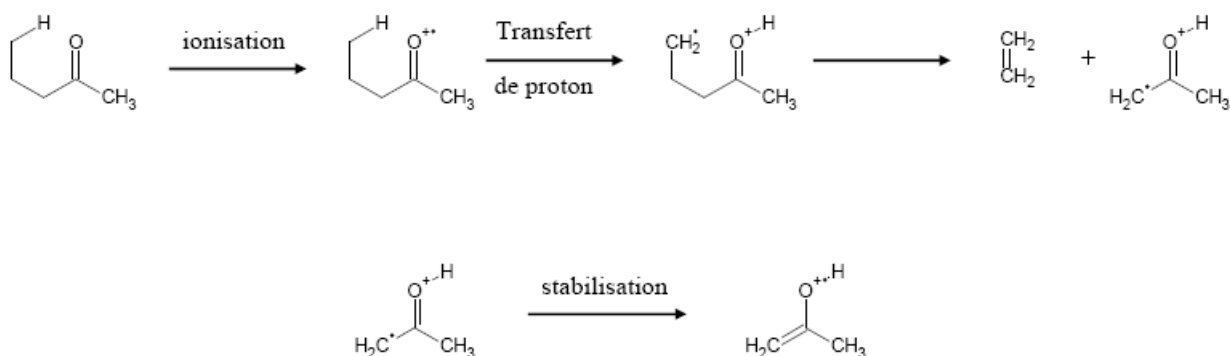
Donc ça donne (en terme d'intensité « > ») :

$C3 > C2$  et  $C5$  ;  $C5 > C6$  ;  $C6 \pm > C7$  ;  $C7 \pm > C8$  etc ...

## Réarrangement de Mac Lafferty\*

Transfert d'hydrogène à travers un cycle à 6 carbones que lorsque l'on a **un carbonyle**.

➔ **Toujours des fragments de forte intensité**



### Conditions pour avoir un Mac Lafferty :

- ✓ présence d'un carbonyle
- ✓ avoir un carbone  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$   
→ **peut également s'observer chez les esters ou les amides**  
(N ou O remplace le carbone  $\alpha$ )
- ✓ avoir un H sur le carbone  $\gamma$  (qui pourra être transféré)

### Mécanisme :

1. Ionisation de la molécule par EI (par exemple) : formation d'un cation radical  $M^{+\bullet}$  (de préférence sur le carbonyle ou pas)
2. Réarrangement ou transfert de proton : le proton va passer du carbone  $\gamma$  au carbonyle
3. L'électron prend la place du proton
4. Fragmentation entre le carbone  $\alpha$  et le carbone  $\beta$

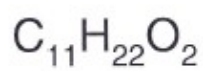
### Remarque sur les planches :

→ lorsque l'on voit un carbonyle avec un  $+\text{H}$ , c'est très souvent un réarrangement de Mac Lafferty  
Exemples : Fragments 44, 58, 59, 74, 86, 88, 100, 102, 149?

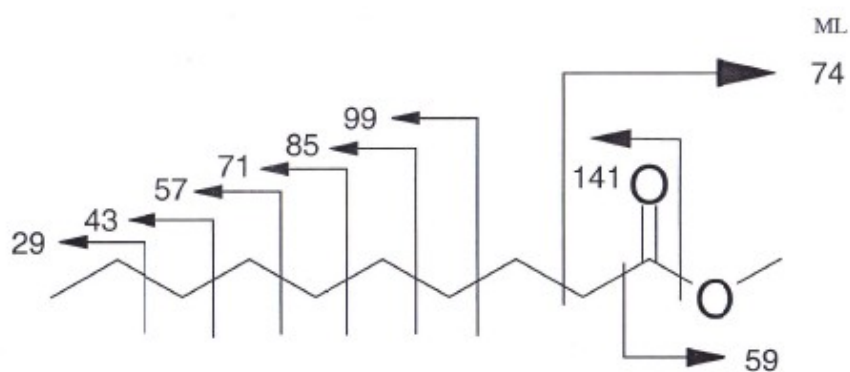
### Avantage de savoir s'il y a un fragment de Mac Lafferty ou non :

→ connaître le nombre de carbonyle présent dans la molécule et savoir où ils sont placés

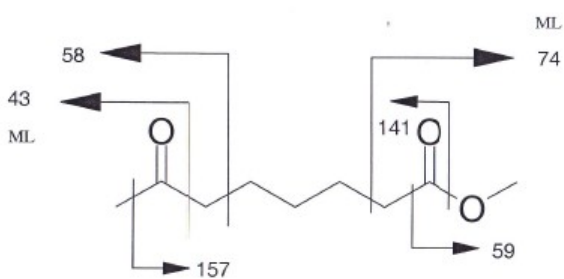
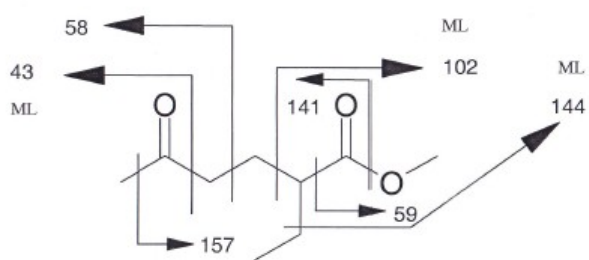
→ très utile pour l'analyse des **lipides** et des **peptides**



PM 186



PM 172





## VI – Analyse des biomolécules

### 1 - Polysaccharides

= sucres de haut poids moléculaires

Ce sont les molécules les plus complexes à analyser (MS ou RMN), par rapport aux protéines, aux lipides ou aux acides nucléiques.

Le poids moléculaire va être intéressant pour connaître la taille de la molécule mais surtout d'avoir une indication sur le **nombre d'ose**, mais si le plus souvent, on a à faire à des hexoses (sucres à 6 carbones).

→ PM du glucose :  $180 \text{ g.mol}^{-1}$

→ Liaison osidique entre chaque ose :  $-18 (-\text{H}_2\text{O})$

Pour chercher le **PM** d'un polysaccharide, on utilisera la technique **FAB** ou bien **MALDI**.

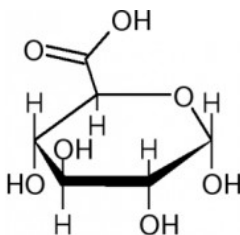
Symbolique des oses dans la littérature (liste non exhaustive) :

- : galactose
- : glucosamide-N-acétylé
- : mannose
- Δ : fructose

Il est intéressant de connaître la composition osidique du polysaccharide. Ainsi, on pourra savoir si on a des :

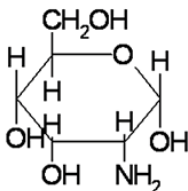
- oses **neutres** (glucose, galactose, ... )
- oses **acides** (= uroniques) : sucres avec une fonction acide  $\text{COOH}$  sur le carbone 6

*Ex : glucuronique*



- oses **aminés**

*Ex : glucosamine*



- oses **sulfatés** : SH sur le carbone 6 ou sur le carbone 2 et 3 pour les héparines

→ fucose :  $\text{CH}_3$  à la place du carbone 6 sur un glucose

Pour savoir si on a à faire à des sucres neutres, acides, aminés ou sulfatés, on fait des dosages par des réactifs chimiques qui vont colorer et réagir spécifiquement avec les différents sucres. On va obtenir un % massique du type de sucres présent dans le polysaccharide.

*Exemple : le polysaccharide est composé de 10 % en masse de sulfate. Ce qui signifie que sur 100g de polysaccharide, on a 10g de sulfate.*

Il est intéressant de savoir si notre polysaccharide a une extrémité réductrice (-OH libre) ou non.

**Rq :** Pour le cas du glucose. Dans de l'eau, le glucose est à 50/50 sous forme  $\alpha$  et  $\beta$ . Il est en équilibre avec la forme ouverte (Fischer) et la forme fermée (furane).

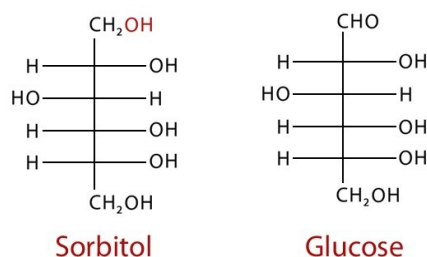
-CHOH : fonction aldéhyde : pouvoir réducteur

→ c'est pour cela que l'on appelle ces sucres des **aldoses**.

→ un aldéhyde est une fonction oxydée qui peut être réduite.

→ si on réduit un aldéhyde (-CHO), on obtient un alcool (-CH<sub>2</sub>OH)

La réduction du glucose donne du sorbitol, la réduction du mannose donne du mannitol, etc ...



La forme Fischer permet d'avoir un équilibre entre la forme  $\alpha$  et  $\beta$ . La vitesse de basculement entre les 2 formes est en fonction de la T°, du pouvoir rotatoire et du pouvoir réducteur.

Une fois que l'on connaît la composition osidique, il est aussi important de savoir si c'est un sucre linéaire ou un sucre ramifié. Cela pourra être déterminé par une analyse en spectrométrie de masse.

Il est important de savoir qu'elle sera la **régiosélectivité** de la liaison. Par exemple :

- 1 → 4
- 1 → 6
- 1 → 3
- 1 → 2
- 1 → 1 sur les disaccharides

Différence entre l'amylose et la cellulose (polymère de glucose en liaison 1 → 4 tous les deux) :

→ amylose :  $\alpha 1 \rightarrow 4$

→ cellulose :  $\beta 1 \rightarrow 4$

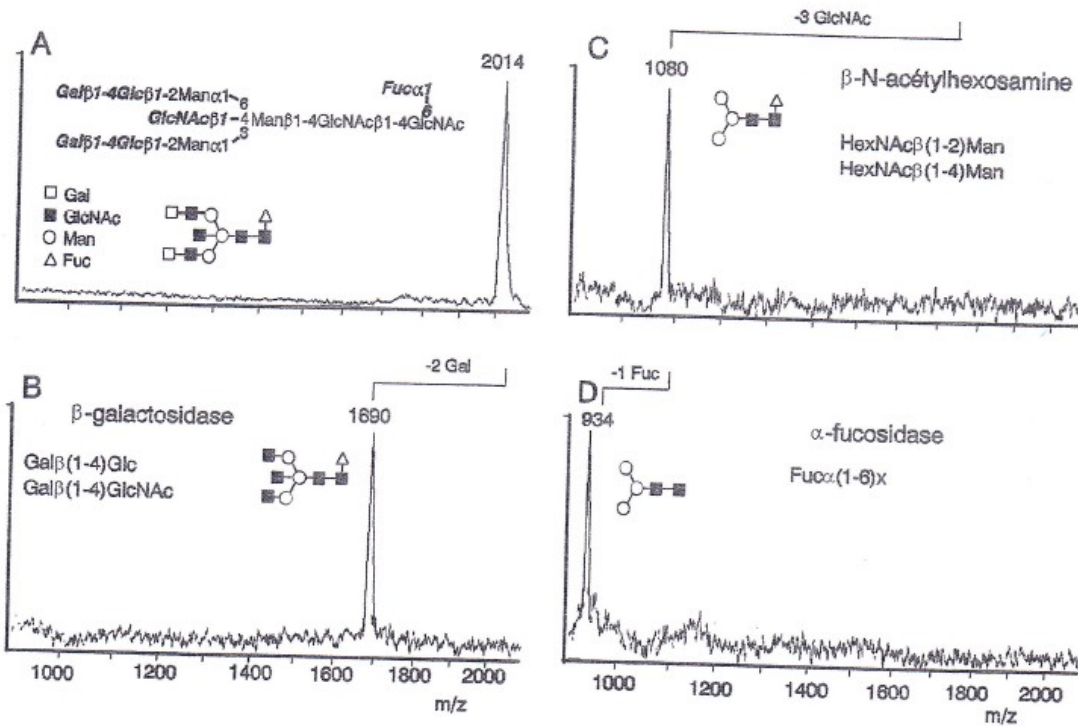
Pour savoir si on est en **configuration  $\alpha$  ou  $\beta$**  (on parle de **stéréosélectivité**), on devra utiliser une enzyme spécifique, comme par exemple, pour identifier une liaison  $\beta$  pour un galactose, on appliquera une  $\beta$ -galactosidase. Si ça coupe, on est en présence d'une liaison  $\beta$ , sinon, on est en présence d'une liaison  $\alpha$ .

Pour finir, il faut déterminer l'ordre de l'enchaînement des sucres ou déterminer la **structure primaire** de ces sucres.

Pour récapituler, par **spectrométrie de masse**, on obtient :

- ✓ le **PM**,
- ✓ la **structure primaire**,
- ✓ éventuellement la **composition osidique**,
- ✓ des **dosages physico-chimiques**,
- ✓ la **régiosélectivité**,
- ✓ la **stéréosélectivité**.

## Les actions des enzymes



**Figure 7.52 :** Spectre MALDI des digestats enzymatiques successifs d'un oligosaccharide natif. Les informations structurales obtenues grâce à la spécificité des exoglycosidases utilisées sont indiquées en italique au niveau de la structure détaillée. Reproduit (modifié) de la référence 224, avec permission.

Ce schéma sert à montrer la capacité des enzymes à nous donner des informations sur le type de liaisons, notamment, la **stéréosélectivité**. Résolution en Quadripôle (2 000) ou Trap ion (5 000).

**A]** 1 pic de masse à 2 014 Da : masse du polysaccharide entier

→ précision de mesure pas très bonne car pas d'adduit

**B]** Enzyme qui reconnaît le galactose relié en configuration β

→ 2014 – 1690 = 324 donc 2 galactoses (1 galactose = 162 Da)

**C]** Action d'une hydrolase qui reconnaît les hexoses aminés spécifiquement ceux qui sont en β-N-acétyl

→ 1680 – 1080 = 600 donc 3 GlcNAc (1 GlcNAc = 200 Da)

**D]** Ajout d'une enzyme qui reconnaît le fucose relié en configuration α

→ 1080 – 934 = 146 (1 fucose = 146 Da)

En plus d'être stéréosélectives, les enzymes peuvent être **régiosélectives** (= capable de reconnaître le lien 1 → 4 ; 1 → 5 ; 1 → 6 ; 1 → 3 ; 1 → 2).

*Exemple : Dans les β-Galactosidases, on a plusieurs enzyme dont une qui s'appelle la Lactase. Elle hydrolyse spécifiquement le Lactose. Donc, elle va couper les liaisons en configuration β et en position 1 → 4 (lactose = galactose-β(1-4)-glucose).*

Les enzymes, pour l'analyse des polysaccharides, sont **indispensables**. Ce qui n'est pas le cas pour les protéines.

Si on ne s'intéresse qu'à la structure primaire du polysaccharide, c'est-à-dire, l'ordre des polysaccharides, et éventuellement, la régiosélectivité de la liaison, **quels sont les outils que l'on a à notre disposition ?**

- **Couplage HPLC / MS** avec comme technique d'ionisation, l'**électrospray** (molécule en phase liquide)

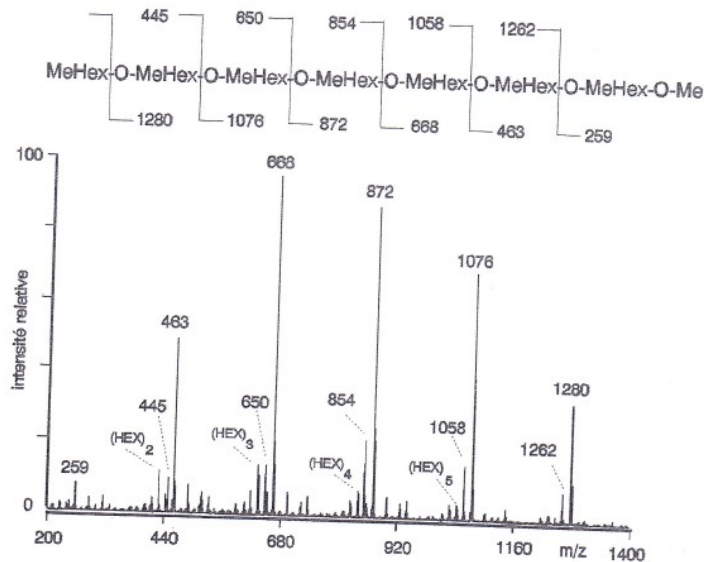


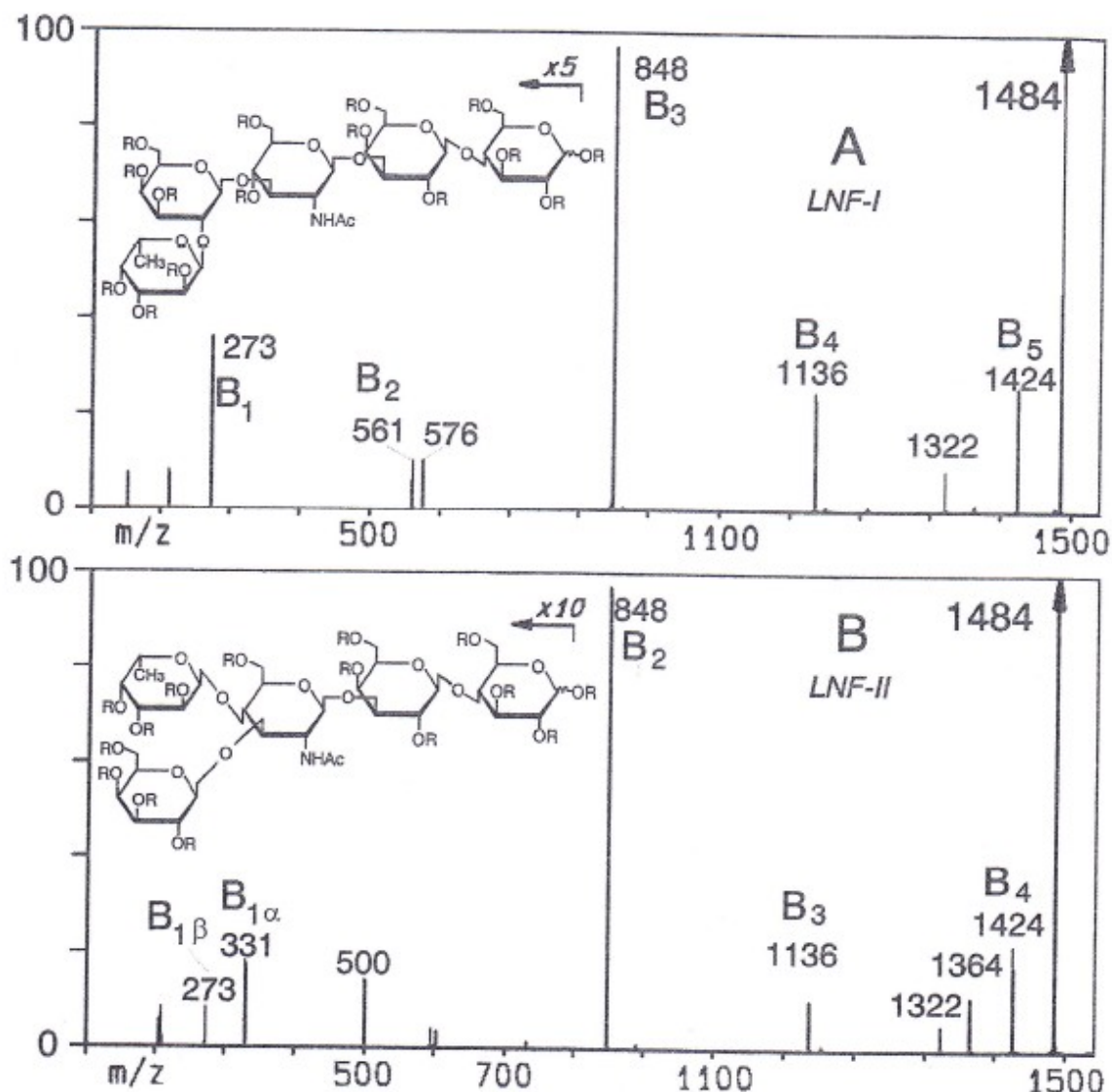
Figure 7.43 : Spectre ESI MS/MS CID du maltoheptulose méthylé doublement chargé par adduit sodium ( $m/z = 760,7$ ). Reproduit (modifié) de la référence 193, avec permission.

*Pourquoi doublement chargé par adduit sodium ?*  
**Les sucres simples sont des oses non ioniques.**

On observe des coupures au niveau de la liaison osidique. On a 1 hexose en moins à chaque coupure.

Sur un polysaccharide simple, une fragmentation en **électrospray** peut nous donner une information sur la régiosélectivité de la liaison. Sur un **polysaccharide complexe**, ce n'est **pas possible**.

Exemple de 2 polysaccharides de mêmes PM mais dont un est linéaire et l'autre est ramifié.



**Figure 7.47 :** Spectres FAB MS/MS CID de deux oligosaccharides LNF—I et LNF-II peracétylés, deux isomères de branchement. Reproduit (modifié) de la référence 216, avec permission.

Par une technique de FAB ou d'électrospray, on pourra analyser ce type de molécule, mais ça va être extrêmement compliqué.

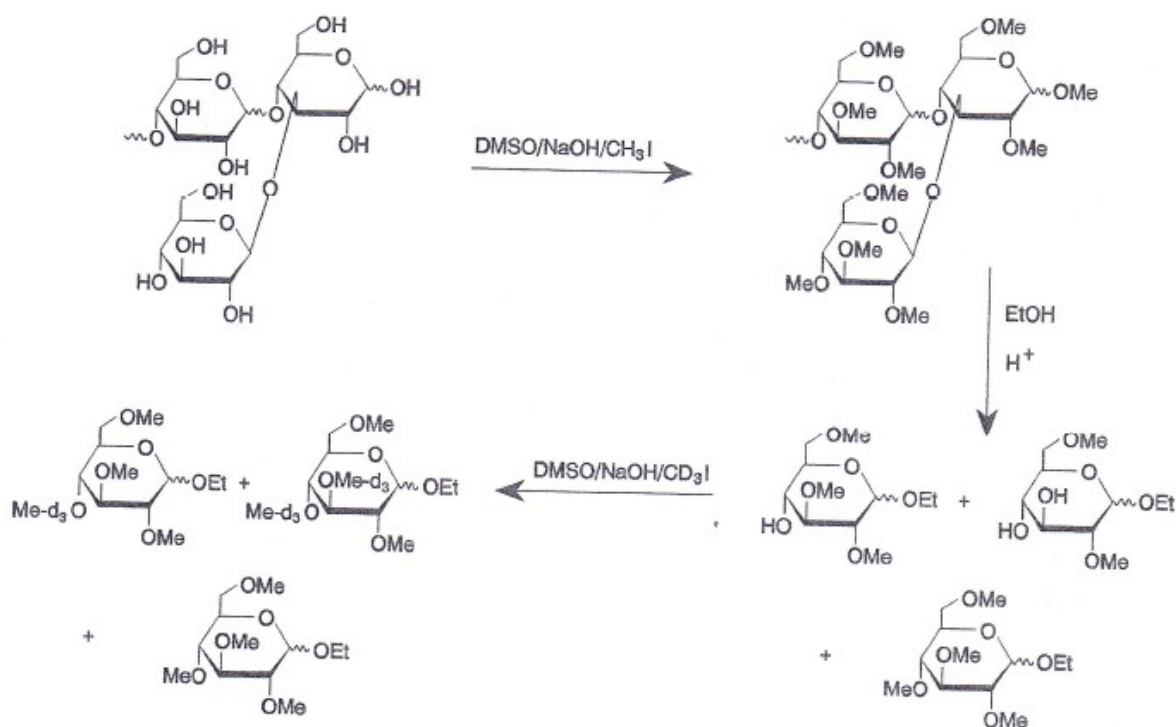
→ Par électrospray ou par FAB, on va pouvoir analyser des polysaccharides complexes. Mais les résultats d'analyses ne seront pas précis.

### ➤ Couplage GC / MS avec une ionisation en impact électronique (EI)

Le problème c'est que les **sucres ne sont pas volatiles**. Donc, on va procéder à des **dérivations chimiques** (= modifications chimiques) pour transformer les sucres qui vont pouvoir être analysés en chromatographe gazeuse. L'interprétation des spectres de masse que l'on va obtenir sera beaucoup plus simple à analyser qu'avec la méthode précédente (e.g. couplage HPLC / MS avec électrospray) et on pourra identifier la régiosélectivité de la liaison.

## Protocoles de dérivations chimiques

On va en présenter 2, même si c'est le 2ème que l'on va préférentiellement utiliser dans les exercices.



**Figure 7.53 :** Séquence de réactions permettant l'obtention d'éthylglycosides perméthylés et sélectivement deutérométhylés.

**1]** Solubilisation de la molécule dans le DMSO, en présence de soude et d'un réactif d'iodure de méthyl.

→ méthylation de l'oligosaccharide

**2]** Éthanololyse acide (= hydrolyse avec de l'éthanol)

→ clivage des liaisons osidiques

→ clivage du méthyl au niveau du carbone 1 (OMe → OEt)

→ ajout d'éthanol sur les OH libre (de la coupure de la liaison osidique)

**3]** On fait tremper la molécule dans du DMSO, en présence de soude et d'un réactif d'iodure de méthyl deutéré.

→ ajout, sur les fonctions OH libre, de méthanol deutéré

*Avantage*

→ les spectres sont faciles à interpréter

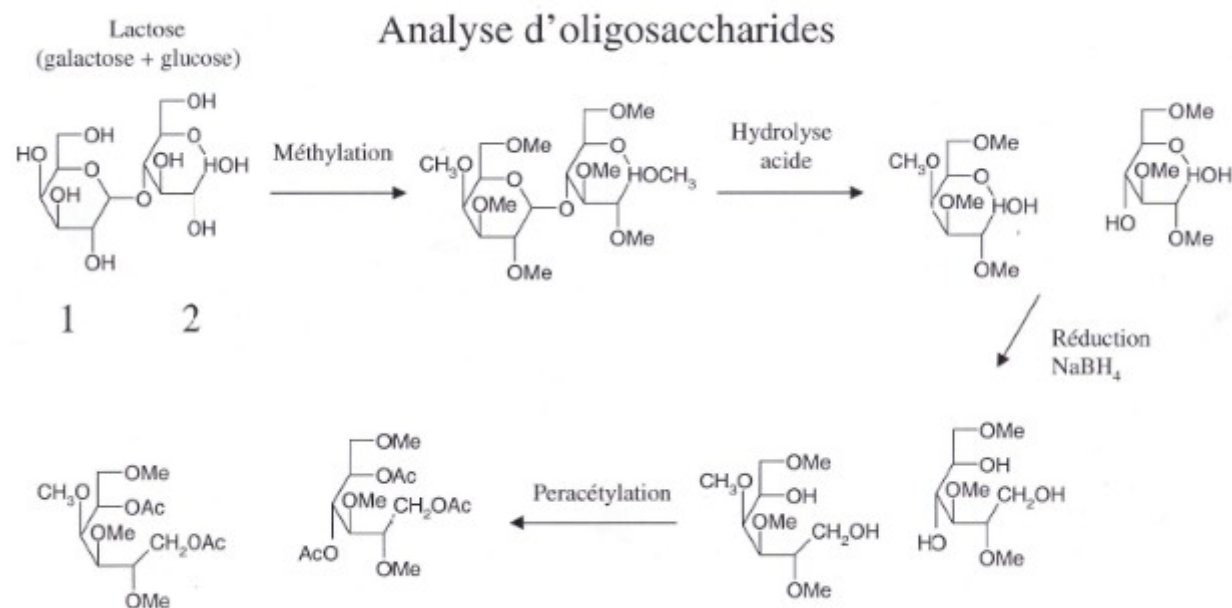
*Inconvénient*

→ la préparation des échantillons est très lente

**Remarque :** Le deutérium détermine la régiosélectivité de la liaison.



## Analyse du lactose (galactose- $\beta$ -1,4-glucose)



- 1] Méthylation par ajout de DMSO avec de la soude et de l'iodure de méthyl  
→ ajout de méthyl sur les OH libres
- 2] Hydrolyse acide  
→ clivage des liaisons osidiques  
→ le méthyl du carbone 1 du sucre 2 est aussi clivé et donne à nouveau un OH
- 3] Réduction par du  $\text{NaBH}_4$  (identifie les sucres réducteurs et le sucre n°1) : agent réducteur spécifique pour les aldoses et donc pour les sucres  
→ ouverture du cycle  
→ l'O du cycle devient OH (alcool) par un apport d'un hydrogène sur le carbone 1 et d'un hydrogène sur le O du cycle
- 4] Peracétylation  
→ ajout de groupement acétyl ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ ) sur les nouveaux OH libre créés précédemment

Ce protocole sert à connaître la **régiosélectivité** de la molécule.

Pour les 2 protocoles, entre chaque étape, on a des **dialyses**, des **lavages**, des **séchages**, donc c'est **très long** à faire.

L'objectif de ces deux protocoles est de :

- ➔ **modifier chimiquement** le polysaccharide
- ➔ mettre, sur chaque **OH**, des **groupements réactifs différents**

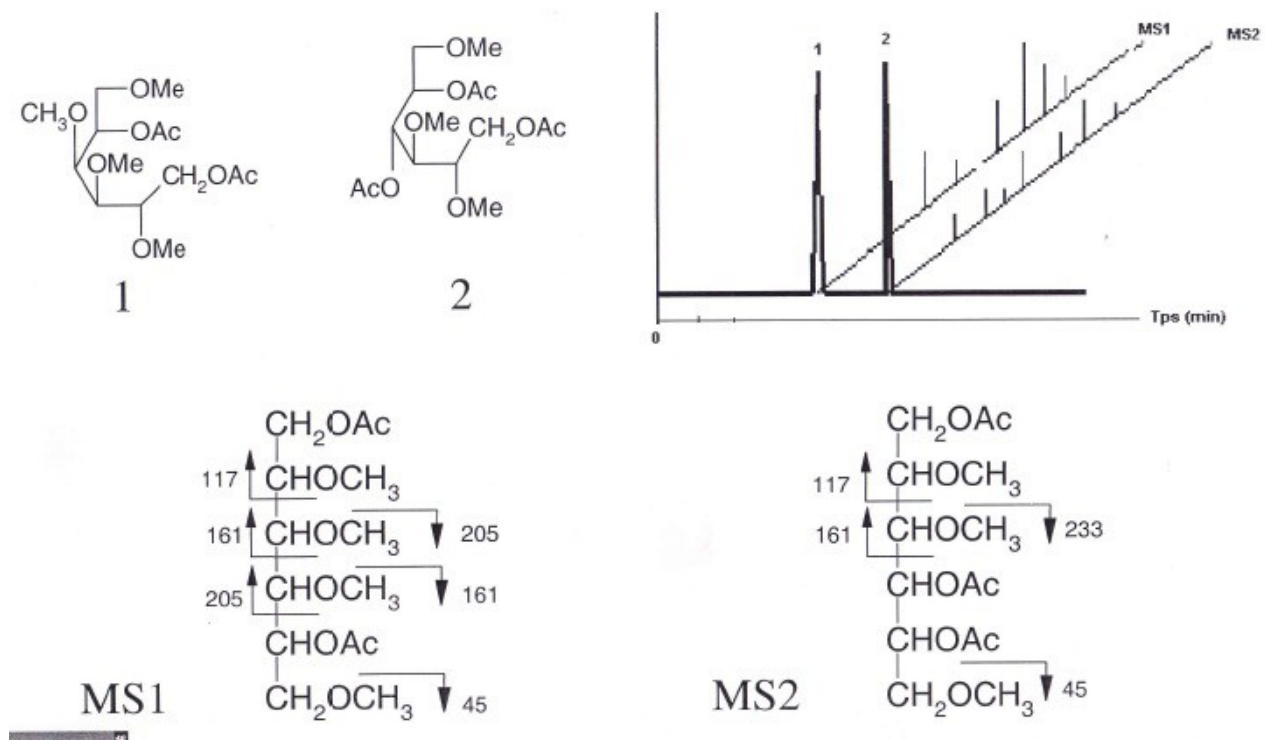
Ces molécules sont devenues **volatiles**. Elles vont pouvoir être séparées par chromatographie phase gaz. On va obtenir 3 pics chromatographiques (MS1, MS2 et MS3) pour le 1<sup>er</sup> protocole. L'analyse en impact électronique de ces molécules permettra, après, de retrouver la structure complète de départ.



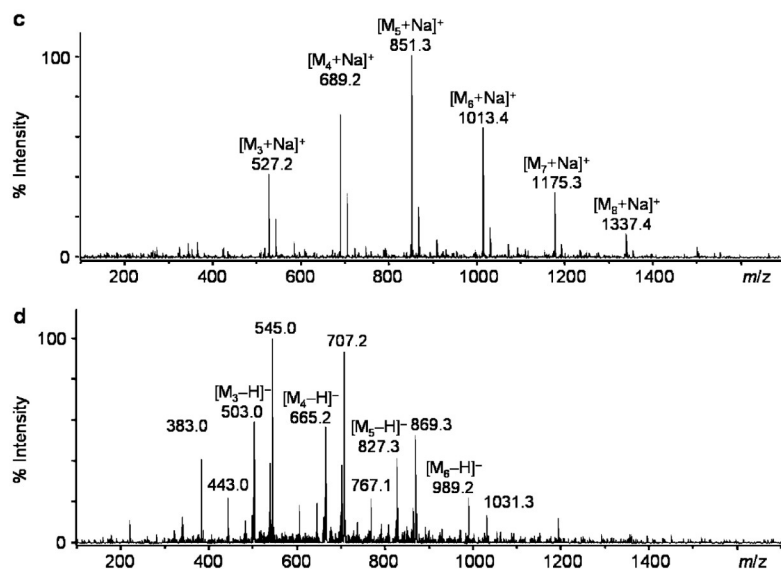
### En résumé :

On prend la molécule, on la solubilise dans un solvant, on injecte ça dans une chromatographie phase gaz, le tout devient volatile et on pourra séparer ces molécules en phase gaz.

On obtient donc le résultat suivant. Deux sucres, deux pics chromatographiques

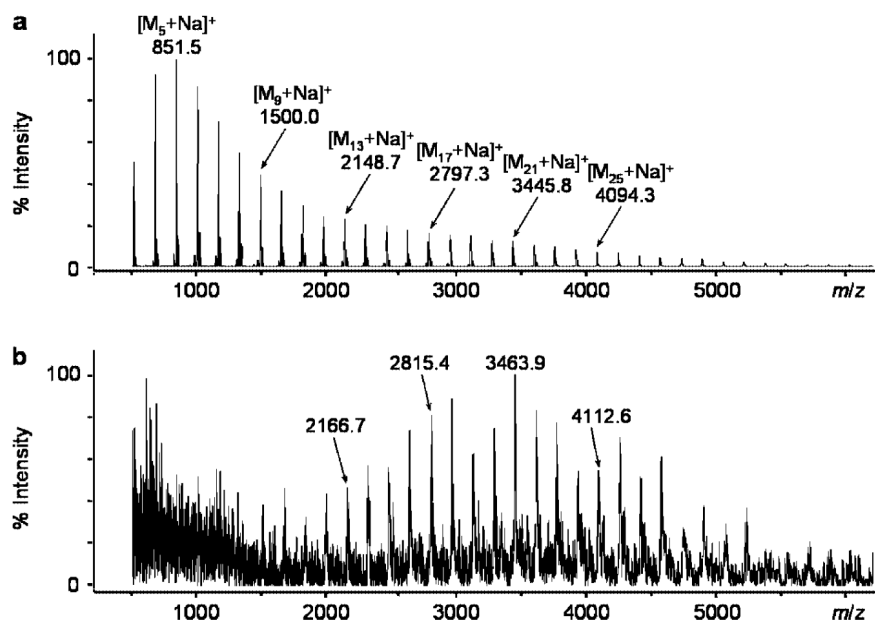


Dans MS2, à cause des fragments de Mac Lafferty, les deux Ac, côte à côte, ne sont pas visibles car ils se recoupent au niveau du carbonyle.

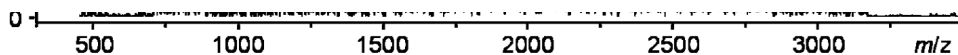


**Remarque :** la présence d' $\text{Na}^+$  pour le cas d'un sucre permet une **analyse plus précise en mode positif** qu'en mode négatif pour du **MALDI** (bruit de fond trop important).

**Figure 1.** Mass spectra of DEX1. (a) Linear positive- and (b) linear negative-ion mode of MALDI-TOFMS; (c) positive- and (d) negative-ion mode of ESI-MS.

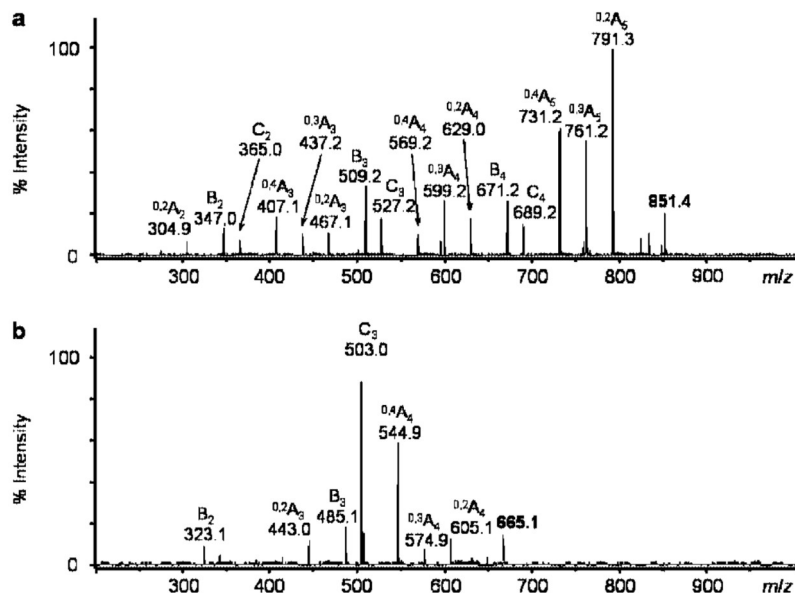


**Figure 2.** MALDI-TOF mass spectrum of the mixture of DEX1 and DEX8 (1 : 4, m/m): (a) linear positive mode and (b) linear negative mode.



Même remarque que pour les protéines s'il y a un « **trou** » qui apparaît dans le spectre. Cela signifie qu'il y a une **ramification**.

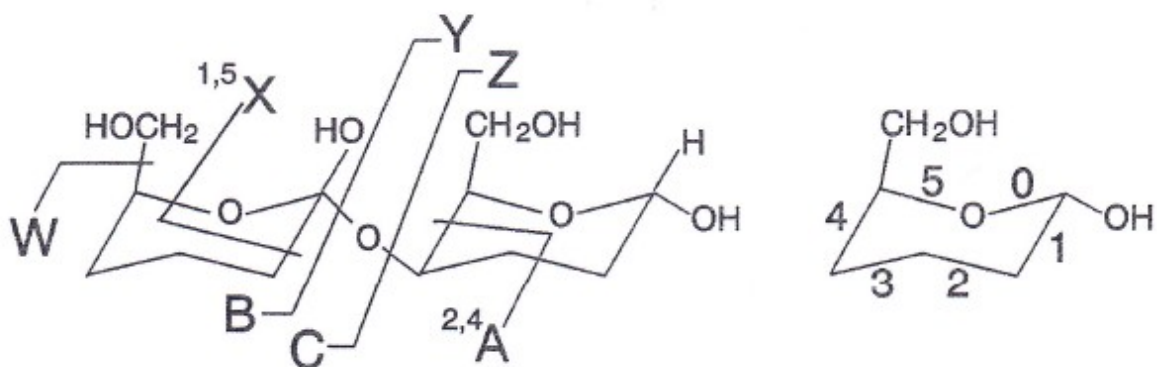
→ Ici, la différence entre chaque pic est égal à 1 hexose.



**Figure 3.** ESI tandem mass spectra of DEX1: (a) [M<sub>5</sub> + Na]<sup>+</sup> at m/z 851.3 (in the positive-ion mode); (b) [M<sub>4</sub> - H]<sup>-</sup> at m/z 665.1 (in the negative ion mode)

↑

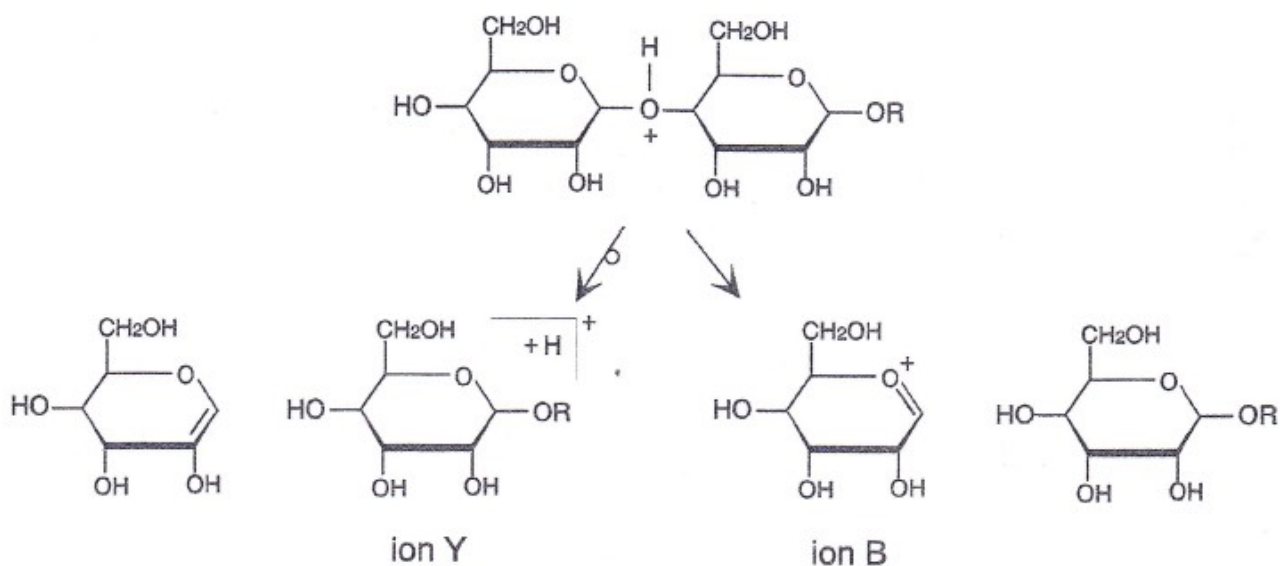
Ici, on voit bien la différence entre le mode positif et le mode négatif.



**Figure 7.44** : Nomenclature proposée par Domon et Costello.

En ce qui concerne la **nomenclature**, seules les coupures **A**, **B** et **C** sont **visibles** et donc également les coupures **Z**, **Y** et **X**. Les coupures **D** et **W** ne sont presque jamais visibles.

Le **sucré terminal** est déterminé par la coupure **C** et le **sucré réducteur** par la coupure **Y** ou **Z**.



**Figure 7.45** : Mécanisme de formation des ions de types B et Y en mode positif.

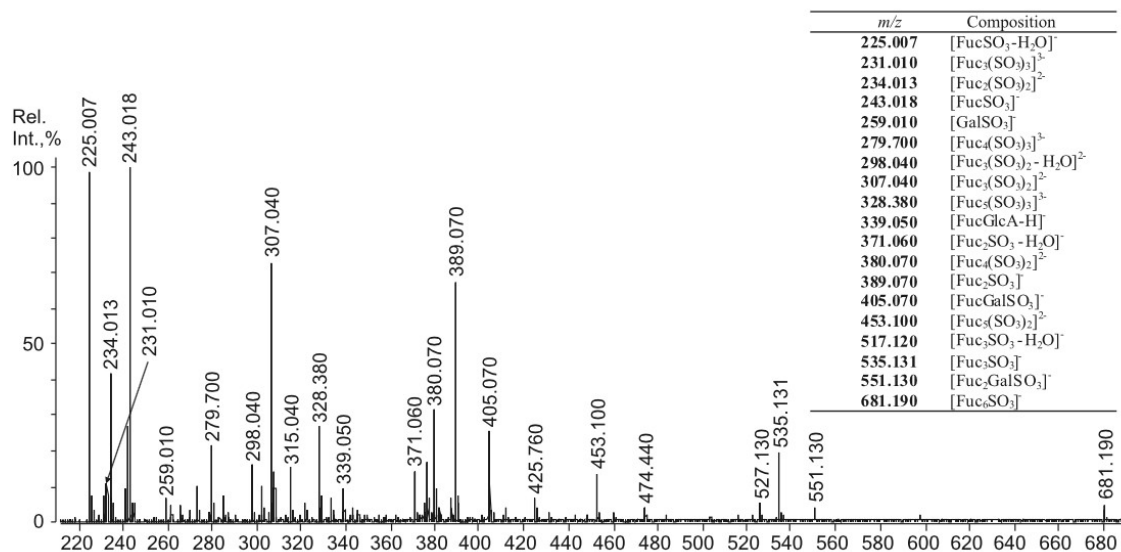


Fig. 1. Negative-ion ESIMS of the low-molecular-weight oligosaccharide fraction 7F2-AHL, obtained from a fucoidan of *C. costata* by autohydrolysis.

Ce genre de spectre est trop compliqué et ne sera donc pas traité dans ce cours. Cependant, il est possible d'être interprété, mais pas à notre niveau. On peut obtenir également ce genre de spectre complexe.

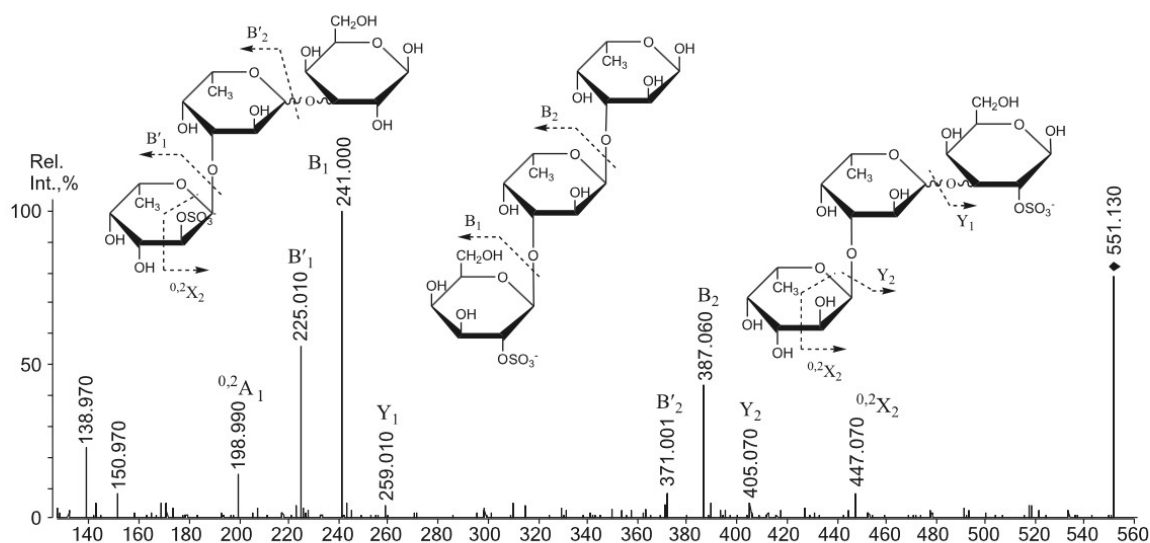
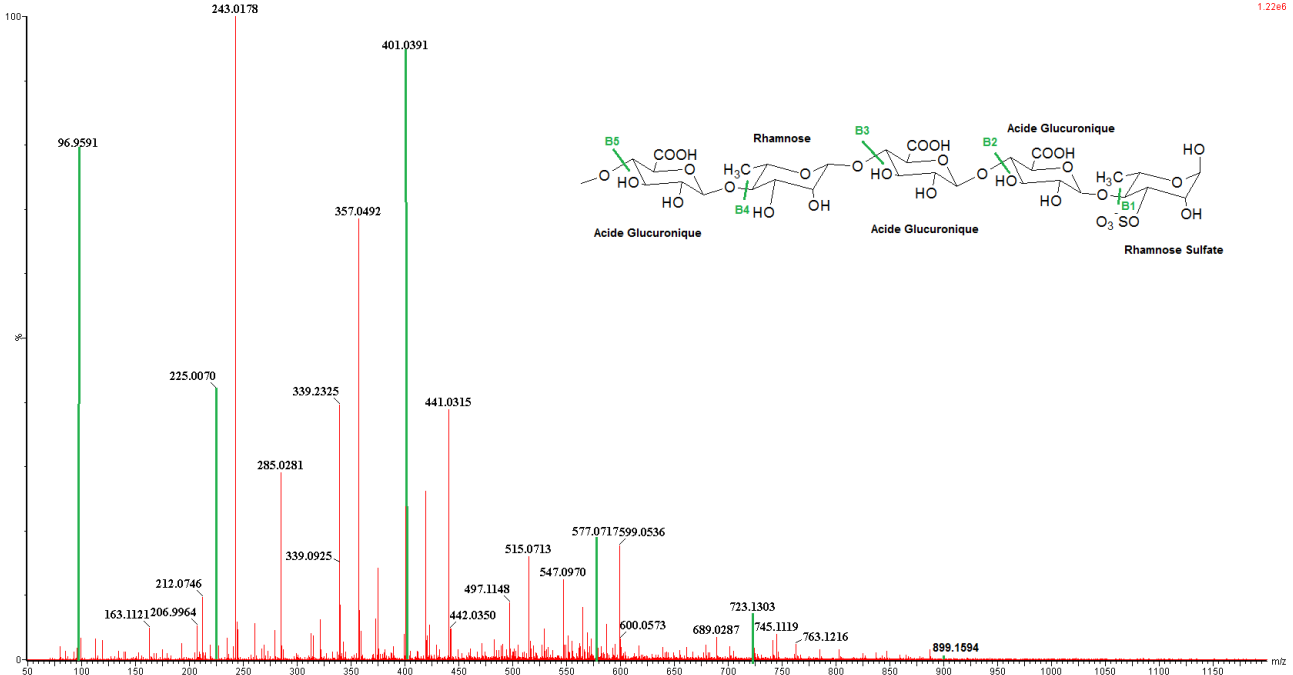
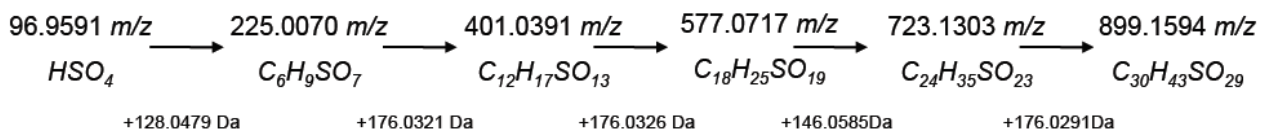


Fig. 3. Negative-ion ESIMS/MS of the ion [Fuc<sub>2</sub>HexSO<sub>3</sub>]<sup>-</sup> at m/z 551.130. M represents sodium salt of oligosaccharides (fraction 7F2-AHL).



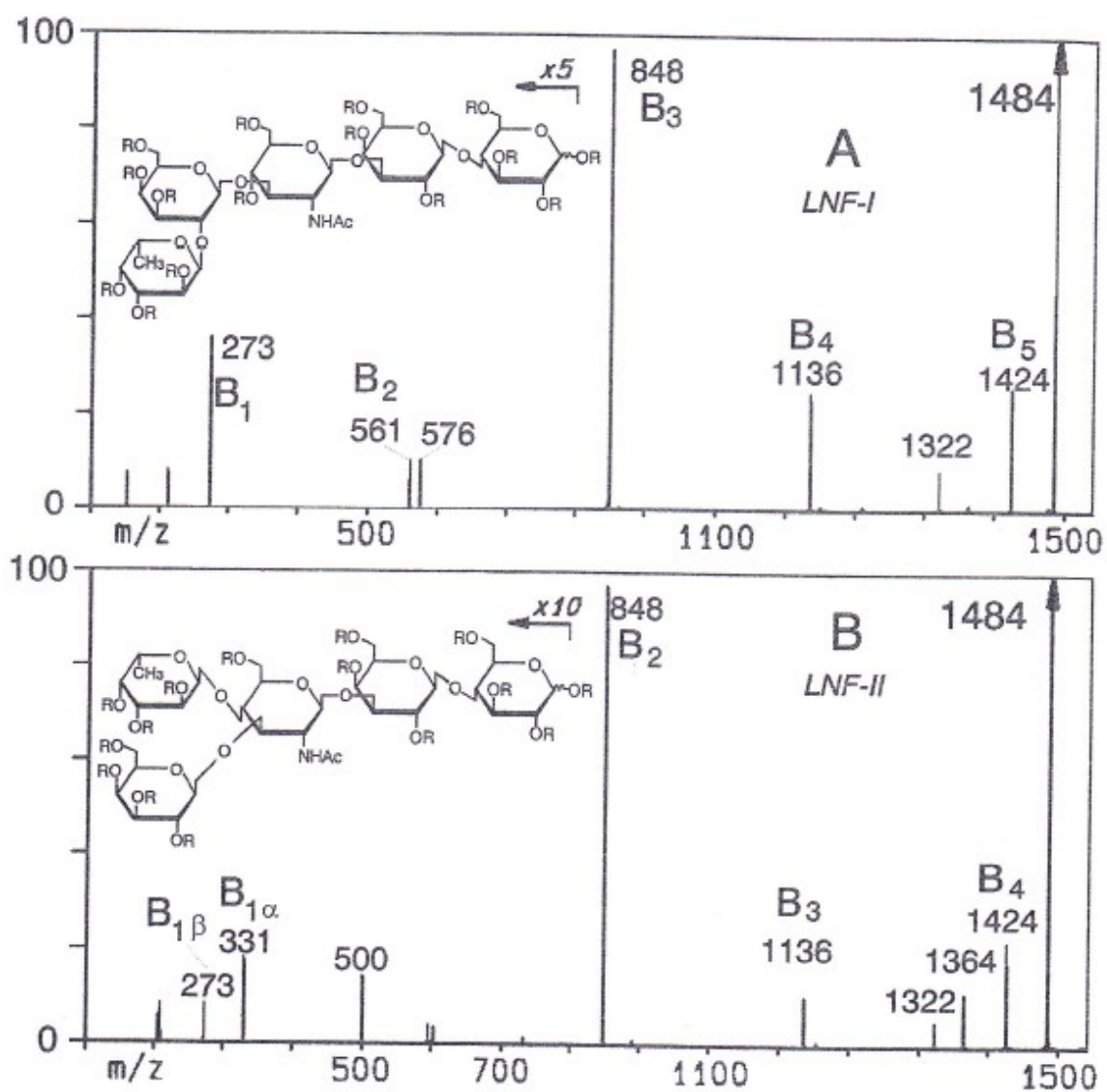
### Fragment Type B (après O-sucre)



On obtient une **très haute résolution** (4 chiffres après la virgule) car nous sommes en **TOF**.

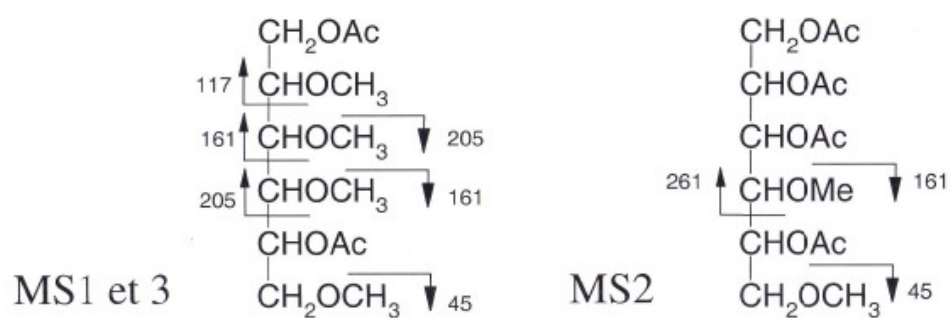
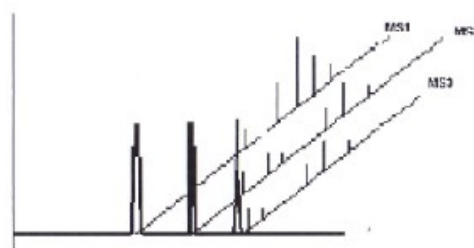
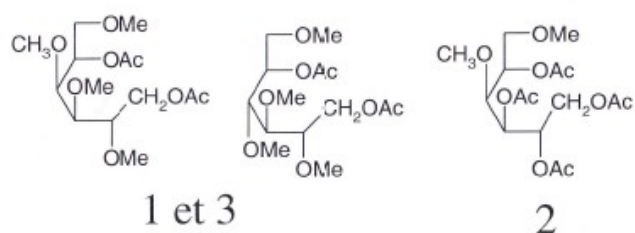
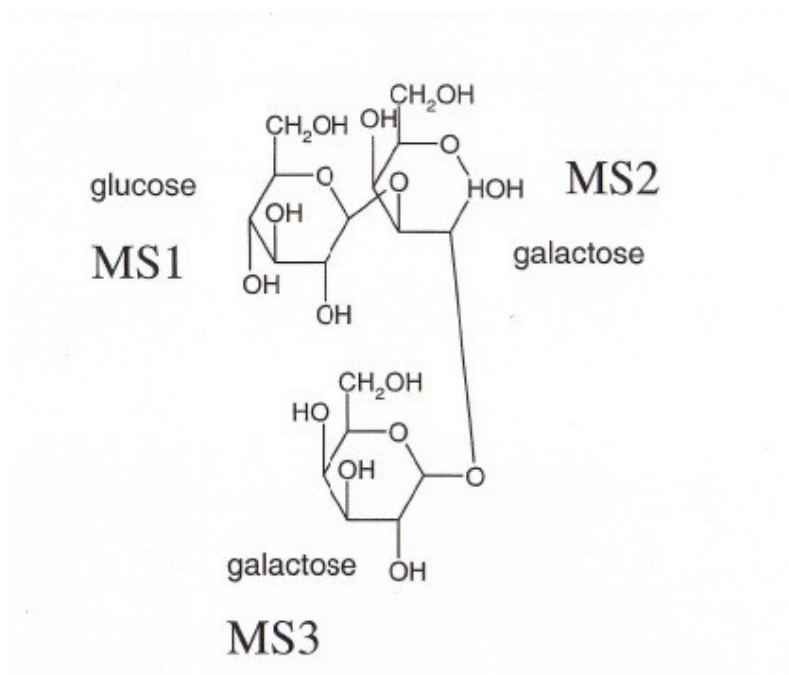
- ➔ Possibilité de déduire la **formule brute** de la molécule car on a **beaucoup d'abondance isotopique**
- ➔ Spectre **extrêmement complexe**

Voici d'autres **exemples** de spectre que l'on peut obtenir avec une ionisation **FAB**.

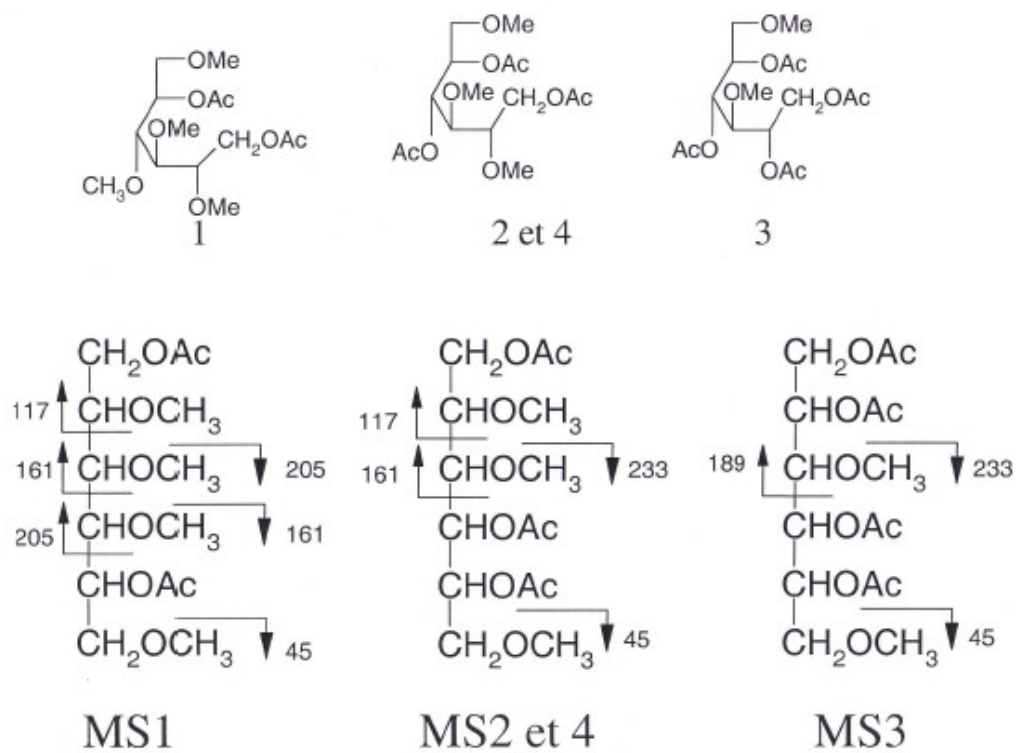
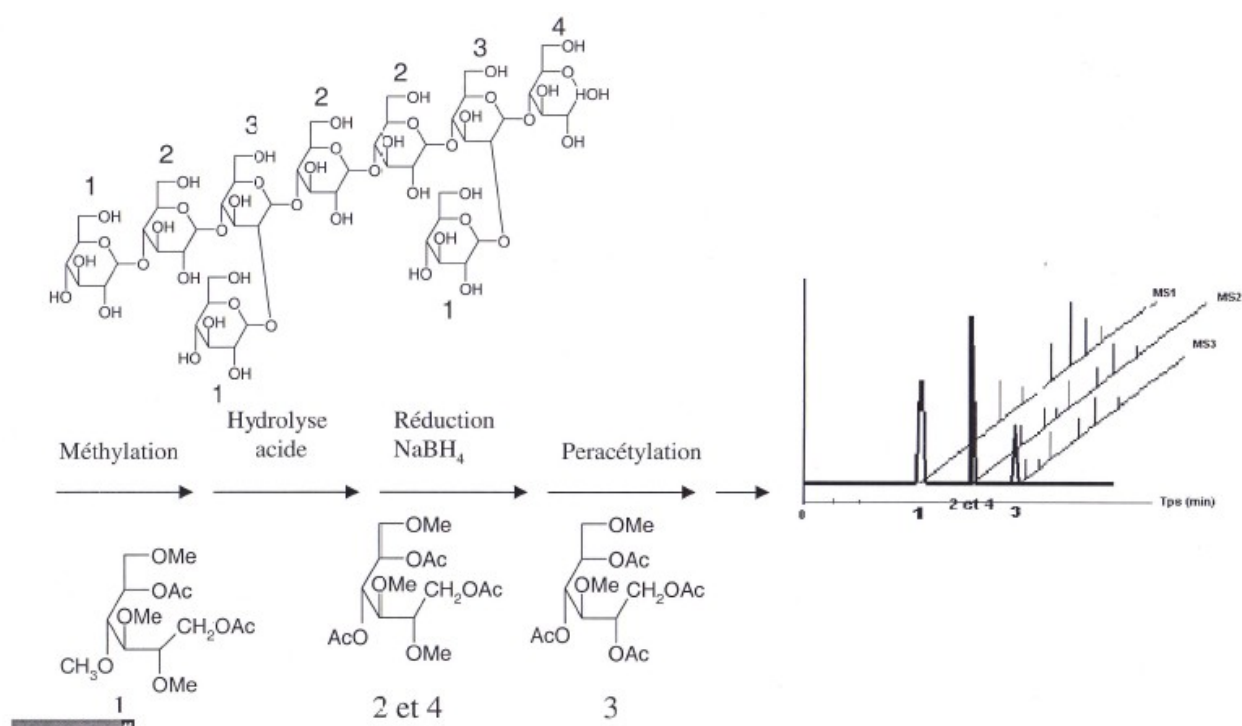


**Figure 7.47 :** Spectres FAB MS/MS CID de deux oligosaccharides LNF-I et LNF-II peracétylés, deux isomères de branchement. Reproduit (modifié) de la référence 216, avec permission.

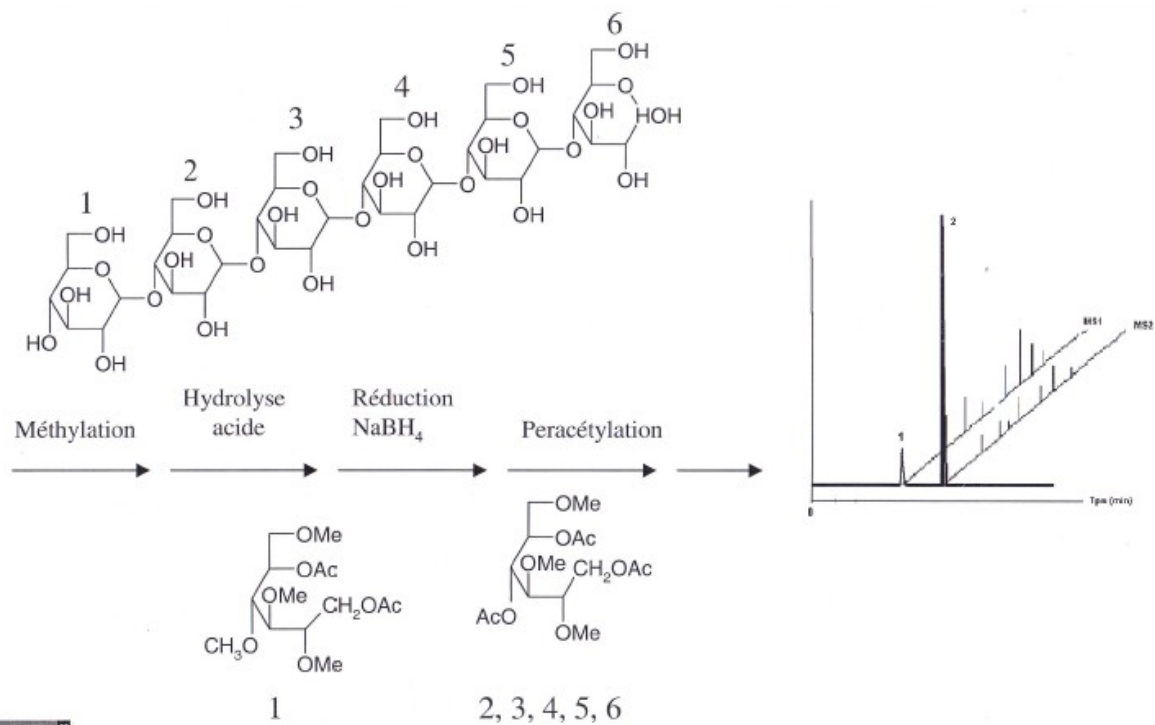
Voici quelques **exemples** d'analyse de **sucre**.











## 2 – La protéomique

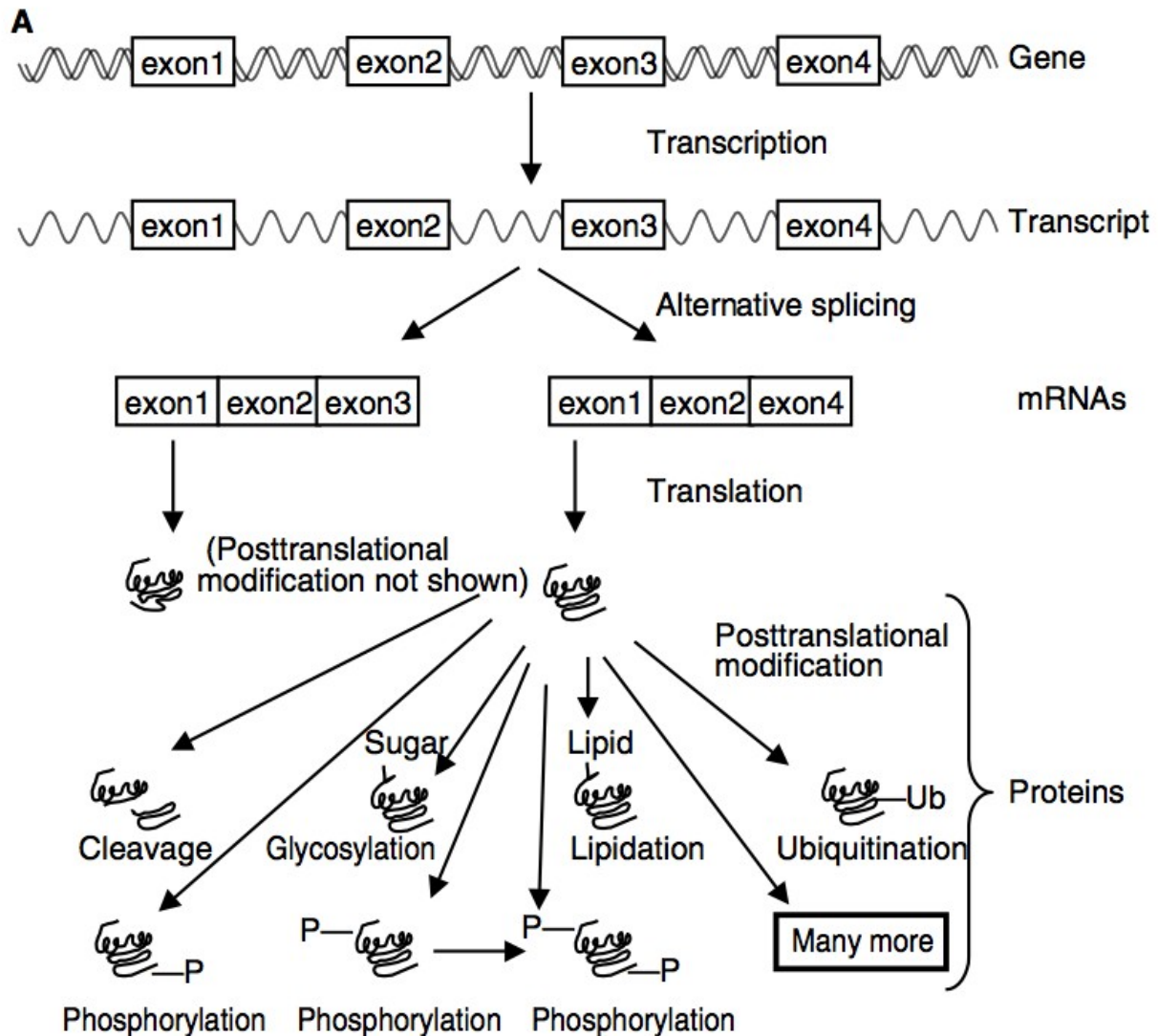
**Définition :** Ensemble des protéines synthétisées par une cellule. Terme construit par analogie avec génome. En effet, c'est par l'intermédiaire des protéines que le génome contrôle la structure et le métabolisme de la cellule. Le protéome est bien plus complexe que le génome car de nombreux gènes peuvent coder pour plusieurs protéines.

**Techniques utilisées :**

- ✓ **Électrophorèse bidimensionnelle haute résolution** : permet de séparer en 2 dimensions le mélange de protéines afin d'obtenir des spectres en 2D.
- ✓ **Spectrométrie de masse en tandem** : permet de déterminer la masse de la molécule et sa structure primaire.

**Description du mécanisme :** Le protéome, l'étude du protéome et de ses évolutions, fournit des informations précieuses sur la façon dont la cellule réagit à son environnement (médicaments, hormones, température, etc ...).

Le protéome va évoluer en permanence, c'est-à-dire que les protéines, en fonction de leur voie métabolique, pourront être **phosphorylées**, **glycosylées**, sous forme **monomère** ou sous forme **dimère**, avec ou non des **cofacteurs**, ... La même protéine, en fonction de son évolution – son devenir – dans la cellule, pourra avoir des **masses différentes** (ex sucre ou phosphate greffé sur la protéine).



- Analyse du gène = **génomique**
- Analyse de l'ARN = **transcriptomique**
- Analyse de protéines natives ou modifiées = **protéomique**

## But

La protéomique a pour but d'identifier (et de quantifier) l'ensemble des protéines synthétisées ou protéome, à un moment donné et dans des conditions données au sein d'un tissu, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire.

La transcriptomique analyse l'ensemble des transcrits (produits d'expression des gènes). La protéomique et la transcriptomique sont donc des approches complémentaires très puissantes qui peuvent être utilisées pour des études fondamentales ou appliquées en biologie, en médecine, en agriculture.

La protéomique apporte des réponses auxquelles la transcriptomique ne peut répondre :

- compléments d'informations sur les modalités d'expression des gènes pour les organismes dont le génome n'a pas encore été séquencé ou pour lesquels les programmes de prédiction de séquences codantes sont moins fiables. Un exemple est l'aide au repérage des bordures d'exons ce qui permet en retour une meilleure annotation des génomes.
- estimation quantitative des concentrations des protéines synthétisées (méthode de marqueurs d'affinité contenant un isotope d'identification : ICAT).
- obtention de données sur la fonction des protéines et les interactions entre protéines ou entre protéines et autres molécules biologiques (approche double-hybride ou approche "tandem affinity purification by tag" – TAP/TAG).

En plus que de **transcriptomie**, de **génomique** et de **protéomique**, il existe l'analyse du **métabolome** que l'on appelle la **métabolomique**.

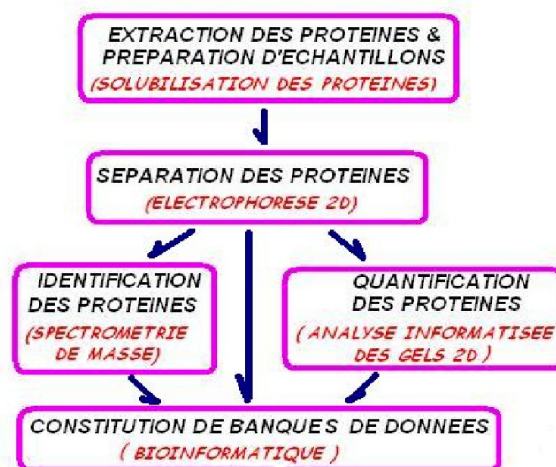
Le **métabolome** se définit comme l'ensemble des métabolites. Ces petites molécules que synthétisent, utilisent, transforment et/ou excrètent les êtres vivants.

La **métabolomique** a pour but d'identifier puis de quantifier tous ces métabolites. Lorsque l'on se restreint aux métabolites hydrophobes, notamment les lipides qui sont généralement extraits et analysés avec des méthodes spécifiques, on parle de **lipidomique**. Le terme « métabolome » (metabolome en anglais) a été proposé par Oliver et al. en 1998 dans le cadre de la génomique fonctionnelle de la levure. D'abord associée à la notion de diagnostic (on sait depuis très longtemps que la composition de l'urine peut révéler diverses maladies humaines), la métabolomique s'est aussi imposée comme un formidable outil de recherche en biologie végétale.

Rappel :

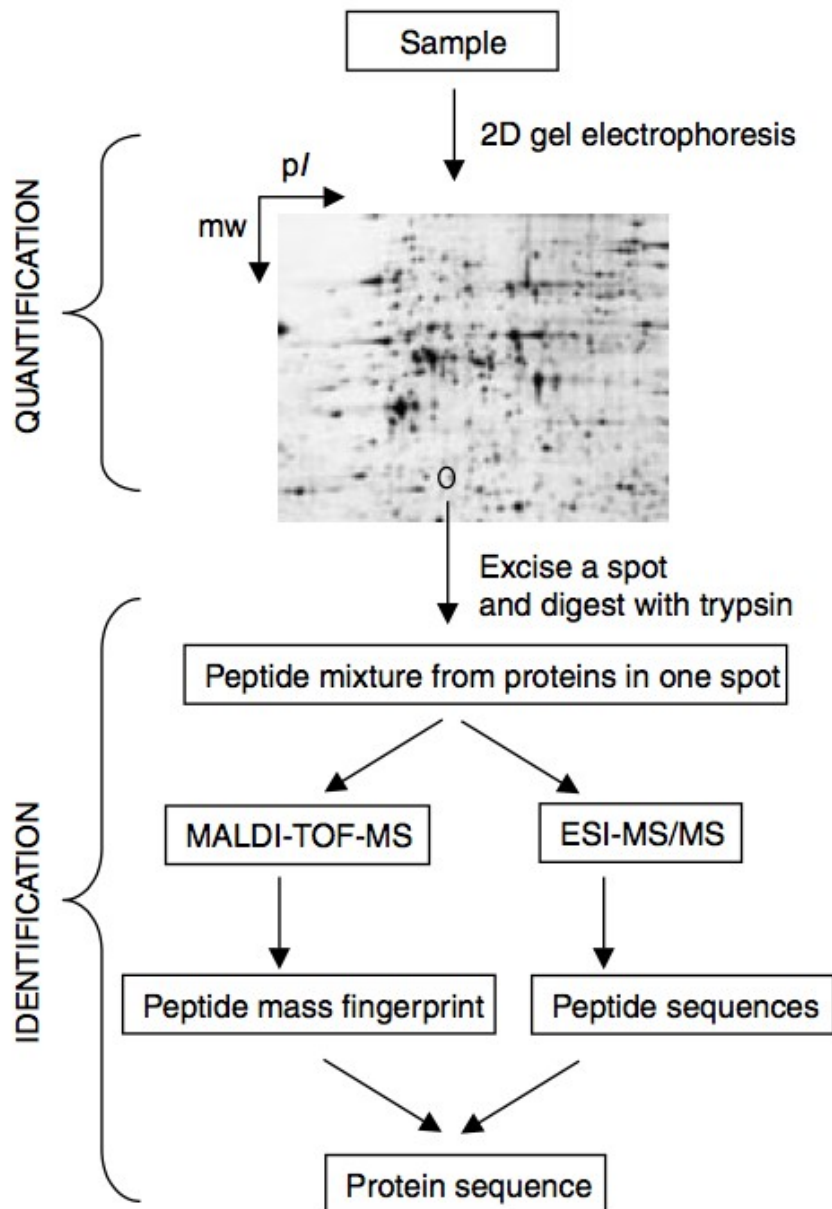
\* La **spectrométrie de masse** est une technique **quantitative**.

\* L'analyse des **protéines** se résume à : l'**enchaînement en acides aminés**, la **masse** de la molécule et la **structure primaire** de cette molécule.



**PROTEOMIQUE. LES GRANDES ETAPES**

Exemple de protocole.



Pour analyser un **protéome**, pour les **sucres**, il nous faut : la **composition osidique**, le **poids moléculaire**, la **structure primaire**, le type d'enchaînement (= **régiosélectivité**) et la configuration de la liaison (= **stéréosélectivité**).

Pour les **protéines**, il nous faut : le **poids moléculaire** et la **structure primaire** avec, éventuellement, la **composition en acides aminés**.

Cependant, les **protéines**, par rapport aux sucres, peuvent avoir une **structure tridimensionnelle** (hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , association des sous-unités).

Par **spectromètre de masse**, on aura les informations suivantes : **composition en acides aminés**, **structure primaire**, **poids moléculaire** et éventuellement, si c'est une **protéine globulaire** ou **dénaturée**.

Si on veut avoir le **poids moléculaire**, la technique de choix est de faire du **MALDI-TOF** (et non pas MALDI-Q-TOF car le quadripôle fait de la fragmentation et nous, on veut le poids de la molécule) ou, plus rarement, **FAB**.

Les **séquences peptidiques** sont obtenues par **hydrolyse partielle** de la protéine par des **enzymes**. Il faut bien quelle soit **partielle** car sinon, on ne pourra pas ré-assembler la protéine. Si nos fragments n'ont pas de séquence de recouvrement, on va galérer xD.

Si on veut avoir la **structure primaire** et donc la **composition en acides aminés**, on utilisera, de préférence, le système de **chromatographie liquide** (HPLC) avec comme source d'ionisation l'**électrospray** (ESI) associé avec des systèmes de **MS/MS** (spectrométrie de masse en tandem).

Pour faire de la **MS/MS**, on a plusieurs outils, soit faire du **piège à ions** (ion trap) et donc faire de la **MS n fois** ( $Ms^n$ ) mais se sera de la **moyenne résolution** (2 chiffres après la virgule), soit faire du **triple quad** (MS2).

### *Exemple d'une protéine*

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MNKCYALVWN VSQGCWNVVS EGSRRRGKPA GAKAAIASVL ALLGATALAP
51  AYALPSGGTV VGGSANGEIH LSGGNSLSVN QKVDKLIANW DSFSVAAGER
101 VIFNQPSSSS IALNRVIGTK ASDIQGRIDA NGQVFLVNPV GVLFGGGAQV
151 NVGGLVASTL DITDAEFNGN SSRYRFTGPS TNGVLNHGGA ITAAEGGSIA
201 LLGAQVDNRG TVLAQMGGVG LGAGSDLTLN FDGNKLLDIR VDAGVANALA
251 SNGGLLKADG GRVLMAARTA NALLNTVVNS QGAIEARSLR GKNGRIVLDG
301 GPDGKVMVGG ALSANALNGP GHGCTVEVRG QAVEVALGTQ VNTLASNGLN
351 GTWKIAADKI DVRPSAVSDG VTVHADTLR NLASTNIELV STKGDLDLDG
401 SVNWASGNRL GLGSAADTL NGRLNASGAK AGLELKAEGA IDINDKIVLG
451 GAGSALAMDA GEGHRVNGTA SVSLAGANAT YVSGGYYYTV VQNLAQLQAI
501 NKNLDGLYVL GGNILGGSYY CTALQSIGGP AGVFSGTLDG LGNSIGNLSI
551 SNTGPNVGLF ARSSGTLSNL KLNNLRVSDN TYGSGPSSLG ALVGINSGRI
601 ANVSASGVSV VGSRLRSNAL GGLVGRNISG QIANASVSGG VTGYAASTAV
651 GGLVGENFTT AWGPEAVIEN AHSNVHVAQA STERNSLGGV GGLVGLNAKG
701 MIRASGSQGK VETYRPGLNV GGLVGYNMFG HVSDSSASGQ VEAGGAGNTG
751 GLVGLSSGGE IFRSQASGSV YSKGGLATGG LIGKAEGNGM LGNLKASGSV
801 TDQGGADLGG LVGNNSQSAI ETAEATGKVS GGSNSRVGGL IGHNLGGSVA
851 HAISRGDVSG GFNSLVGGLV GHNGGELVNV DASGRVSAAA SASVGGLVGS
901 NAGSILSARS SSTVNGSGRS RIGGLVGENQ IQGRIVSSMS EGTVSGDYYV
951 SMGGLAGLNL GSIEYSGVSG KIDFKPQSHY GQIYGAQVGE NHGVLGGNYV
1001 IGEAALLPPA GIDYGNIW

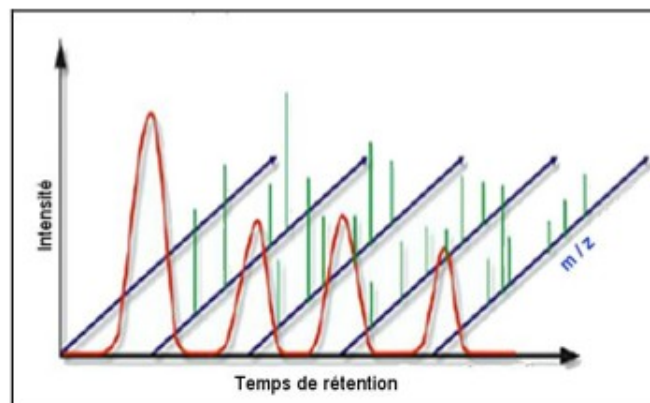
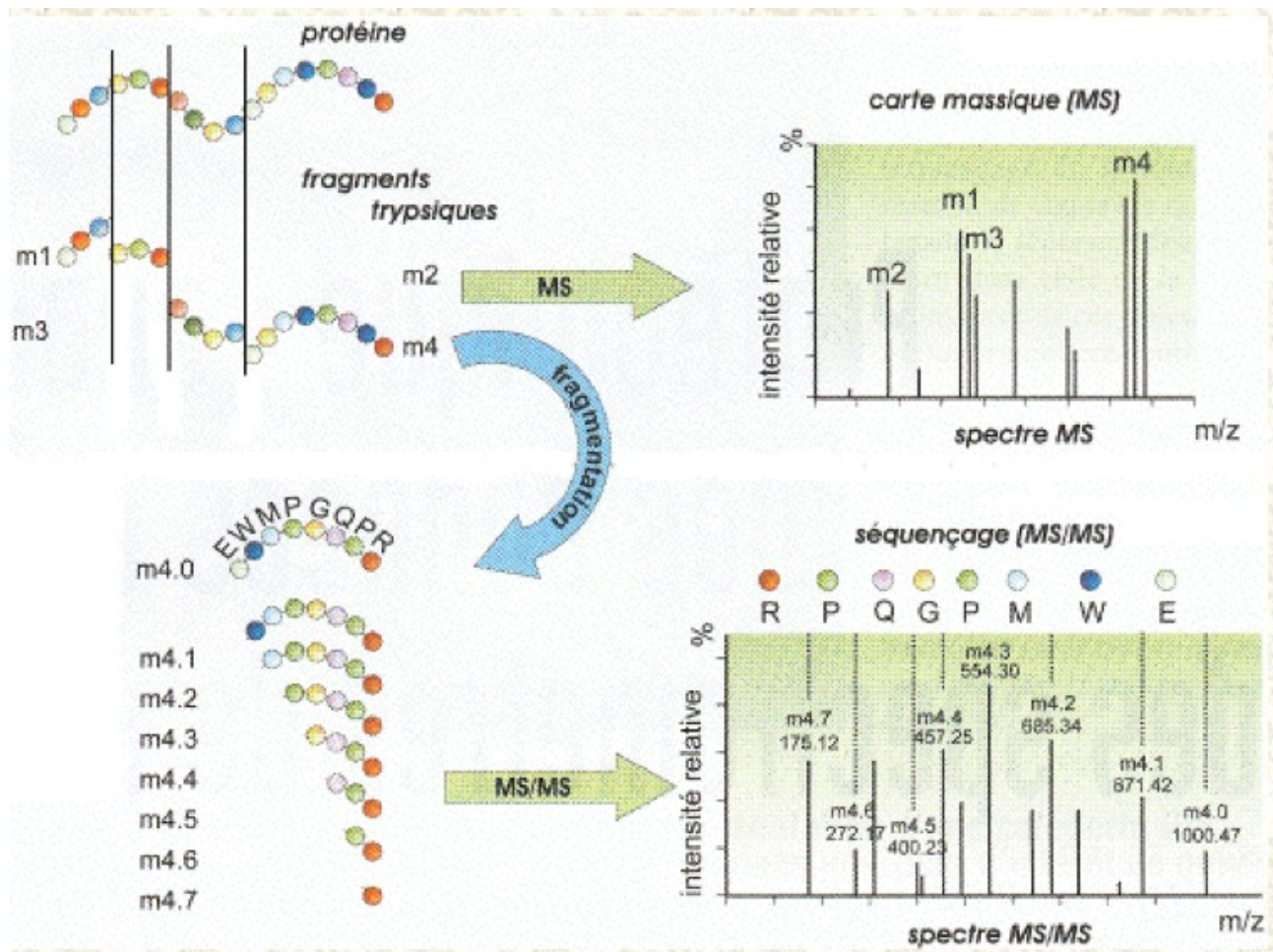
```

*Ce que l'on fait pour arriver à déterminer la structure primaire de la protéine.*

- 1] digestion de la protéine par voie enzymatique
- 2] séparation par HPLC
- 3] séparation + fragmentation des différents peptides par spectrométrie de masse (MS)  
→ on obtient le **spectre MS1**
- 4] analyse par de la **MS/MS** ou spectrométrie de masse en tandem  
→ donne le **spectre MS2** (pour chaque fragment)
- 5] et ainsi de suite pour MS3



Pour finir, on rassemble les fragments obtenus pour retrouver la structure complète de la protéine (par homologie de séquence).



*Spectre MS1*

On doit espérer avoir des fragments les plus petits possibles. On reforme la protéine en rassemblant les fragments de protéine à l'aide de **séquences de recouvrement** (même structure sur 2 fragments différents).

Remarque: Si on est dans le cas d'un protéome, on peut se douter que cela prendra beaucoup de temps. Ce qui est vrai.

## Type de clivage

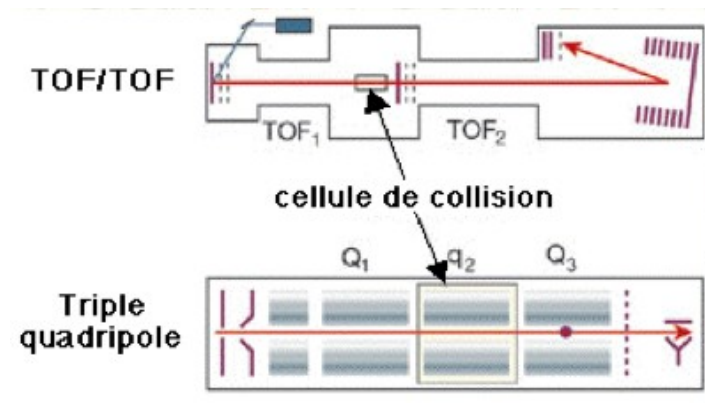
Type de clivage	Agent de clivage	Spécificité
Enzy-matique	Trypsine	Côté C-terminal de l'arginine (Arg) et de la lysine (Lys)
	Pepsine	Non spécifique
	Chymotrypsine	Côté C-terminal des résidus hydrophobes
	Endopeptidase glutamyl	Côté C-terminal de Glu et Asp
Chimique	Bromure de cyanogène	Côté C-terminal de la méthionine (Met)
	Acide dilué	Asp et Pro
	BNPS-skatole	Trp

\* Acides aminés **hydrophobes** = acides aminés **aromatiques** = **Tyr, Phe** et **Trp**

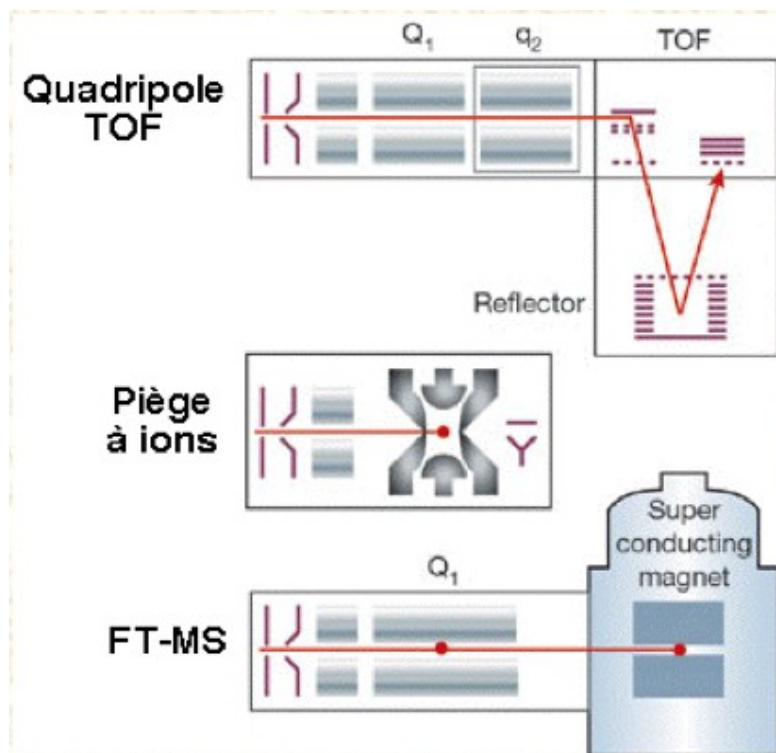
\* Non spécifique = coupe aléatoirement

Le **clivage enzymatique** permet de déterminer l'**acide aminé** qui se trouve soit côté **C-term** soit côté **N-term** : c'est non négligeable !

*Pour faire de la MS/MS*

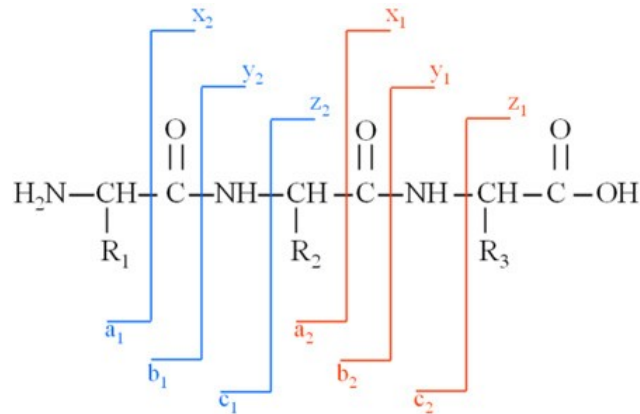


*Pour obtenir une bonne résolution*

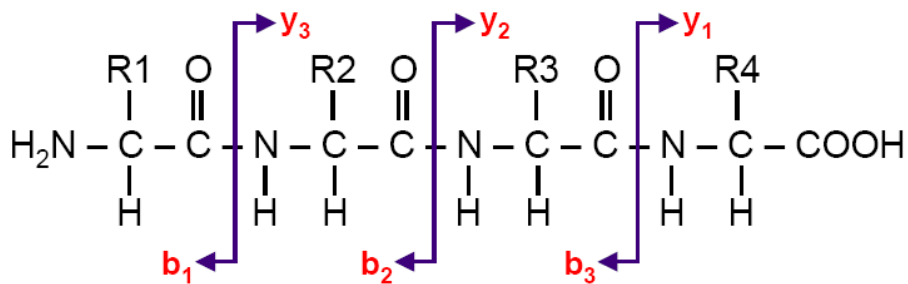




Application : comment ça marche ?

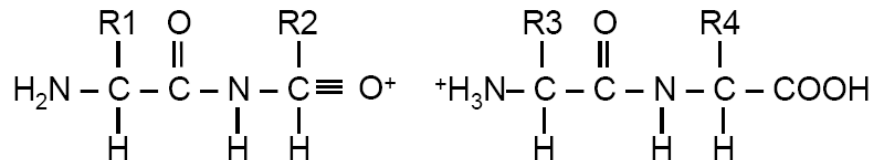


*Nomenclature des fragmentation peptidiques*



*On ne s'intéresse qu'aux liaisons peptidiques (y et b)*

**Fragmentation**



**b<sub>2</sub>**

**y<sub>2</sub>**

*Coupure de la liaison peptidique*

**1]** HPLC + ESI

**2]** fragmentation

\* si on a un doute entre 2 acides aminés, on regarde les coupures de la chaîne latérale. Il faudra donc isoler ce fragment avec un trap ion, puis le refragmenter pour faire de la MS/MS et obtenir des spectres MS2 voire MS3.

**3]** on s'intéresse aux fragments de la chaîne principale

### Nomenclature des fragmentations peptidiques :

- \* x, y et z pour les ions visibles côté C-term
- \* a, b et c pour les ions visibles côté N-term

Au niveau de la coupure, la charge créée va toujours du côté de la molécule où il y a le plus d'électron. Donc, le fragment qui reçoit le proton ( $H^+$ ), dû à la coupure, sera plus intense sur le spectre de masse.

Les **liaisons peptidiques** sont plus « fragiles » que les liaisons carbonées/carbonées et ce sont celles qui vont se **couper en premier**.

→ pour former le spectre MS1

Pour ce qui est des coupures sur la **chaîne latérale**, si, par exemple, on est en présence d'une **Phe**, il y aura des coupures au niveau de :

- \* l'aromatique (m/z 77)
- \* l'aromatique +  $-CH^3$  (m/z 91)

### Au niveau des chiffres :

a1, b1, c1 = 1<sup>er</sup> acide aminé sur le côté N-term  
a2, b2, c2 = 2<sup>ème</sup> acide aminé sur le côté N-term

z1, y1, x1 = 1<sup>er</sup> acide aminé sur le côté C-term  
z2, y2, x2 = 2<sup>ème</sup> acide aminé sur le côté C-term

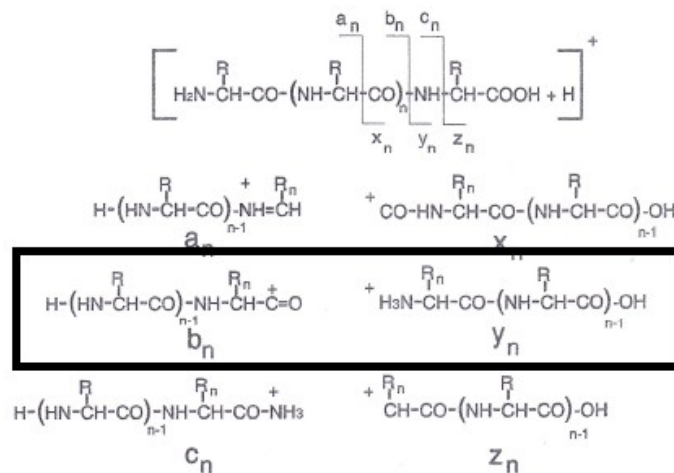


Figure 7.3 : Voies de fragmentations principales des peptides par spectrométrie de masse en tandem CID.

*Après la coupure au niveau de la liaison peptidique, où va la charge ?*

Les fragments y côté N-term = structure peptidique (NH<sub>3</sub>---OH)

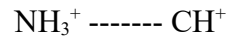
Les fragments b côté N-term = masse du peptide (moins -OH donc moins 17)

Lors de la fragmentation :

➔ Au niveau du carbonyle, entre le -CH et le C=O du peptide, la charge + va aller de préférence sur le C=O :  $\text{C=O} \rightarrow \text{CO}^+$

➔ De même, si la charge + va sur l'autre fragment, donc sur le -NH :  $\text{NH} \rightarrow \text{NH}_3^+$

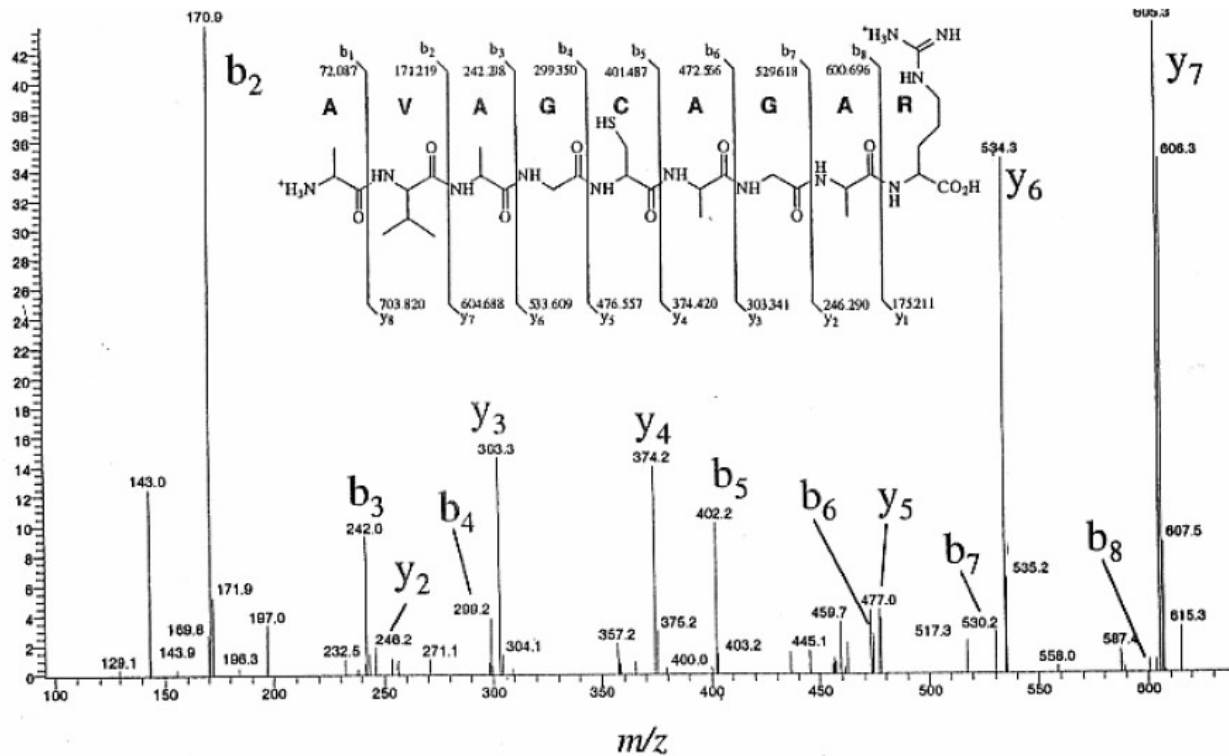
Si on coupe entre le -CH de la liaison peptidique et le -NH de l'acide aminé, on obtiendra un



\* -NH capte 2 protons ( $2\text{H}^+$ )

\* Cela sert à savoir quel type de coupure on a, comme par exemple, si on a une différence de masse de +2.

*Exemple d'exercice  
avec les coupures b et y  
(liaison peptidique)*



La MS/MS donne une **information structurale** et renseigne sur l'**enchaînement** séquentiel d'**acides aminés**.

*Autre exemple*

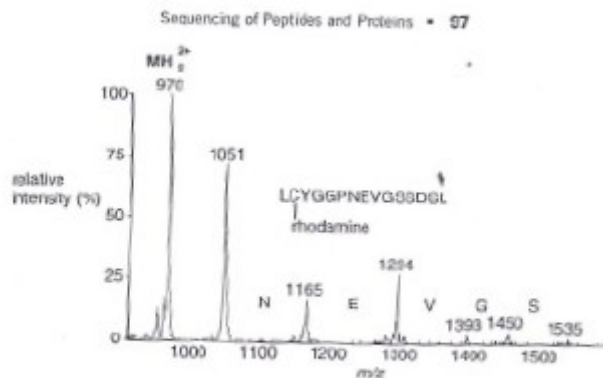


Figure 4.21 The CID data of this partial sequence and the chemistry performed on it (rhodamine-peptide)<sup>2+</sup> (m/z 970) enabled the researcher to identify the position of rhodamine. Rhodamine peptide courtesy Professor Klaus Hahn, The Scripps Research Institute.

Faire des soustraction entre les pics nous donne des valeurs de masse d'acide aminé.

C'est magique ✨

**Remarque :** Dans la planche, les valeurs des acides aminés ne tiennent pas compte du H et du OH (H<sub>2</sub>O) qui sont pris dans la liaison peptidique (donc la valeur indiquée a -18 de masse).