

La spectrométrie de masse : une technique puissante pour l'analyse de constituants biologiques

Mass spectrometry : a useful tool for biological analysis

C. Lange & C. Paris

*Laboratoire de Chimie Organique Structurale, CNRS URA 455;
Université P. et M. Curie, 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05. FRANCE.*

Après une brève description de la technique de Spectrométrie de Masse simple et en tandem, les diverses applications que l'on peut attendre de ces outils sur le plan bioanalytique seront exposées :

- 1 - Analyse de constituants légers par couplage GC-MS : les exemples abordés concerneront des phéromones, des toxines, des cires cuticulaires chez divers insectes et l'analyse de peptides après dégradation selon la méthode d'Edman.

- 2 - Analyse de composés polaires de poids moléculaires moyens par le couplage LC-MS.

- 3 - Analyse de composés polaires de hauts poids moléculaires par les techniques de Désorption FAB, L-SIMS, PD-MS, Electrospray. Ces techniques permettent d'obtenir des ions moléculaires de polypeptides de poids moléculaires entre mille et dix-mille daltons, selon la technique utilisée. Actuellement, la combinaison de la Spectrométrie de Masse avec des réactions enzymatiques (FAB-Mapping) permet d'élucider la structure de petites protéines jusqu'à cinq Kdaltons. L'ensemble de ces techniques s'avère particulièrement approprié pour les peptides, les protéines, les lipides, les polysaccharides, les glycopeptides et les glycolipides.

After a brief description of Mass Spectrometry and tandem Mass Spectrometry, different applications of such a tool for bioanalytical behaviours are given :

- 1 - Analysis of low-molecular constituents using Gas Chromatography and Mass Spectrometry coupling. The examples which are presented concern pheromones, toxins, cuticular waxes in some insects and the analysis of peptides after Edman degradation.

- 2 - Analysis of polar compounds of middle-molecular weight using LC-MS.

- 3 - Analysis of polar components of high molecular weight using recent techniques of Desorption as FAB, L-SIMS, PD-MS and Electrospray. These techniques can now be used to obtain molecular ions of polypeptides of molecular weight from one to ten Kdaltons, depending on which technique is used. At present, Mass Spectrometry combined with enzymatic reactions (FAB-Mapping) permits an elucidation of the structure of small proteins of five Kdaltons. These techniques are very useful for the analysis of peptides, proteins, lipids, polysaccharides, glycopeptides and glycolipids.

INTRODUCTION

La Spectrométrie de Masse [MS]^(a) et son aptitude à résoudre les problèmes de l'analyse organique, minérale et biologique sont en perpétuelle évolution depuis quelques dizaines d'années et principalement depuis les années 80. Les appareils de MS (secteurs, quadrupolaires, Ion Cyclotron Resonance [ICR], Ion Trap Detector [ITD]) évoluent continuellement. Mais il est indéniable qu'à l'heure actuelle les techniques d'ionisation représentent le plus grand domaine de recherche et de créativité : jusqu'en 1980, on s'attardait sur les ionisations par Impact Electronique [EI] et Ionisation Chimique [CI] en modes positif ou négatif ainsi que sur les techniques de désorption (Désorption de Champ [FD] et Désorption-Ionisation-Chimique [DCI]). Depuis lors c'est la Spectrométrie de Masse des Ions Secondaires

(a) Les sigles sont ici exprimés en langue anglaise par souci d'homogénéité avec la littérature et pour faciliter la lecture d'articles en Spectrométrie de Masse.

[SIMS], le Bombardement par Atomes Rapides [FAB], la source à pression atmosphérique [API], technologies actuellement fort bien maîtrisées, qui voient un regain considérable d'intérêt essentiellement dans le domaine de la biologie.

Les techniques de couplage GC-MS, devenues routinières, et dite "détecteur de masse", laisse la place à partir de 1982, pour les molécules polaires, à la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse [LC-MS]. Ce dernier type de couplage dont l'incompatibilité de phase entre la GC et la MS est connue, est exploré avec toutes les méthodes d'ionisation connues à ce jour : CI (méthode d'ionisation chimique), [TPS] (thermospray), CF-FAB ou CF-SIMS et la très récente ionisation par électrospray [ESI]. La recherche entreprise à propos de modes d'ionisation aussi divers que variés est actuellement menée à bien dans l'optique de déterminer les masses moléculaires de biomolécules de haut poids moléculaire. L'ESI est la plus prometteuse dans ce domaine.

L'explosion des multiples possibilités tant de couplage et d'ionisation que d'analyse, fait de la MS une spécialité en soit. La MS est un outil analytique d'une extrême puissance.

Il est impossible de passer en revue la totalité des domaines d'application. Nous avons choisi de restreindre notre propos à l'aspect "analyse biochimique" de la MS.

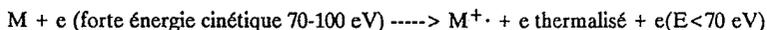
Nous exposerons quelques principes fondamentaux et techniques pour aider à la compréhension de ces phénomènes, mais pour l'essentiel il sera donné une abondante revue d'exemples.

Après l'examen de petites molécules alcaloïdes de venin, nous examinerons le domaine des molécules très polaires, thermolabiles et de haut poids moléculaire. Elles constituent naturellement l'essentiel des molécules d'intérêt biologique. Malheureusement, ces techniques n'ayant été que très peu utilisées dans le domaine des venins peptidiques, nous présenterons également quelques exemples d'intérêt biologique généraux. Les exemples sont rares dans le domaine de la Venimologie, l'Arachnologie est présentement absente.

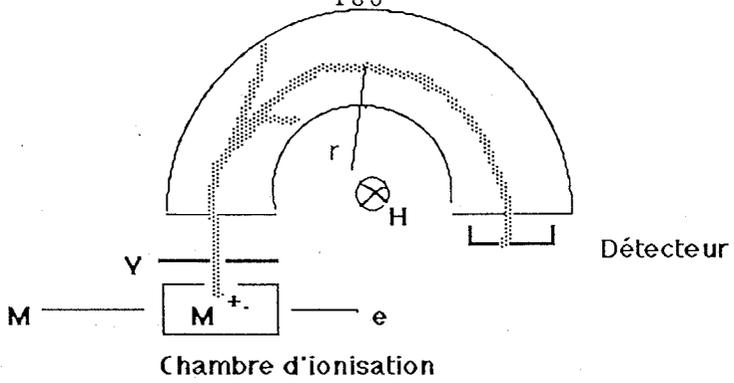
PRINCIPE DE BASE

Le Spectromètre de Masse est un appareil pour analyser des ions (cations ou anions) préalablement formés dans la chambre du spectromètre par bombardement d'électrons de forte énergie cinétique (70-100 eV). La création d'ions et leur analyse nécessitent qu'il règne dans le spectromètre un vide poussé (de 10^{-6} à 10^{-8} mm de Hg selon les types d'appareils).

- Une molécule d'analyte M soumise à l'ionisation sous Impact Electrique (EI) conduit à la formation d'un cation radical $M^{\cdot+}$ par arrachement d'un électron périphérique :

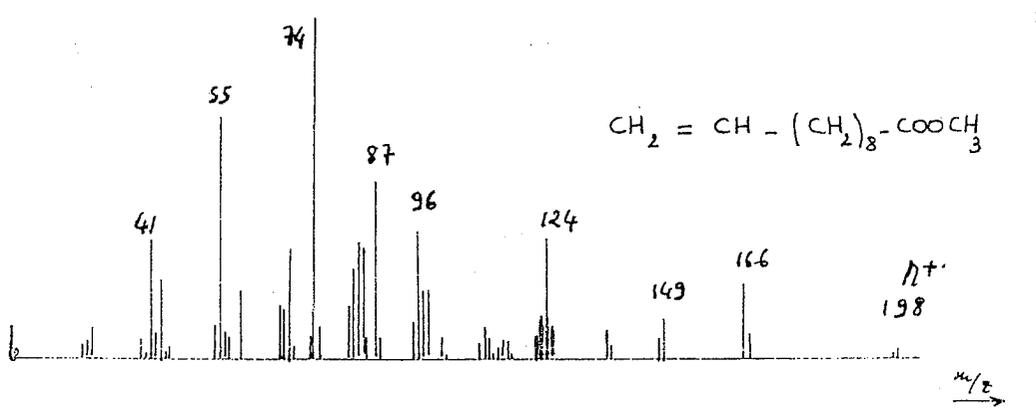
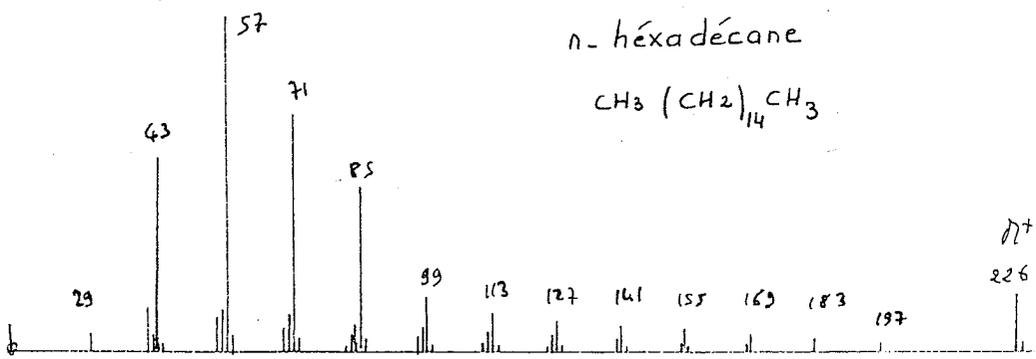


Naturellement selon sa stabilité, ce cation radical, espèce naturellement peu stable, se décompose en ions fils. Les ions ainsi créés sont analysés par l'analyseur de masse (magnétique ou quadropolaire) puis détectés. L'ordinateur enregistre les informations détectées (figure 1). L'ensemble de ces ions représente



$$m/z = [H^2 / 2Y] r^2 \quad \text{avec } z=1 \text{ pour } M^+$$

- FIGURE 1 -



- FIGURE 2 -

Spectres de masse sous EI (a) n-hexane (M = 226), (b) undécylénate de méthyle (M = 198).

une véritable empreinte de l'analyte ; c'est le spectre de masse. Il est alors possible d'obtenir la structure de cet analyte.

- Les anions peuvent aussi être générés dans la chambre d'ionisation du spectromètre. Le processus est nettement plus complexe. Pour simplifier, nous dirons que l'analyte M peut capter des électrons thermalisés pour donner des anions radicaux.



Ces électrons thermalisés (sans énergie cinétique $\sim 0,4 \text{ eV}$) sont obtenus par ionisation primaire d'un gaz réactant. Selon sa stabilité, l'anion radical peut se décomposer pour donner des fragments anioniques. L'empreinte obtenue (spectre de masse) permet d'obtenir la structure de l'analyte.

Les deux processus d'ionisation, très différents pour les énergies cinétiques mises en jeu, sont en réalité complémentaires.

La figure 2 montre les spectres de masse sous EI du n-hexane, de l'undécylénate de méthyle. Chacun de ces spectres est obtenu à partir de composés purs. Ils sont introduits purs dans la chambre d'ionisation tour à tour pour chacun des spectres.

Qu'advient-il d'un mélange de ces deux composés ? La figure 3 montre que le spectre de masse de ce mélange ne représente rien d'autre que l'addition des deux spectres précédents. Nous voyons ici combien l'interprétation du spectre de masse du mélange de ces deux composés devient difficile à interpréter. Naturellement, le spectre d'un mélange complexe, multianalytes, devient rapidement inexploitable. Inexploitable, pas si vite, puisque les techniques de couplages soit chromatographique soit ionique à la MS permettent de relever le déficit.

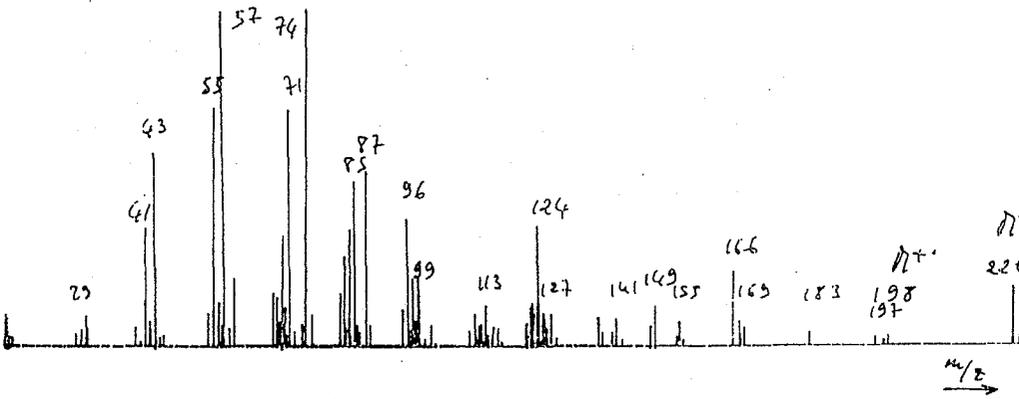
1- METHODES DE COUPLAGE avec la MS

Deux grandes techniques sont à différencier (figure 4) :

- l'une utilise une séparation chromatographique préalablement à l'analyse par MS : c'est le couplage entre la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (LC) et la MS. Ce sont des appareillages relativement accessibles. Le couplage GC-MS actuellement vulgarisé sous le nom de "détecteur de masse" est d'une utilisation tout à fait courante ; il devrait de plus en plus équiper la majorité des laboratoires.

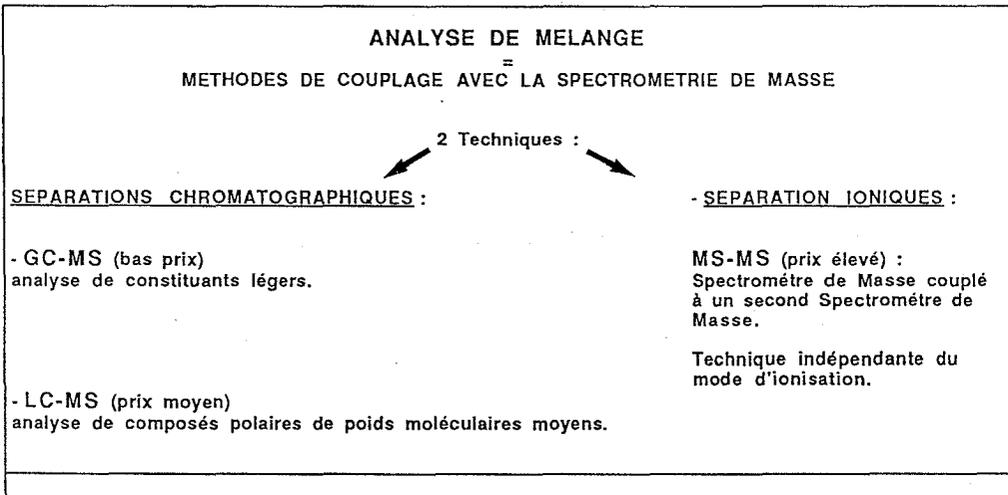
Le couplage LC-MS reste un peu plus complexe, car la phase liquide éluante sous haute pression est incompatible avec la phase gazeuse et le vide du MS : en effet la pression de l'éluant chromatographique une fois vaporisé est très haute ; il a donc fallu équiper les MS de systèmes de pompes performants mais onéreux.

Le prix d'achat de tels systèmes varient entre 400 KF pour la GC-MS à 1,3 MF pour la LC-MS. Disons enfin qu'il est préférable, pour une meilleure rentabilité des techniques, que les appareillages soient spécifiques aux utilisations.



- FIGURE 3 -

Spectre de masse sous EI du mélange de n-hexane et d'undécylénate de méthyle.



-FIGURE 4 -

- L'autre utilise une séparation d'ions (premier MS) préalablement à l'analyse par un second MS : c'est la MS-MS. Le prix d'achat de tel système est onéreux et dépend naturellement du type de géométrie et des gammes de masse des spectromètres ; nous reviendrons sur ce point postérieurement. Disons qu'à moins de 2,4 MF il n'est pas possible de s'équiper. Ajoutons aussi, ceci me paraît primordial, que l'utilisation de la MS-MS demande des spécialistes avertis et que cette classe d'appareillage sort du domaine de la routine.

Passons en revue brièvement ces techniques et examinons quelques exemples de leur utilisation.

A-1) Le couplage chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse [GC - MS].

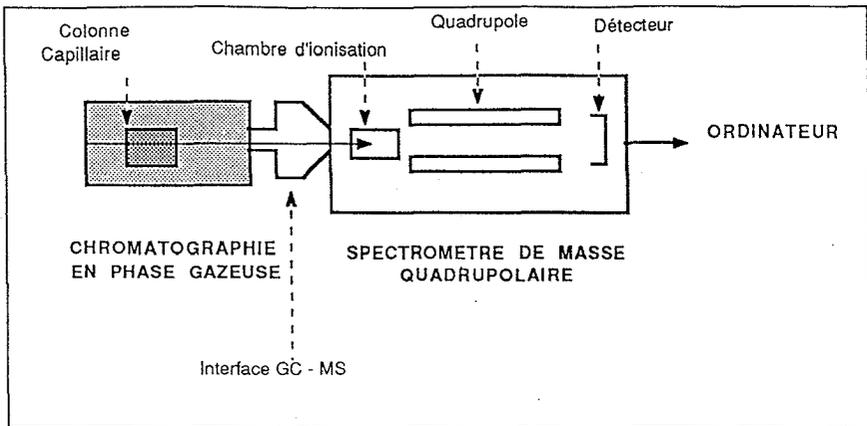
Explicitons le schéma de la figure 5. Un système de chromatographie en phase gazeuse est équipé d'une colonne capillaire (12, 25 ou 50 mètres). L'extrémité de la colonne passe à travers une interface chauffée et débouche dans la chambre d'ionisation. La GC permet la séparation dans le temps d'un mélange en ses composants. Chacune des entités arrivera séparément dans la chambre d'ionisation où elle sera ionisée par bombardement électronique. Les ions créés seront ensuite analysés ^(b). On obtient le spectre de masse de chacune de ces entités.

Nous avons simulé, pour simplifier, le type d'information que l'on obtient pour un mélange de deux produits dans la figure 6. Dans le plan de la figure apparaît le chromatogramme. Nous savons tous que l'information apportée est le dénombrement des constituants du mélange. Mais on ne peut connaître leur structure que si la GC est couplée à la MS ; c'est notre propos. La finalité du couplage est d'obtenir pour chacun des constituants du mélange un spectre de masse, véritable empreinte du produit. A partir de cette empreinte, l'analyste peut proposer une structure et un nom.

Cet outil puissant est d'un extraordinaire secours dans bien des domaines. Citons quelques domaines d'applications : environnement, pharmacocinétique, métabolisme, écophysiologie, agrochimie, agroalimentaire, cosmochimie (sonde Vikings envoya la première analyse des gaz de la planète Mars) etc...

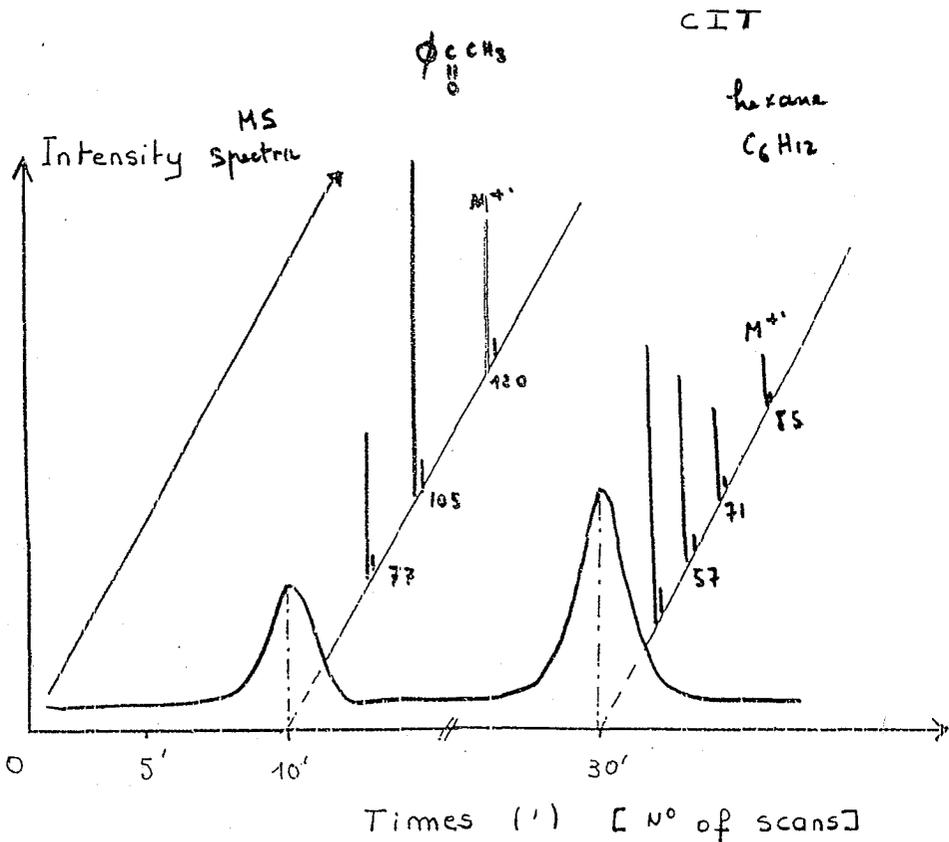
Un exemple du couplage GC-MS dans le domaine de la venimologie est ici proposé : analyse de constituants alcaloïdes dans le venin de fourmis européennes du genre *Monomorium* [CLEMENT (1986), BACOS (1988), LANGE (1989)]. Le contenu de la glande à venin et/ou leur extrait total est injecté en GC-MS. La figure 7 montre les traces des Courants Ioniques Totaux (correspondant à un chromatogramme) pour les ouvrières et les reines. L'analyse des spectres de masse de chacun des cinq constituants des venins est réalisée sous Ionisation Chimique [CI] pour connaître leur masse moléculaire et sous IE pour affiner la structure. La figure 8 montre à titre d'exemple le spectre du constituant principal chez l'ouvrière, la pyrrolidine-2(hexényl-1)-5-(nonényl-1) [PYR1] ; la masse moléculaire est obtenue d'après la masse de la molécule protonée $[M+H]^+$ sous CI (figures 7b et 7c) ; la structure, le cycle pyrrolidine et les deux chaînes

^(b) Sur le schéma est figuré un analyseur quadrupolaire, mais il peut naturellement aussi être magnétique.



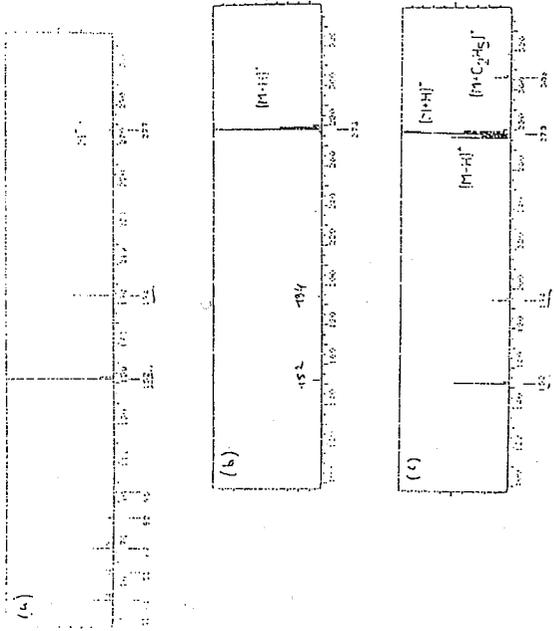
- FIGURE 5 -

Schéma d'un appareil du GC-MS.



- FIGURE 6 -

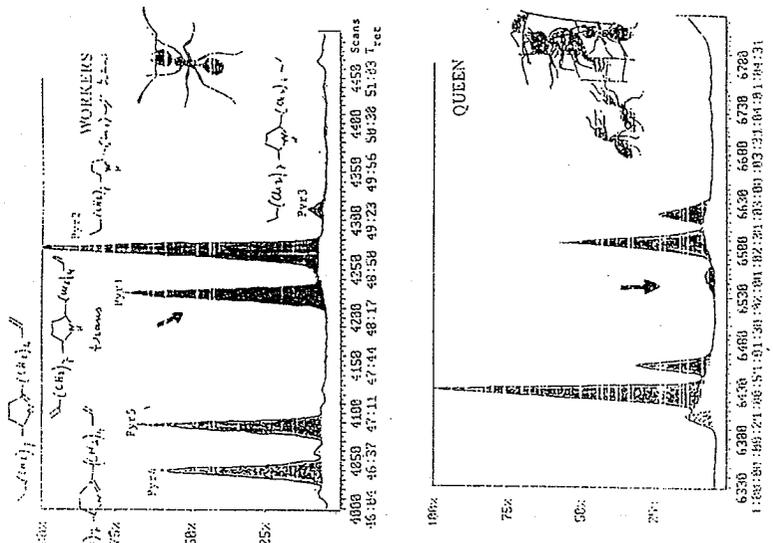
Schéma montrant les informations attendues du couplage GC-MS.



- FIGURE 8 -
 Spectres de masse du principal constituant du venin
Monomorium pyrrolidinc-2- (hexényl-1)-5-(nonényl-1)
 (a) sous EI (70 eV), (b) sous CI avec l'ammoniac,
 (c) sous CI avec le méthane.

Compounds	Isomers	1152/1277	1194/1377
PYR 1	Cis	50	56
PYR 1	Trans	57	21
PYR1	Isomusl	0	20
PYR2	Natural	16	

- FIGURE 9 -
 Détermination de la stéréochimie des deux principaux
 constituants du venin de *Monomorium* en utilisant
 le couplage de la GC avec la MS-MS, les molécules
 étant ionisées sous IC/NH_4^+ - PYR 1 = Pyrrolidinc-2-
 (hexényl-1)-5-(nonényl-1), PYR 2 = Pyrrolidinc-2-
 (hexényl-1)-5-(nonényl-1).



- FIGURE 7 -
 Courants ioniques totaux de venins de fourmis
Monomorium (a) ouvrières, (b) reine,
 obtenus par couplage GC-MS.

latérales hexényl-1 et nonényl-1, provient de l'examen dans le spectre IE des ions fragments diagnostics m/z = 152 et 194 (figure 8a). Les autres constituants sont des pyrrolines substituées par des chaînes alkyles et alkényles [Pyr 4 + Pyr 5].

Un bref retour à la figure 7 montre que la nature des constituants de venins d'ouvrières et de reines est la même. Cependant, il est clair que leur proportion diffère : ainsi la Pyr 1, constituant le plus actif du venin, fort important chez l'ouvrière, n'existe chez la reine qu'à l'état de traces. Ce résultat, pour peu surprenant qu'il soit, s'explique aisément : les reines ne quittant pas le nid, étant nourries et défendues par les ouvrières, n'ont rien à redouter de prédateurs ; elles ne possèdent pas l'arme chimique de défense !

La dernière question était de connaître la stéréochimie des pyrrolidines : les chaînes latérales sont-elles *cis* ou *trans* par rapport au cycle pyrrolidine ? Nous avons résolu cette question par le couplage de la GC à la MS-MS. La comparaison des composés naturels aux isomères de synthèse nous a permis d'attribuer la stéréochimie *trans* (figure 9).

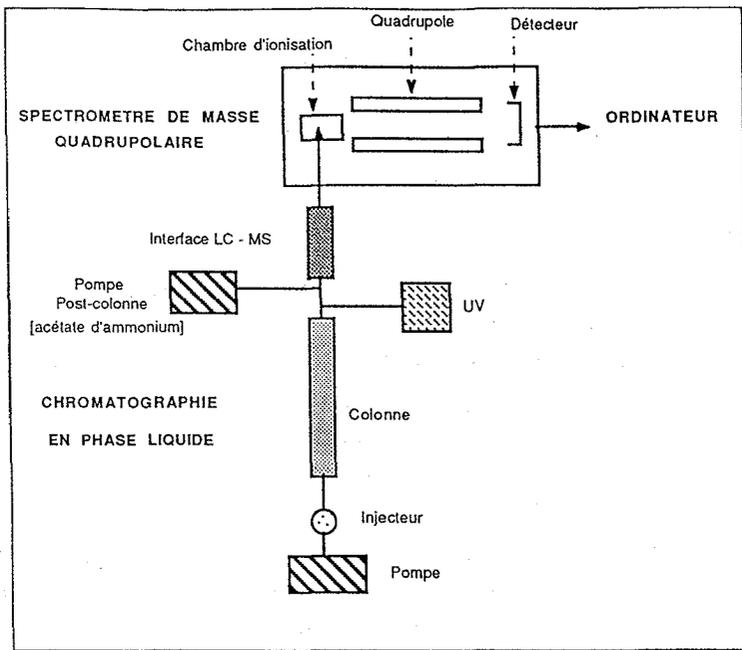
A2) Le couplage chromatographie en phase liquide [HPLC]- Spectrométrie de Masse [LC - MS].

Dès 1978 apparaissent les premiers couplages entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. La principale technique ayant cours actuellement est le "Thermospray" [TPS - MS]. Il s'agit d'un système d'interface permettant la vaporisation et l'ionisation des composés (figure 10). Le système HPLC a un débit de phase mobile comprise entre 10 et 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. La technique du TPS nécessite l'adjonction en post-colonne d'une solution saline généralement l'acétate d'ammonium de force ionique importante [$\sim 0,1$ M] (débit de la solution saline ~ 1 ml/min). La solution d'acétate d'ammonium et l'effluent chromatographique traversent l'interface chauffée avant d'être introduits dans la chambre d'ionisation. De façon succincte, disons qu'un fort courant d'ions, dû au sel et au fort chauffage du vaporisateur, produit l'ionisation des molécules analytes [VESTAL (1983)]

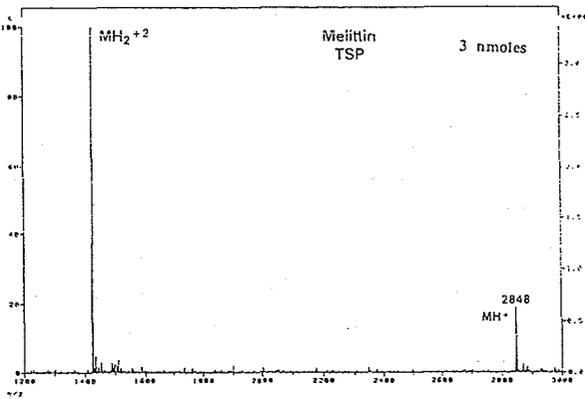
Cette technique est bien adaptée aux biomolécules thermolabiles, par exemple pour des peptides ou protéines de masses moléculaires comprises entre 600 et 4000 daltons. Mais la pauvreté du nombre de spectres de peptides, par TPS est notable par comparaison à l'ensemble des travaux communiqués sur cette technique. Elle serait en partie imputable à la sensibilité de la technique très affectée par : la température de vaporisation, la tension du repousseur d'ions, la composition de la phase mobile, et la force ionique du sel ajouté.

Il est remarquable de noter l'interférence entre la présence des ions MH^+ et celle des ions multichargés $[\text{MH}_2]^{2+}$ ou $[\text{MH}_3]^{3+}$, à la masse demi ou tiers.

Dans le domaine qui nous intéresse, citons le spectre TPS de la Melittine, principal constituant du venin d'abeille *Apis Mellifera* [RUDEWICZ (1988)]. La figure 11 montre le spectre réalisé avec 3 nmoles de Melittine. La molécule doublement protonée c'est à dire doublement chargée à masse moitié est très



- FIGURE 10 -



Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-
 Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-
 Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-amide

- FIGURE 11 -

Spectre de masse de 3 nmoles de Melittine obtenu par couplage LC-TSP-MS [TSQ-70 (Finnigan-Mat)]- : Tsource = 180°C, Tvaporizer = 85°C, Taérosol = 155°C ; Eluant : 80 % méthanol + 20 % acétate d'ammonium [0,1 M] ; débit = 1,2 ml/min. [RUDEWICZ, (1988)].

intense. Les informations obtenues à partir de ces ions permettent d'atteindre le poids moléculaire de la Melittine.

Quelques exemples d'utilisation de la LC-TPS-MS concernent des digestions enzymatiques de peptides [KIM (1984), PILOSOFF (1984), BLACKSTOCK (1988), CHEN (1989), HUANG (1990)].

B- MS - MS

Le couplage entre un Spectromètre de masse (MS_1) et un second appareil de Spectrométrie de masse (MS_2) est connue sous le terme de MS-MS.

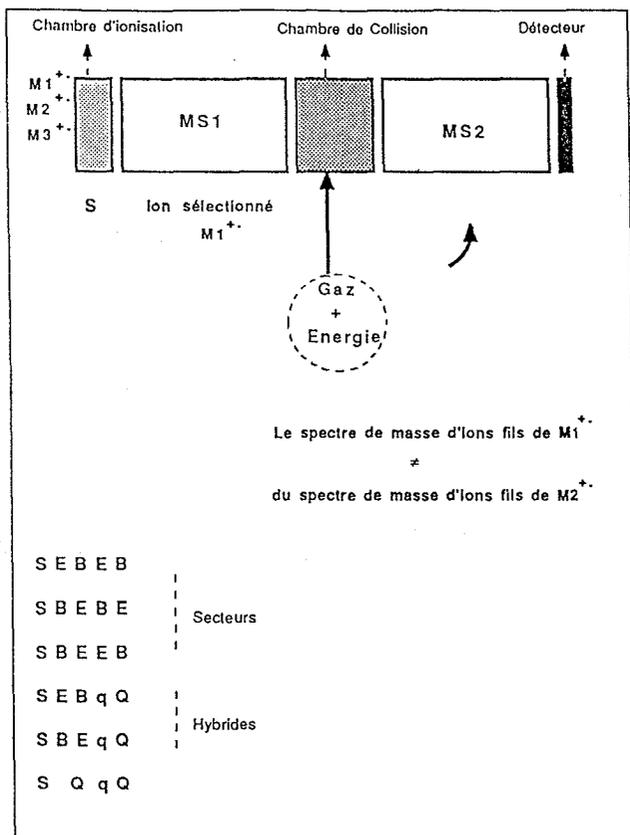
Le principe général schématisé figure 12 est le suivant. Les ions sont créés dans la chambre d'ionisation par bombardement électronique ou par toute autre méthode d'ionisation. L'un deux par exemple M_1^+ est sélectionné, c'est à dire séparé des autres ions, dans le premier appareil de MS ; il est ensuite décomposé par collision avec un gaz inerte (Collision Activated Decomposition [CAD] ou Collision Induced Dissociation [CID]) ; le second appareil de MS analyse tous les ions issus de cette décomposition.

Cette technique est naturellement très utile pour analyser un mélange de produits, s'ils ont des masses moléculaires différentes. Ainsi (figure 12), on analysera trois composés M_1 , M_2 et M_3 à condition de sélectionner les ions M_1^+ , M_2^+ ou M_3^+ successivement dans MS_1 . C'est l'exemple que nous choisirons ci-après. Mais cette technique peut aussi permettre des analyses plus fines de molécules pour mieux accéder à leur structure. Nous avons également vu précédemment (figure 9) la façon dont la MS-MS nous avait permis de différencier des isomères alcaloïdes de venin de fourmi.

La géométrie de ces systèmes MS-MS sont nombreux et tous fort onéreux. On peut avoir des systèmes soit quadropolaires (QqQ), soit à secteurs (EBEB, BEEB, etc...), soit hybrides mêlant une partie à secteur avec une partie quadropolaire (EBqQ, BEqQ).

L'exemple choisi pour illustrer l'usage de la MS-MS est celui d'un tripeptide Tyr-Ala-Phe (NH_2) (figure 13). Ce tripeptide est ionisé dans la chambre d'ionisation par un faisceau d'atomes neutres rapides (technique dite "Bombardement par Atomes rapides" [FAB]) dont nous reparlerons plus loin, mais qui n'est en rien gênant pour notre actuel propos.

Le tripeptide est solubilisé dans une matrice de thiodiéthanol. Le spectre de MS simple (figure 13) ne montre qu'un très faible ion moléculaire à 399 daltons. L'essentiel des ions de ce spectre est représenté par les ions de la matrice thiodiéthanol. C'est un spectre de leur mélange. Notons que les ions de fragmentation du tripeptide, ions permettant d'en connaître la séquence, sont perdus dans le bruit de fond de ce thiodiéthanol. La MS simple ne permet donc pas d'analyser ce tripeptide. En revanche, la MS-MS réalisée en dissolvant le tripeptide dans la même matrice, permet d'isoler les ions appartenant aux peptides de ceux appartenant à la matrice. L'ion MH^+ à 399 daltons du tripeptide est sélectionné dans MS_1 décomposé dans la chambre de collision, et les ions qui en résultent sont analysés dans MS_2 . Il est obtenu le spectre de masse rapporté dans la figure 13b. Nous observons alors combien ce spectre, dit "spectre de masse des ions fils de MH^+ ", se trouve simplifié. Tous les ions présents décrivent le peptide et les ions de la matrice ont été éliminés. Les ions observés permettent de déterminer la structure et la séquence du tripeptide : groupement amide du côté C-terminale (ion $[MH-NH_3]^+$), séquence Tyr-Ala-Phe par



- FIGURE 12 -

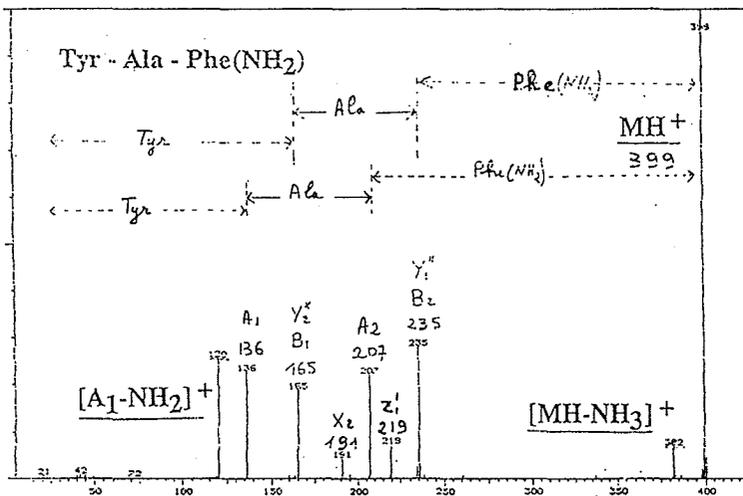
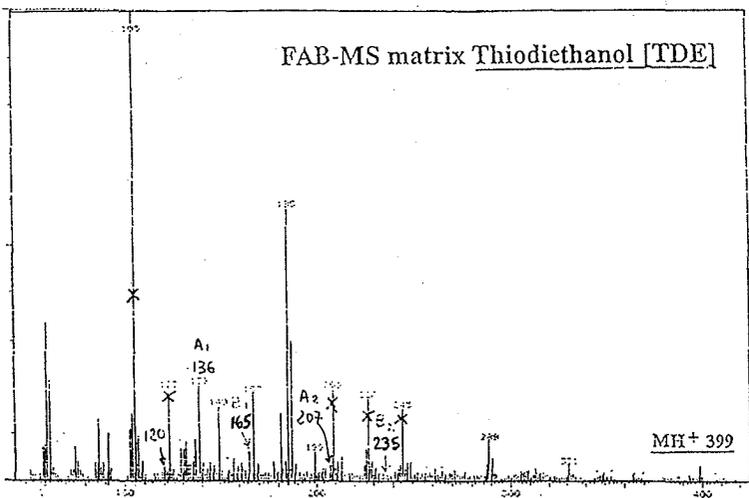
Principe de la MS-MS.

**ANALYSES DE COMPOSES POLAIRES,
THERMOLABILES ET DE HAUTS POIDS
MOLECULAIRES.**

METHODES RECENTES DE DESORPTION-IONISATION ^(a) :

- Plasma Desorption [PD-MS]
- Electrospray Ionization [ESI],
- Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry [L-SIMS],
- Fast Atom Bombardement Mass Spectrometry [FAB-MS].

^(a) Ces sigles et leur dénomination sont ici exprimés en langue anglaise par soucis d'homogénéité avec la littérature mondiale et pour faciliter la lecture d'articles en Spectrométrie de Masse.



- FIGURE 13 -

Spectres de masse, sous ionisation FAB ($<Xc> = 8 \text{ KeV}$, $200 \mu\text{A}$, matrice thiodiéthanol), d'un tripeptide-amide Tyr-Ala-Phe(NH₂) - (a) Spectre de masse simple, (b) Spectre de MS-MS : spectre des ions fils de la molécule protonée.

observation des ions A_1 , A_2 , B_1 dont les charges résident sur la partie N-terminale et Y_2 , Y_1 , X_2 , Z_1 dont les charges résident sur la partie C-terminale.

Nous avons vu sur cet exemple que seul l'usage de la MS-MS a permis de trier les ions du tripeptide de ceux du thiodiéthanol et d'obtenir la structure du premier composé.

La MS-MS sera utilisée tout autant que la MS simple au cours des exemples qui suivent.

2 - METHODES D'ANALYSES DE COMPOSES POLAIRES, THERMOLABILES ET DE HAUT POIDS MOLECULAIRE

L'évolution des méthodes de désorption-ionisation a récemment permis l'analyse de composés jusque là inaccessibles à la Spectrométrie de Masse. En effet les composés polaires sont fortement thermolabiles et nécessitent une ionisation préalable à l'évaporation des ions en phase gazeuse. De même l'obtention de masse moléculaire pour les composés de haut poids moléculaire ne fut possible que grâce à la création de nouvelles et puissantes techniques de désorption. La recherche continue menée par les physiciens dans ce domaine permet actuellement l'analyse de constituants biologiques. La figure 14 résume l'ensemble des techniques les plus habituellement utilisées. Nous allons les expliciter et répertorier un bon nombre d'exemples dépassant même le domaine de la Venimologie puisque la MS a été peu utilisée.

Classons ces techniques par l'énergie qu'elles mettent en jeu : dans le domaine de la dizaine de KeV, se situent le bombardement par particules rapides [FAB] et la spectrométrie de masse des ions secondaires [SIMS] ; la désorption par plasma [PD-MS] utilise une zone d'énergie de quelques MeV. Enfin, l'ionisation par embrun d'ions [Electrospray ou ESI] utilise un tout autre processus d'ionisation sur lequel naturellement nous reviendrons.

A l'heure actuelle, la technique d'avenir pour accéder aux masses moléculaires est sans aucun doute la ESI-MS. En revanche, pour la structure de constituants de poids moléculaire compris entre 600 et 3000 daltons, la FAB-MS ou la SIMS restent les outils de choix.

Disons également en introduction que ces méthodes de désorption ne sont pas toujours facile à utiliser ; ce ne sont pas des techniques de routine.

On peut adapter la FAB, la SIMS ou l'ESI aux spectromètres classiques, mais leurs prix restent élevés et compris entre 200 et 500 MF. Il en va tout autrement pour la Plasma Désorption qui requiert exclusivement un appareil à temps de vol [TOF] comme spectromètre. Cet ensemble est d'un coût moyen, proche du prix d'un GC-MS. Cependant la masse moléculaire est la seule information obtenue.

(c) Divers gaz inertes, généralement les gaz rares, peuvent être utilisés Leur efficacité croît dans l'ordre : Ar < Kr < Xe.

Bombardement par des Atomes Rapides [FAB-MS]

Le canon générant des atomes neutres rapides peut être de diverses technologies [BARBER (1981,1982.), WILLIAMS (1981,1982), DEVIENNE (1982,1983), RINEHART (1983)]. Pour simplifier, disons qu'un gaz inerte^(c), le Xénon par exemple, est ionisé puis accéléré sous 8 à 10 KVolts ; les ions Xe⁺ rapides formés sont déchargés dans le gaz neutre et lent pour donner des atomes rapides (figure 15).

Les atomes neutres rapides focalisés sur l'analyte, dissous dans une matrice liquide et dispersé à la surface d'une cible, produisent la désorption d'ions moléculaires et de fragments. Ceux-ci sont ensuite analysés par le spectromètre de masse.

L'optimisation de l'échantillonnage bien exposé par MARTIN (1982) et COSTELLO (1986), requiert le choix d'une matrice adéquate. Sur la cible sont placés 0,5 à 1 µl d'une solution d'analyte mélangé avec 2 à 3 µl de matrice liquide. La zone de détection est comprise entre 100 picomole et 1 nanomole dans le meilleur des cas.

Le choix de la matrice est délicat. Disons tout de suite qu'il n'existe aucune règle générale. Le plus souvent, on opère coup par coup, et que bien des produits défont ce que l'on pensait être le fruit d'un ébauche de théorie! La mobilité du soluté est responsable de sa migration à la surface de la matrice. La viscosité de cette matrice serait donc un facteur important pour la FAB, tout autant que le serait une basse pression de vapeur. L'addition à la matrice de cosolvants volatils peut ou non aider à la dissolution. Les problèmes sont nombreux et variés qui diminuent les intensités des ions de l'analyte : précipitation de l'analyte, diminution trop rapide de la quantité de matrice par évaporation sous vide. N'oublions pas le risque de contamination de la chambre d'ionisation, ni l'inertie chimique de la matrice vis à vis de l'analyte.

Un des premiers exemples de haut poids moléculaire fut obtenu avec l'insuline [BARBER (1984)].

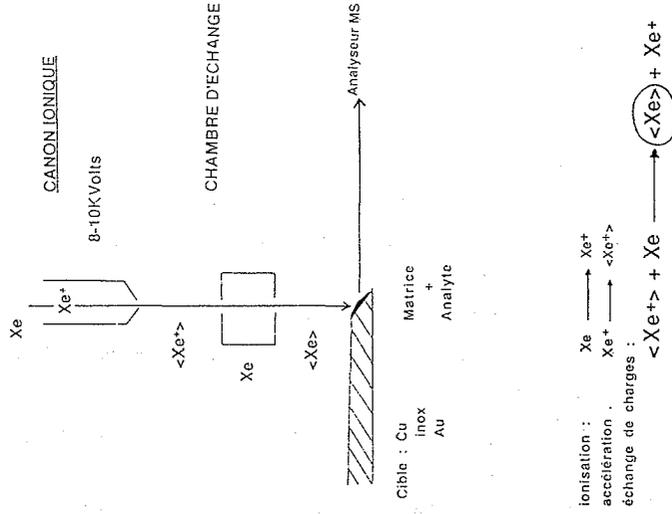
Depuis 1983, il fut mis en oeuvre un couplage entre la LC et la FAB-MS pour analyser des digestions enzymatiques de protéines. Cette technique connue sous le nom de FAB-MS en flux continu, CF-FAB-MS, est dû à CAPRIOLI [SMITH et CAPRIOLI (1983)]. Une revue générale examine toutes les utilisations possibles de la CF-FAB-MS [CAPRIOLI (1987)]. Les domaines d'utilisation sont essentiellement celui des peptides et protéines [CAPRIOLI (1986,1987,1988), SMITH (1983,1984), SEIFERT (1989), BELL (1990), MOSELEY (1989)], mais aussi des mononucléotides [BERTRAND (1989)], des glucosinolates [KOKKONEN (1989)], etc...

Spectrométrie de Masse des Ions Secondaires [SIMS]

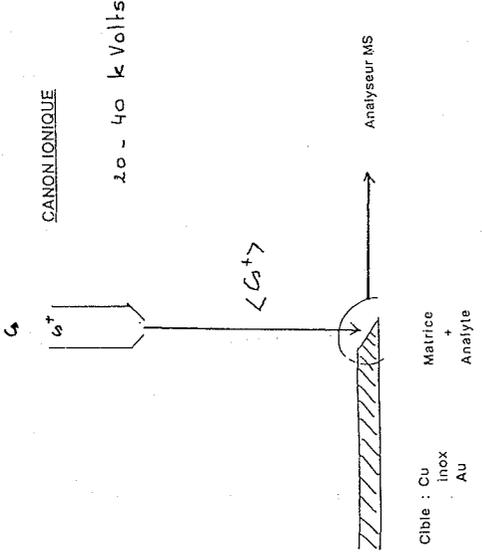
Historiquement, cette technique est plus ancienne que la FAB-MS.

Un canon à Césium génère des ions Cs⁺ rapides d'énergie cinétique d'environ 25 KeV (figure 16). Ces ions rapides en frappant une cible où se trouve l'échantillon produisent, outre la

FAST ATOM BOMBARDMENT



- FIGURE 15 -
Schéma du Canon FAB.



- FIGURE 16 -
Schéma du canon à Césium de la L-SIMS.

désorption d'ions moléculaires, des ions secondaires fragments caractéristiques de l'analyte. L'ensemble de ces ions sont analysés par le spectromètre de masse. Au tout début de la découverte par BENNIGOVEN (1976), les échantillons étaient des matériaux solides. La figure 17 montre que la plus spectaculaire désorption dans le domaine biologique fut celle d'une fine lamelle de champignon ; le spectre de masse obtenu était celui de la muscarine [COTTER(1988)].

La limite de cette technique rendait impossible l'analyse de les composés peptidiques ou autres biomolécules. Le développement de la FAB-MS a permis de mettre à profit la solubilisation des analytes dans une matrice liquide adéquate. Finalement la technique actuellement développée est la liquide SIMS [L-SIMS]. Adaptée sur tous les spectromètres, elle permet d'ioniser des molécules de plus hauts poids moléculaires que ne le permet la FAB-MS. La L-SIMS met à profit la même méthodologie pour la préparation des échantillons que la FAB. Les choix de la matrice sont tout aussi délicats. C'est pourquoi nous traiterons ensemble FAB et L-SIMS.

Utilisation de la FAB-MS, la CF-FAB-MS et la L-SIMS

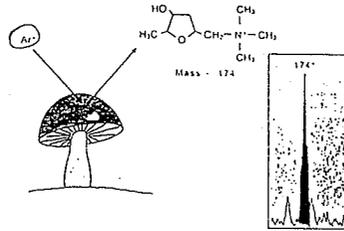
Ces précisions techniques quant à la génération des particules rapides étant traitées, il nous a paru bon de voir qu'elles étaient les répercussions de ces deux modes d'ionisation particulière sur les grandes classes d'ionisation. Ces remarques préalables nous amènent à discuter des types d'ionisation attendus en FAB : réactions de protonation en ions positifs ou de déprotonation en ions négatifs, désorption directe d'ions préformés pour les sels, formation d'ions adduits avec des sels (cationisation) ou la matrice, des réactions intermoléculaires comme la dérivatisation ou encore les réactions enzymatiques *in situ* pour les protéines ou les sucres.

Les principaux problèmes concernant les peptides ou les protéines capable d'être résolus par la FAB-MS ou par la L-SIMS indifféremment, peuvent ainsi être répertoriés :

- 1 - Contrôle et analyse de séquence en amino acides ;
- 2 - Détermination de changement induit par mutation dans la protéine ;
- 3 - Caractérisation et/ou localisation de modifications transcriptionnelles ; parties N-terminale ou C-terminale bloquées, alkylations, carboxylations, phosphorylations, glycosylations, etc...
- 4 - Localisation de ponts disulfures ;
- 5 - Séquençage de cyclopeptides.

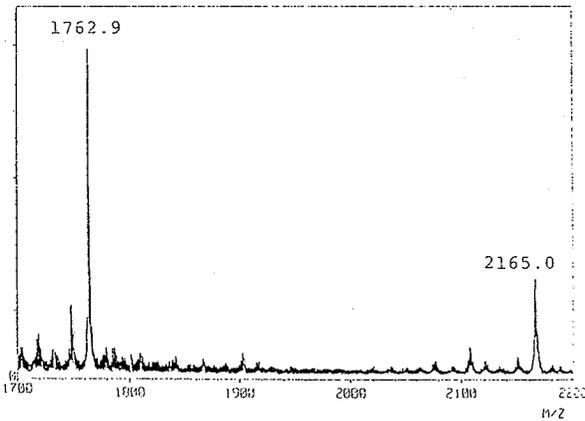
Il reste bien évident que le séquençage au moyen de la spectrométrie de masse est particulièrement adapté aux cas où le micro-séquençage est inefficace.

Dans le domaine des protéines, un grand nombre de revues ou articles généraux ont traité de la FAB-MS et de la L-SIMS [BIEMAN (1987,1988,1989), JOHNSON (1987,1988), MARTIN (1987), HUNT (1986)]. Le séquençage automatique de fragments de digestion enzymatique et de peptides de quelques dix résidus se fait de plus en plus grâce à des programmes informatiques spécialement conçus



- FIGURE 17 -

Spectre SIMS de la muscarine par ionisation directe d'une lamelle de champignon [COTTER (1988)].



- FIGURE 18 -

Spectre FAB d'une fraction de digestion tryptique de Thioredoxine [BIEMANN (1987)].

190
[ISHIKAWA (1986,1988,1989), JOHNSON (1989), LANGE (1989)]. Notons que les résultats sont à considérer avec la prudence d'usage.

a - Contrôle et analyse de séquence en amino acides :

Lors de digestion trypsique de Thioredoxine, toxine produite par *Chromatium vinosum*, une fraction est examinée par FAB-MS (figure 18). On y trouve deux ions MH^+ à $m/z = 1762$ et 2165 uma. Cette fraction est un mélange de deux fragments tryptiques de masses moléculaires de 1761 et 2164 daltons [BIEMAN (1987)].

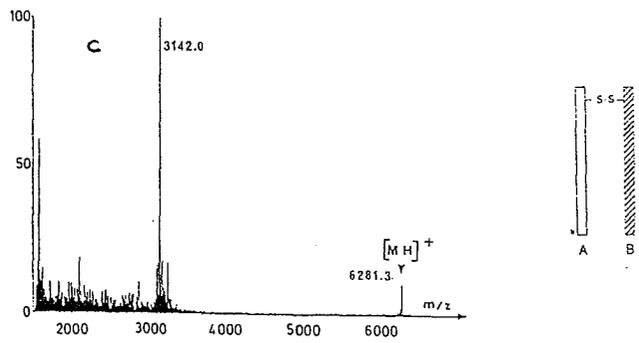
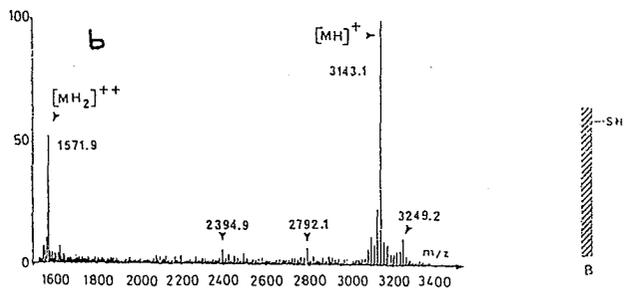
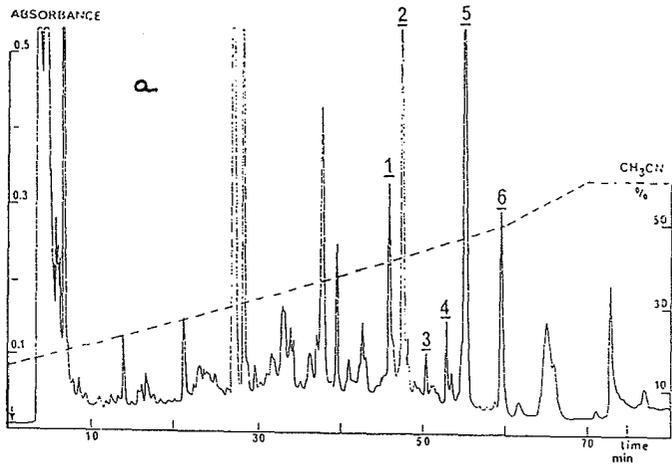
La séquence d'une protéine issue du Corpora cardica du *Locusta migratoria* a été réalisée après séparation des divers composants protéiques de cet organe par RP-HPLC (figure 19a). Le spectre de masse FAB de la fraction 4 (figure 19b) montre deux ions principaux MH^+ à 3143 et $[MH_2]^{2+}$ à 1572 . Leur examen permet de conclure à la présence d'un monomère peptidique renfermant un résidu Cys libre. Le spectre de masse de la fraction 6 (figure 19c) présente deux ions MH^+ à 6281 et $[MH_2]^{2+}$ à 3142 permettant de conclure à un hétérodimère formé par deux unités liées entre elles par un pont disulfure [HIETTER (1989), GADE (1986)]. Les protéines de la cuticule de criquets *Schistocerca gregaria* [GADE (1987)] et *Locusta migratoria* [ROEPSTORFF (1985)] ont également fait l'objet d'analyses par FAB-MS.

Pour contrôler les diverses étapes de synthèse peptidique, la FAB est le meilleur outil puisque les résidus N- ou C-terminaux sont souvent bloqués. Les dérivés BOC(N-terminaux) sont aisément reconnus par la présence d'ions $[MH-90]^+$ et $[MH-56]^+$. Les dérivés Bzl(C-terminaux) sont identifiables grâce aux ions $[MH-100]^+$ [BATHELT (1987), PERICH (1988), HE (1988)].

Des séquences de neuropeptides [DAS (1989)], la correction de la séquence protéique de dérivés c-DNA de SBP (Spermine binding protein) chez le rat [ANDEREGG (1988)], l'analyse de squelette de peptides modifiés par des groupements thiométhylène, thioamide, méthylèneamine et thiométhylènesulfoxide [DETERNING (1990)] ont été réalisées. La FAB-MS-MS fut utilisée pour la séquence d'une endorphine [TOMER (1988)] ou de petits peptides grâce aux instruments hybrides [SCHEY (1989)].

b - Caractérisation et/ou localisation de modifications transcriptionnelles.

b1- Résidus aux extrémités N- ou C-terminales bloquées : Ce problème de séquence ne peut être levé au moyen d'un microséquenceur. La spectrométrie de masse s'avère donc indispensable. Il est toutefois différent du contrôle en synthèse peptidique. Une Trichorzianine AVII issue d'un champignon pathogène *Trichoderma harzianum* est analysé par MS [LANGE (1989)]. D'après la composition en amino acides, nous savons que la partie N-terminale est acétylée, que le carboxyle C-terminal est remplacé par un alcool et qu'il existe des résidus non naturels Aib (acide isobutyrique). La figure 20 montre son spectre de masse : la masse moléculaire à 1922 provient des ions MH^+ à $m/z = 1923$ et $[M+Na]^+$ à $m/z = 1945$. Comme le montre ce spectre et des études complètes faites par MS-MS, ce peptide se coupe



- FIGURE 19 -
 Analyse par FAB-MS de deux protéines issues du Corpora cardiaca du *Locusta migratoria*
 (a) RP-HPLC [Vydac-C18, 15 % CH_3CN -TFA 1 % à 60 % CH_3CN -TFA 1 %, en 75 secondes].
 (b) Spectre FAB de la fraction 4. (c) Spectre FAB de la fraction 6. [HIETER (1989)]

sélectivement au niveau de la Pro centrale en donnant deux ions l'un 802 avec rétention de la charge sur la partie C-terminale, l'autre 1122 avec rétention de la charge sur la partie N-terminale. Chacun de ces ions intermédiaires se fragmentent à leur tour pour donner la séquence de chacune des parties.

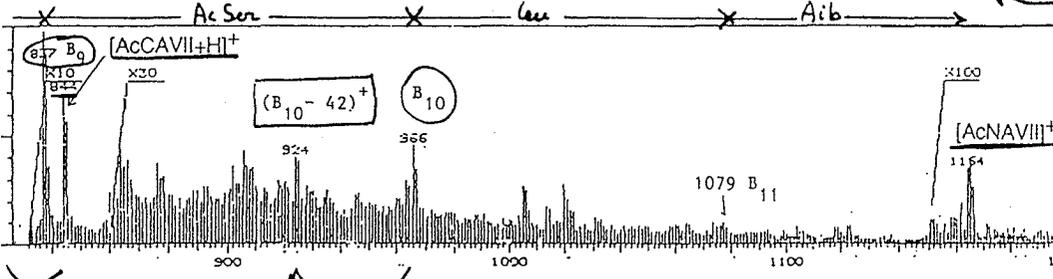
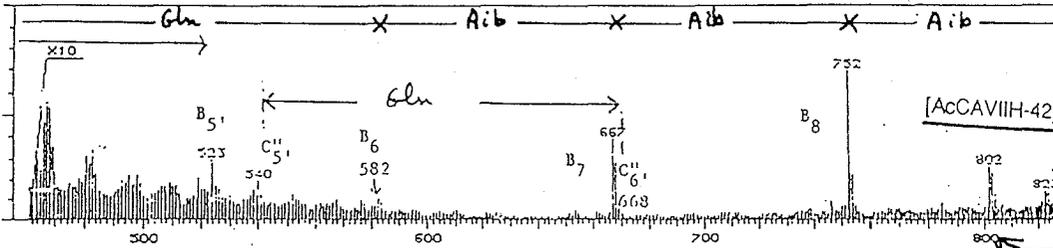
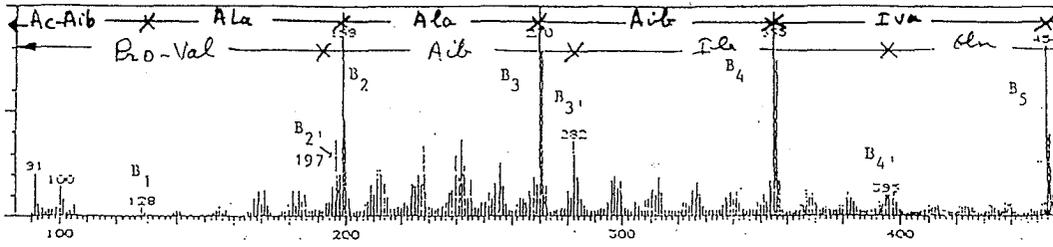
b2- Alkylation de certains résidus : L'exemple proposé concerne une double acétylation de divers résidus de la précédente Trichorzianine AVII. Son spectre de masse est présenté figure 21. L'ion moléculaire n'est pas obtenu car il dépasse la gamme du spectromètre utilisé. En revanche les deux ions, correspondants à la coupure sélective au niveau de la Pro centrale, sont déplacés à 844 (rétention de la charge sur la partie C-terminale) et 1164 (rétention de la charge sur la partie N-terminale). Ceci implique que chacune de ces parties est acétylée. Pour la partie C-terminale, l'ion 844 perd 42 uma ($m/z = 802$), puis présente de ions de séquence identique à ceux de la figure 20. Cette partie C-terminale est donc acétylée sur le Phéol terminal. Pour la partie N-terminale, l'ion 1164 perd d'abord un résidu Aib, puis un résidu Leu pour donner l'ion à $m/z = 966$ (B10). Ce dernier perd à son tour 42 uma, puis les ions de séquence sont ceux observés figure 19. La partie N-terminale est donc acétylée sur la Ser. Nous avons conclu à deux sites d'acétylation de la Trichorzianine AVII : Ser (10) et Phéol terminal [LANGE (1989)].

b3 - Phosphorylation : Les phosphorylations ne peuvent avoir lieu que sur des amino acides porteurs d'un groupement hydroxy, c'est à dire la Ser, la Thr ou la Tyr. Dans la séquence ces résidus sont déplacés de 80 uma (HPO_3). Tant que l'enchaînement est normal, la séquence fait intervenir des pertes successives correspondant à la masse du résidu. Mais quand un des trois résidus est phosphorylé, la perte d'un résidu phosphorylé correspond à sa masse + 80. Voyons quelques exemples.

La figure 22 montre le spectre de masse d'une Kempfide phosphorylée réalisé avec la L-SIMS (Cs^+). Tant en ions positifs que négatifs, on observe d'abord une perte de Gly puis Leu, puis d'un résidu correspondant à la masse d'une Sérine phosphorylée [Ser(P)] [GILSON (1987)].

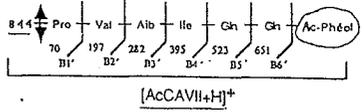
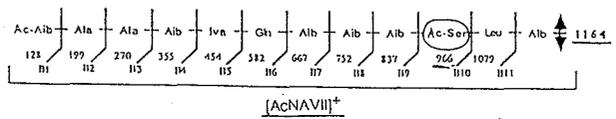
Un autre exemple [GILSON (1987)] montre la différence entre les spectres de masse de peptides tryptiques d'une glycogène synthétase d'un animal traité à l'adrénaline (figure 23a) ou au propranolol (figure 23b). Nous remarquons que les deux ions majoritaires (2827 et 2713) dans le traitement à l'adrénaline deviennent minoritaires dans le traitement au propranolol. Inversement les ions minoritaires dans le traitement avec l'adrénaline deviennent majoritaires dans le traitement avec le propranolol. Dans le but de localiser le site de phosphorylation, il a été effectué un spectre de MS-MS dit spectre des ions fils de l'ion à 2712 dans le mélange tryptique d'animaux traités au propranolol (figure 23c). A partir de la molécule protonée, on observe la perte de Ser libre suivie de la perte d'Asn, puis ensuite la perte d'un résidu dont la masse correspond à celle d'une Ser(P). Il a donc été possible de localiser pour ce fragment tryptique le site de phosphorylation : la Ser, troisième résidu depuis le C-terminal. Cette localisation a également été effectuée de la même façon pour les autres ions du mélange. D'autres travaux sur la phosphorylation de résidus sont dus à CARR (1984).

Souvent la masse moléculaire des protéines est trop élevée. Aussi a-t-on recours à la stratégie suivante : la protéine est coupée en un mélange de peptides sous l'action d'endopeptidases ;



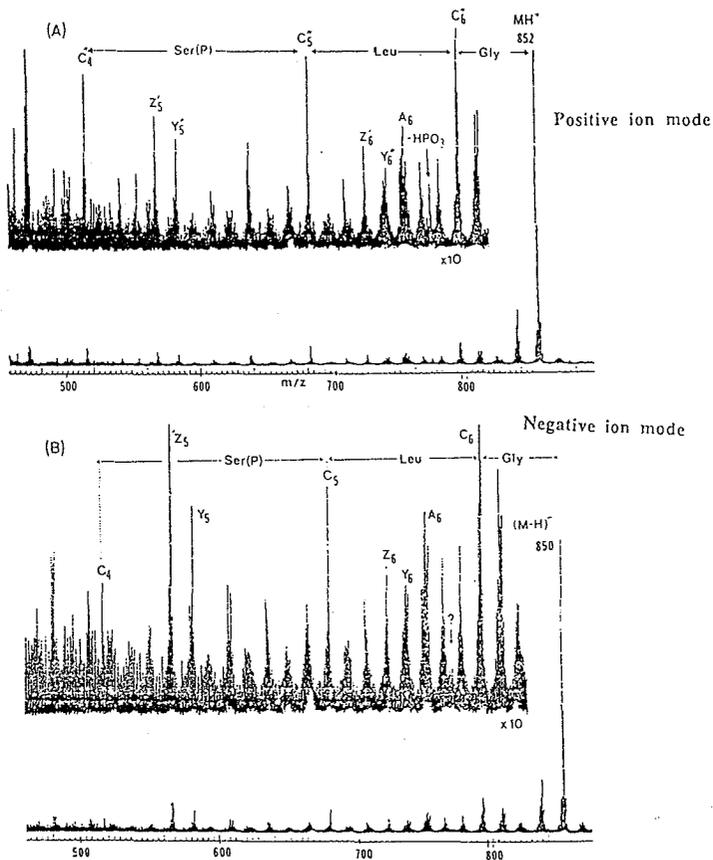
-CH₂=C=O

-CH₂=C=O



- FIGURE 21 -

Spectre de masse FAB de la Trichorzianine A VII acétylée [$\langle X \rangle$ 8 KeV, 200 μ A, thiodiéthanol].

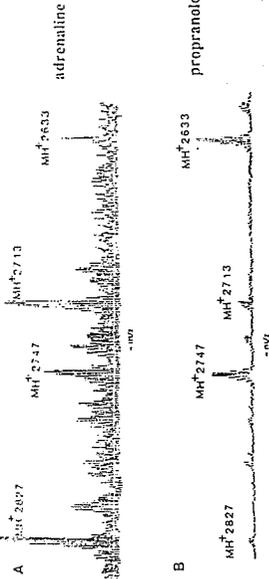


- FIGURE 22 -

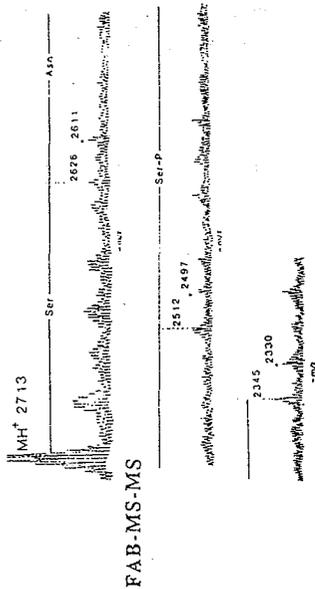
Spectres de masse L-SIMS (C_s^+) en ions positifs et négatifs d'une kemptide phosphorylée [GILSON (1987)].

treatment of animals with

FAB - MS

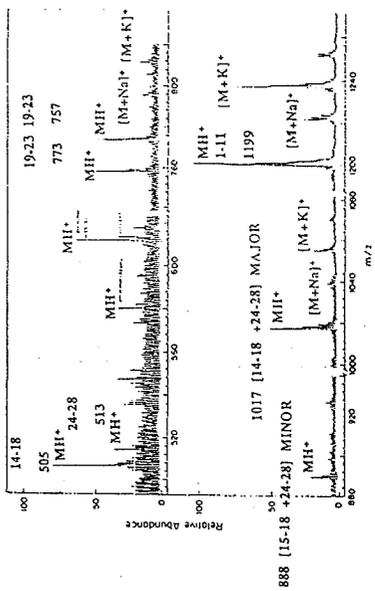
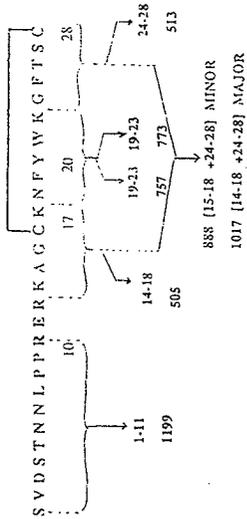


Phosphorylated C-terminal glycoen synthase tryptic peptide
from propranolol treated animals.



- FIGURE 23 -

Spectres de masse FAB de fragments tryptiques d'une glycoen synthetase :
(a, b) spectres de masse conventionnels, (c) spectre des ions
fils de l'ion MH^+ à 2713 du melange (b) [GILSON (1987)].



- FIGURE 24 -

Spectre FAB-MS d'une Somatostatine-28 digeree
par la trypsin [DIXON (1987)].

chaque morceau est analysé par MS ; s'il est trop difficilement séquençable ou si sa masse est encore trop haute, une digestion par une exopeptidase est souvent réalisée peut être envisagée.

DIXON (1987) propose un examen de modifications transcriptionnelles pour un neuropeptide, la Somatostatine-28. La figure 24 montre le spectre de masse FAB d'une digestion trypsique de la somatostatine-28. Seuls figurent les ions moléculaires (MH^+) des fragments digérés qu'ils soient en quantités majoritaires ou minoritaires.

Des digestions par la carboxypeptidase-Y furent faites sur la Somatostatine au moyen de la CF-FAB-MS. Elle permet d'observer les divers résidus clivés depuis la partie C-terminale. Il a été également réalisé un spectre d'ions fils d'un des fragments précédents à $m/z = 1201$ pour assigner la structure du peptide non clivé par la carboxypeptidase-Y [PROME (1989)].

Enfin au sujet des protéines disons qu'un grand nombre de modifications transcriptionnelles a été examiné. Elles mettent en jeu les techniques de clivage enzymatique suivies de FAB-MS ou de L-SIMS, de CF-FAB-MS et très souvent de la MS-MS. Une grande partie de ces travaux est due en France à l'équipe PROME. Ils concernent les modifications transcriptionnelles de l'hémoglobine [PROME (1987,1988,1989)].

D'autres classes de composés biologiques furent analysés par FAB-MS ou par L-SIMS. Des phospholipides donnent d'excellentes informations sur la nature des chaînes saturées ou insaturées, mais tout particulièrement sur la chaîne polaire chargée. ces spectres d'ions positifs et négatifs sont complémentaires. Une analyse directe de lipides (phosphatidylcholines) à partir du bombardement SIMS de myéline de cerveau de rat fût récemment rapportée [FENSELAU (1989)]. Les informations obtenues en ions positifs et négatifs sont naturellement complémentaires.

L'ionisation par FAB des carbohydrates fournit, outre la masse moléculaire (en général $[M+Na]^+$ est obtenu à l'exclusion de MH^+), des fragments séquentiels du glycoside [DELL (1988)]. Les glycoprotéines restent de beaucoup les plus difficiles à étudier. POULTER (1988) utilisa la L-SIMS (Cs^+) pour l'étude de glycoprotéines intactes. Les glycosides (lipides glucoconjugués) sont difficiles à ioniser directement à cause de la fragilité de la liaison glycosidique. Dans bien des cas cependant, après hydrolyse, chacune des parties peptidiques et glycosidiques est analysée séparément [MULLER et DOMON (1989)].

Plasma - Désorption -MS [TOF]

Les premiers articles utilisant à des fins biologiques la PD-MS furent ceux de SUNQVIST (1983), HAKANSSON (1983), et CHAIT (1983).

La désorption par plasma [PD-MS] qui utilise les fragments de fission de la désintégration spontanée du Californium-252 pour ioniser et désorber de grosses molécules biologiques, s'est révélée être un puissant outil analytique dans le domaine de la chimie des protéines. C'est une excellente méthode de détermination directe de la masse moléculaire avec plus de précision que les

méthodes classiques comme la chromatographie de perméation de gel ou l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Le principe de la PD-MS est illustré figure 25. L'échantillon est placé sur une feuille de mylar ou est adsorbé sur de la nitrocellulose. Il est placé dans l'enceinte sous vide d'un appareil de masse à temps de vol [TOF], différent de ceux déjà vus. Cet appareil mesure le temps mis par les ions pour aller jusqu'au détecteur ; c'est à dire que le temps de parcours des ions est globalement proportionnel à leur masse. Avec ce type de spectromètre, l'analyse de composés de très hauts poids moléculaires est rendu possible. Revenons à notre échantillon. Le ^{252}Cf se désintègre en deux particules éjectées en sens opposé : l'une traverse à forte énergie cinétique l'échantillon en désorbant des ions moléculaires ; l'autre va heurter un détecteur en déclenchant ainsi le début du balayage du TOF. Les ions créés sont accélérés puis détectés. Le temps mis par les ions pour parcourir le TOF est ensuite converti en unité de masse atomique au moyen d'un calculateur. On obtient un spectre de masse. En fait ce spectre donne une information exclusivement sur la masse moléculaire : des ions multichargés $[\text{M}+\text{nH}]^{n+}$ avec $n = 1 \text{ à } 3$.

Quelques exemples sont trouvés dans le domaine de la Venimologie. Le premier travail dû à HAKANSSON (1983) n'utilise pas encore les fragments de fission du ^{252}Cf comme particules lourdes, mais ceux résultant de la fission du ^{127}I (90MeV). Il s'agit de la détermination de la masse moléculaire d'une neurotoxine de venin de Cobra, *Naja naja siamensis*. C'est une toxine de 71 résidus amino acides contenant 5 ponts disulfures. Sa masse moléculaire est 7851 ± 14 daltons si l'on observe le spectre d'ions positifs et de 7861 ± 14 d en observant le spectre d'ions négatifs. La précision bien que très supérieure aux techniques classiques, s'affinera dans le temps, notamment au fur et à mesure de l'augmentation de la résolution du spectromètre. Les spectres PD-MS sont portés en figure 26.

Le spectre d'ions positifs de protéine II-1 du venin de serpent Tigre australien permet d'évaluer la masse moléculaire à 13309 daltons [SUNQVIST (1984)].

Une étude de Méliittine de synthèse est due à CHOWDHURY (1989). Une fraction issue de purification par RP-HPLC de méliittine de synthèse est soumise à la désorption PD-MS. Cette fraction supposée pure est en réalité un mélange de deux constituants peptidiques distincts comme le prouve le spectre de masse (figure 27a) : deux ions mono-chargés et deux ions doublement-chargés. L'impureté aurait une masse de 28 uma plus élevée que celle de la méliittine. Ce mélange a été soumis à une digestion par la trypsine. Le spectre de masse résultant (figure 27b) montre, outre les ions moléculaires mono et bi-chargés des molécules intactes, les masses moléculaires des fragments de digestion, fragments tous dédoublés par la présence de l'impureté. Ces dédoublés sont probablement imputables à la présence d'une impureté d'un résidu lors de la synthèse.

Un dernier exemple est celui emprunté à l'ionisation de fragments synthétiques de l'-neurotoxine de Cobra, *Naja nigricollis* [LAM-THANH (1990)].

Quittons le domaine des venins, en remarquant toutefois qu'une seule étude, réalisée en 1983, a été faite sur un constituant naturel. De nombreux travaux ont été réalisés dans le domaine des

protéines cuticulaires de *Locusta migratoria* [ROEPSTORFF (1986), KLARSKOV (1989)], des triglycérides et des cires [SHOWELL (1989)], des enzymes [LACEY (1989)]. Enfin, il est noté que des cinétiques enzymatiques lors de digestions de protéines peuvent être suivies sans altération de l'échantillon [ROEPSTORFF (1988), KLARSKOV (1989)].

Pour conclure, l'exemple de l' α -lactalbumine mérite d'être cité étant donné ses répercussions biologiques [SILLY (1988)]. La figure 28a montre le spectre PD-MS de 1,7 nanomoles de α -lactalbumine déposées sur nitrocellulose : des ions mono, bi et tri-chargés permettent de conclure à la masse moléculaire de 14176 daltons. Les largeurs des ions à mi-hauteur dans les spectres de PD-MS à divers pH sont différents. Elles sont portées figure 28b. Un minimum de largeur est commun à ces trois ions. Il permet de déterminer que le point isoélectrique de la protéine est de 5, valeur comparable aux mesures classiquement faites.

Enfin pour clore ce sujet nous dirons que les analyses de protéines sont nombreuses et sont explicitées dans les autres références citées.

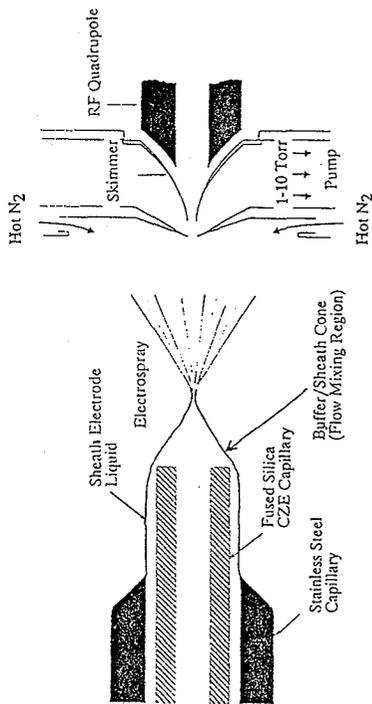
L'IONISATION PAR ELECTROSPRAY [ESI-MS]

Cette méthode ancienne, due à M.DOLE (1960), a retrouvé très récemment tout son intérêt. L'ESI-MS est une méthode douce d'ionisation capable de produire des ions multichargés pour les grosses molécules. Ce phénomène d'ions multichargés $[M + nH]^{n+}$ rend accessible des masses moléculaires élevées dans la zone d'utilisation des spectromètre de masse. Par exemple une molécule biologique de 40000 daltons chargée 40 fois sera visible sur le spectre à la masse 1000, domaine parfaitement utilisable sur un appareil quadrupolaire classique.

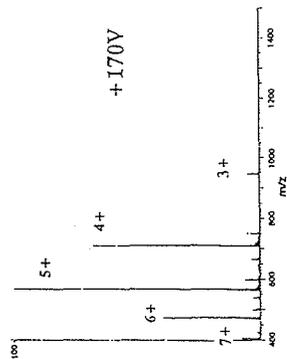
Brièvement, la source ESI (figure 29) consiste en tube capillaire en silice fondue entrant dans un tube en acier affiné à son extrémité. Un tube de jonction à haut voltage vient au contact du tube métallique. Le contact électrique de la solution se fait par un électrolyte liquide. Les voltages de l'ESI varient entre + 5,5 et 6 KVolts. Puisque l'ionisation par ESI a lieu directement à partir d'une solution à pression atmosphérique, les ions formés dans ce processus tendent à être fortement solvatés. Pour faire des mesures de masses moléculaires, il est nécessaire d'éliminer les molécules de solvants. La désolvatation est réalisée par interaction de la gouttelette solvatant les ions avec un contre-courant d'azote chauffé (70°C) à fort débit (6-9 L/min.). Les ions entrent ensuite dans le vide du spectromètre. Naturellement cet type de source nécessite un pompage important. Divers processus de désolvatation existent. On se référera pour plus d'informations sur cette technique et ses applications aux excellentes revues de SMITH (1990) et de FENN (1990).

La figure 30 présente le spectre de la Mélatinine. Une enveloppe d'ions multichargés (3 à 7 charges) permet d'obtenir une masse de 2848 avec une bonne précision [LOO(1989)].

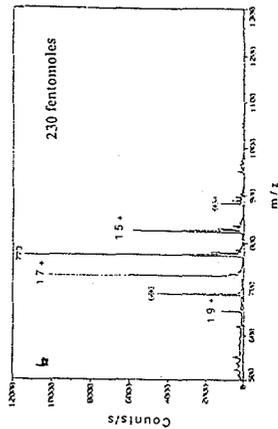
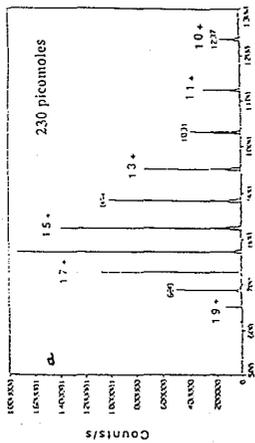
De même l'ionisation ESI de 230 picomoles de cytochrome-C (figure 31a) montre une distribution de charge allant de 10 à 19. La quantité de produit requise pour obtenir ce spectre est cinq



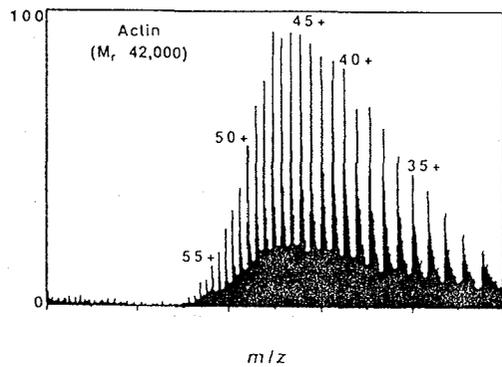
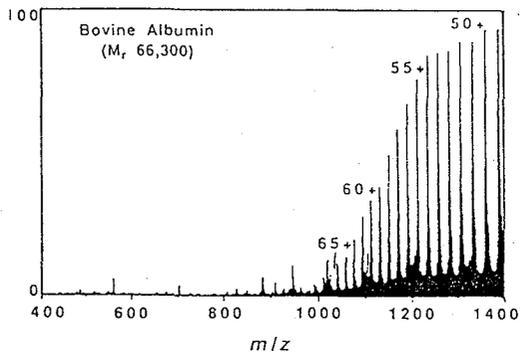
- FIGURE 29 -
Principe de l'interface ESI-MS [LOO (1988)].



- FIGURE 30 -
Spectre ESI-MS de Mélittine [LOO (1988)].



- FIGURE 31 -
Spectre ESI-MS du cytochrome-C
(a) 230 picomoles (b) 230 femtomoles.
[SMITH (1990)]



- FIGURE 32 -
Spectre ESI-MS de l'albumine bovine
et de l'actine [SMITH (1990)].

fois moindre que celle nécessaire pour la FAB-MS ou la PD-MS. Notons l'extrême sensibilité de l'ESI : la figure 31b montre la même distribution des charges pour une quantité de cytochrome-C mille fois moindre (230 femtomoles) [SMITH (1990)].

Les derniers exemple sont particulièrement spectaculaires (figure 32). Pour l'albumine bovin (masse moléculaire = 66300 d, figure 32a), l'enveloppe de charge est optimale vers cinquante charges $[M+50H]^{50+}$ [SMITH (1990)]. De même pour le spectre ESI de l'actine (masse moléculaire = 42000 d, figure 32b), la distribution moyenne des charges est comprise entre 30 et 55, avec un optimum vers $[M+45H]^{45+}$. Ce qui signifie que cet ion chargé 45 fois est visualisé vers 932 uma, alors que sa masse réelle est de 42000d.

C'est dire toute la puissance de cette technique d'ionisation qui fait apparaître la masse des molécules biologiques de haut poids moléculaires à une masse virtuelle très inférieure et cadrant parfaitement dans la gamme des spectromètre classiques. C'est donc un avantage considérable d'installer une source ESI bien que coûteuse (~ 500KF) sur un spectromètre de masse classique (~ 1 MF).

Couplage entre l'Electrophorèse Capillaire et la Spectrométrie de Masse [CZE-MS]

L'électrophorèse capillaire est actuellement couplée avec la FAB [ARTHUR-MOSELEY (1989)], la PD-MS[TOF] [LEE (1989), SMITH (1989)] et avec l'électrospray [TAKIGIKU (1990)]. C'est naturellement le couplage avec le ESI-MS qui est le plus prometteur pour les systèmes protéiques : en effet, il allie l'avantage de deux techniques bien adaptées aux hautes masses moléculaires. Ce domaine est tout récent. Les travaux ne font que débiter mais un développement important est à prévoir.

CONCLUSION

En conclusion de ce bref exposé sur la Spectrométrie de Masse, nous pouvons dire qu'elle couvre un immense domaine d'investigations allant de l'analyse classique de petites molécules peu polaires à celle des molécules biologiques. Ces dernières ont bénéficié de l'explosion des nombreuses techniques récentes d'ionisation. Pour la détermination des masses moléculaires, la FAB-MS, la L-SIMS et la PD-MS sont encore très utilisées, mais le développement futur est sans aucun doute celui de l'ESI-MS. Cependant pour séquencer des fragments de protéines digérées, la FAB et la L-SIMS couplées à la MS-MS restent, et pour longtemps, les seuls outils.

Nous avons longuement discuté des prix de revient des diverses "machines". Il est bien évident que le choix d'un Spectromètre de Masse doit être précédé d'un examen des motivations scientifiques et des besoins du laboratoire.

Nous avons vu que le domaine de l'Arachnologie est vierge en analyse par Spectrométrie de Masse. Il y a un pari à prendre pour que la Chimie et plus particulièrement la Spectrométrie de Masse ouvrent des voies nouvelles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Cette liste n'est naturellement pas exhaustive, mais elle peut guider le lecteur et surtout lui permettre un approfondissement des principes brièvement exposés ici. Toutes les références présentées sont à support biologique, débordant largement les aspects de la venimologie.

Revue générale

- Couplage GC - MS :

- J-L. CLEMENT, M. LEMAIRE, C. LANGE, C.R. Acad. Sc. Paris, (1986), 303, 669.
- D. BACOS, J-J. BASSELIER, J-P. CELERIER, C. LANGE, E. MARX, G. LHOMMET, P. ESCOUBAS, M. LEMAIRE, J-L. CLEMENT, Tetrahedron Letters, (1988), 29, 3061.
- M. LEMAIRE, M. BASIRE, C. LANGE, J-L. CLEMENT, P. CASSIER, P. ESCOUBAS, J-J. BASSELIER, Exp. Biology, (1988), 48, 27.
- C. LANGE, J-J. BASSELIER, A.G. BAGNERES, P. ESCOUBAS, M. LEMAIRE, A. LENOIR, J-L. CLEMENT, M. TRABALON, A. BONNAVITA-COUGOURDAN, M. CAMPAN, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1989), 18, 787-800.
- C. LANGE, G. LHOMMET, J-P. CELERIER, J-J. BASSELIER, J-L. CLEMENT, P. ESCOUBAS, Adv. in Mass Spectrom., Ed. by P. LONGEVIALLE, Heyden & Sons, (1989), 1113, 1620.

- Couplage LC - MS : TSP - MS

- M.L. VESTAL, Int. J. Spectrom. Ion Physics, (1983), 46, 193.
- R.D. VOYKSNER, C.A. HANEY, Anal. Chem., (1985), 57, 991.
- R.D. VOYKSNER, Org. Mass Spectrom., (1987), 22, 513.
- M. Y. KIM, D. PILOSOF, D.F. DYCKES, M.L. VESTAL, J. Am. Chem. Soc., (1984), 106, 7304.
- D. PILOSOF, M.Y. KIM, D.F. DYCKES, M.L. VESTAL, Anal. Chem., (1984), 56, 1236.
- K. STACHOWIAK, C. WILDER, M.L. VESTAL, D.F. DYCKES, J. Am. Chem. Soc., (1988), 110, 1758.
- P.J. RUDEWICZ in "The analysis of peptides and proteins by MS", Ed. by C.J. NEAL, J. Wiley & Sons, New-York (1988), 187.
- W.P. BLACKSTOCK, R.J. DENNIS, S.J. LAMIE, J.I. SPARKS, P.P. WEIR, Anal. Biochem., (1988), 175, 319.
- T.M. CHEN, J.E. COUTANT, J. Chromatogr., (1989), 463, 95.
- E.C. HUANG, J.D. HENION, J. Am. Soc. Mass Spectrom., (1990), 1, 158.

- Méthodes de désorption :

- C.J. Mc. NEAL, Anal. Chem., (1982), 54, 43 A.
- R.J. COTTER, Anal. Chem., (1988), 60, 781 A.
- L.W. TETLER, Biochem. Soc. Trans., (1987), 15, 158.

212

FAB et L - SIMS

- A. BENNIGHOVEN, D. JASPERS, W. SICHTERMAN, Appl. Phys., (1976), 11, 35.

- 1981 -

- M. BARBER, R.S. BORDOLI, R.D. SEDGUICK, L.W. TETLER, Org. Mass Spectrom., (1981), 16, 256.
- M. BARBER, R.S. BORDOLI, G.V. GARNER, D.B. GORDON, R.D. SEGWICK, L.W. TETLER, A.N. TYLER, Biochem. J., (1981), 197, 401.
- D. H. WILLIAMS, C. BRADLEY, G. BOJESEN, S. SANTIKARN, L.C.E. TAYLOR, J. Am. Chem. Soc., (1981), 103, 5700.

- 1982 -

- S.A. MARTIN, C.E. COSTELLO, K. BIEMANN, Anal. Chem., (1982), 54, 236.
- M. BARBER, R.S. BORDOLI, G.J. ELLIOTT, R.D. SEGWICK, A.N. TYLER, Anal. Chem., (1982), 54, 645 A.
- D.H. WILLIAMS, C.V. BRADLEY, S. SANTIKORN, G. BOTESSEN, Biochem. J., (1982), 201, 105.
- F.M. DEVIENNE, J.C. ROUSTAN, Org. Mass. Spectrom., (1982), 17, 173.

- 1983 -

- F.M. DEVIENNE, J.C. ROUSTAN, Spectra, (1983), 87, 21.
- K.L. RINEHART Jr., Trends in Anal. Chem., (1983), 2, 10.

- 1984 -

- M. BARBER, R.S. BORDOLI, G.J. ELLIOTT, A.N. TYER, J.C. BILL, B.N. GREEN, Biomed. Mass Spectrom., (1984), 11, 182.
- S.A. CARR, K. BIEMANN, Methods of Enzymology, (1984), 106A, 29.

- 1985 -

- P. ROESPSTROFF, P. HOJRUP, J. MOLLER, Biomed. Mass Spectrom., (1985), 12, 181.

- 1986 -

- D.F. HUNT, J.R. YATES III, J. SHABANOWITZ, S. WINSTON, C.R. HAUER, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1986), 83, 6233.
- G. GADE, G.J. GOLDSWORTHY, M.H. SCHAFFER, J.C. COOK, R.L. RINEHART Jr., Biophys. Biochem. Res. Comm., (1986), 134, 723.
- C.E. COSTELLO, in "Mass Spectrometry in Biomedical Research", Ed by S.J. GASKELL, J. Wiley, New-York, (1986), 41.
- K. ISHIKAWA, Y. NIWA, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1986), 13, 373.

- 1987 -

- K. BIEMANN, S.A. MARTIN, Mass Spectrom. Reviews, (1987), 6, 1.
- R.S. JOHNSON, K. BIEMANN, Biochem., (1987), 26, 1209.
- S.A. MARTIN, K. BIEMANN, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, (1987), 78, 213.
- E.R. BATHELT, N. HEERNA, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1987), 14, 53.
- G. GADE, K.L. RINEHART, Biophys. Biochem. Res. Comm., (1987), 149, 908.
- L. GROTJAHN, H. STEINERT, Biochem. Soc. Trans., (1987), 15, 164.
- B.W. GILSON, A.M. FALICK, L. POLYLTER, D.H. WILLIAMS, P. COHEN, in "Methods in Protein Sequence Analysis", Ed. by K.A. WALSH, Humana Press, New-Jersey, (1987), 123.
- K. BIEMANN, in "Methods in Protein Sequence Analysis", Ed. by K.A. WALSH, Humana Press, New-Jersey, (1987), 463.

- J.E. DIXON, R. YAZDANPARAST, D. SMITH, P.C. ANDREWS, in "Methods in Protein Sequence Analysis", Ed. by K.A. WALSH, Humana Press, New-Jersey, (1987), 493.

- D. PROME, J.C. PROME, Y. BLOUQUIT, C. LACOMBE, J. ROSA, Spectros. Int. J., (1987), 5, 157.

- 1988 -

- R.S. JOHNSON, S.A. MARTIN, K. BIEMANN, Int. J. Mass Spectrom. and Ion Process, (1988), 86, 137.

- R.J. ANDE-REGG, S.A. CARR, I. YIH HUANG, R.A. HUI PAKKA, C. CHANG, S. LIAO, Biochem. (1988), 27, 4214.

- J.W. PERICH, R.B. JOHNS, L. LIEPA, A.L. CHAFFEE, Org. Mass Spectrom., (1988), 23, 797.

- J.W. PERICH, R.B. JOHNS, L. LIEPA, A.L. CHAFFEE, Org. Mass Spectrom., (1988), 23, 680.

- K.B. TOMER, M.L. GROSS, H. ZAPPEY, R.H. FOKKENS, N.M.M. NIBBERING, Biomed. Environ. Mass Spectrom. (1988), 15, 649.

- K. BIEMANN, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1988), 16, 99.

- A. DELL, N.H. CARMAN, P.R. TILLER, J.E. THOMAS-OATES, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1988), 16, 19.

- L. POULTER, J.P. EARNEST, R.M. STROUD, A.L. BURLINGAME, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1988), 16, 25.

- M. HE, Z. YU, Y. YE, A. JI, Org. Mass Spectrom., (1988), 23, 288.

- D. PROME, J.C. PROME, F. PRATBERNON, Y. BLOUQUIT, F. GALACTEROS, C. LACOMBE, J. ROSA, J.D. ROBINSON, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1988), 16, 41.

- K. ISHIKAWA, Y. NIWA, K.H. ATAKEDA, T. GOTOH, Org. Mass Spectrom., (1988), 23, 290.

- 1989 -

- K. BIEMANN, Biochem. Soc. Trans, (1989), 17, 237.

- C. DASS, D.M. DE SIDERIO, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, (1989), 92, 267.

- K.L. SCHEY, J.C. SCHWARTZ, R.G. COOKS, Rapid Comm. Mass Spectrom., (1989), 3, 305.

- C. LANGE, Y. PRIGENT, P. HENNIG, S. REBUFFAT, C. AUVIN-GUETTE, M. EL HAJJI, B. BODO, Spectros. Int. J., (1989), 7, 145.

- Y. WADA, A. HYASHI, Y. OKA, T. MATSUO, T. SAKURAI, H. MATSUDA, I. KATUKUSE, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, (1989), 91, 79.

- H. HIETER, B. LUU, F. GOLTZENE, D. ZACHARY, A. VAN DORSELAER, Eur. J. Biochem., (1989), 182, 77.

- C. FENSELAU, D.N. HELLER, J.K. OLTHOFF, R.J. COTTER, Y. KISHIMOTO, O. MANUEL UY, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1989), 18, 1037.

- J.C. PROME, F. COUDERC, G. GAVARD, V. PATRY, Spectros. Int. J., (1989), 7, 29.

- K. ISHIKAWA, Y. NIWA, K. OISHI, S. AOI, T. TAKEUCHI, S. WAKAYAMA, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1989), 19, 395.

- R.S. JOHNSON, K. BIEMANN, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1989), 18, 945.

- 1990 -

- L.J. DETERDING, K.B. TOMER, A.F. SPATOLA, J. Am. Soc. Mass Spectrom., (1990), 1, 174.

CF - FAB - MS

- L.A. SMITH, R.M. CAPRIOLI, Biomed. Mass Spectrom., (1983), 10, 98.

- L.A. SMITH, R.M. CAPRIOLI, Biomed. Mass Spectrom., (1984), 11, 392.

- R.M. CAPRIOLI, T. FAN, J.S. COTTRELL, Anal. Chem., (1986), 58, 2949.

- R.M. CAPRIOLI, Biochem. Soc. Trans., (1987), 15, 162.

- R.M. CAPRIOLI, W.T. MOORE, T. FAN, Rapid. Comm. Mass Spectrom., (1987), 1, 15.

- R.M. CAPRIOLI, Mass Spectrom. Review, (1987), 6, 237.

- R.M. CAPRIOLI, B. DAGUE, T. FAN, W.T. MOORE, Biophys. Biochem. Research. Comm., (1987), 146, 291.

- R.M. CAPRIOLI, Biochemistry, (1988), 27, 513.

- R.M. CAPRIOLI, W.T. MOORE, G. PETRIE, K. WILSON, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process, (1988), 86, 1987.

- W.E. SEIFERT Jr., A. BALLATORE, R.M. CAPRIOLI, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, (1989), 3, 117.
- H.A. MOSELEY, L.J. DETERDING, J.S.M. de WIT, D.B. TOMER, R.T. KENNEDY, N. BRAGG, J.W. JORGENSEN, *Anal. Chem.*, (1989), 61, 1577.
- M.J. BERTRAND, V. BENHAM, R. St-LOUIS, M.J. EVAN, *Can. J. Chem.*, (1989), 67, 910.
- P. KOKKONEN, J. VAN der GREFF, W.M.A. NIESSEN, U.R. TJADEN, G.J. TEN HOVE, G. VAN DE WERKEN, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, (1989), 3, 102.
- D.J. BELL, M.D. BRIGHTWELL, W.A. NEVILLE, A. WEST, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, (1990), 4, 88.

- Plasma Desorption - MS -

- 1983 -

- B. SUNQVIST, P. ROEPSTROFF, *Biomed. Mass Spectrom.*, (1984), 11, 242.
- P. HAKANSSON, I. KAMENSKY, J. KJELLBERG, J. FOHLMAN, P.A. PETERSON, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, (1983), 110, 519.
- B.T. CHAIT, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics*, (1983), 53, 227.

- 1984 -

- B. SUNDQVIST, I. KAMENSKY, P. HAKANSSON, J.K. JELLBERG, M. SALEHPOUR, S. WIDDYASEKERA, J. FOLHMAN, P.A. PETERSON, P. ROEPSTORFF, *Biomed. Mass Spectrom.*, (1984), 11, 242.

- 1986 -

- P. ROEPSTROFF, P. HOJRUP, B.U.R. SUNDQVIST, G. JONSSON, P. HAKANSSON, S.O. ANDERSEN, K.E. JOHANSSON, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, (1986), 13, 689.
- G.P. JONSSON, A.B. HEDIN, P.L. HAKANSSON, B.U.R. SUNQVIST, B.G.S. SAVE, P.F. NIELSEN, P. ROEPSTORFF, K.E. JOHANSSON, I. KAMENSKY, M.S.L. LINDBERG, *Anal. Chem.*, (1986), 58, 1084.

- 1987 -

- P. ROEPSTORFF, P.F. NIELSEN, P. HOJRUP, *Biochem. Soc. Trans.*, (1987), 15, 155.
- J.A. LOO, E.R. WILLIAMS, J.J.P. FURLONG, B.H. WANG, F.W. Mc LAFFERTY, B.T. CHAIT, F.H. FIELD, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process*, (1987), 78, 305.

- 1988 -

- P.F. NIELSEN, K. KLARSKOV, P. HOJRUP, P. ROEPSTORFF, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, (1988), 17, 355.
- P. ROEPSTORFF, P.F. NIELSEN, K. KLARSKOV, P. HOSRUP, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, (1988), 16, 9.
- R.J. COTTER, *Anal. Chem.*, (1988), 60, 781 A.
- L. SILLY, C. FENSELAU, R.J. COTTER, "The analysis of peptides and proteins by MS", Ed. by C.J. NEAL, J. Wiley and Sons, New-York, (1988), 203.

- 1989 -

- S.K. CHOWDHURY, B.T. CHAIT, *Anal. Biochem.*, (1989), 182, 77.
- K. KLARSKOV, P. HOJRUP, S.O. ANDERSEN, P. ROEPSTORFF, *Biochem. J.*, (1989), 262, 923.
- M.P. LACEY, T. KEDUGH, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, (1989), 3, 323.
- C. DEPRUN, L. SZABO, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, (1989), 3, 171.
- P. ROEPSTROFF, P.F. NIELSEN, K. KLARSHON, P. HOJRUP, *Biochem. Soc. Trans.*, (1989), 17, 250.
- J.S. SHOWELL, H.M. FALES, E.A. SOKOLOSKI, *Org. Mass Spectrom.*, (1989), 24, 632.
- K. KLARSKOV, P. HOJRUP, S.O. ANDERSEN, P. ROEPSTORFF, *Biochem. J.*, (1989), 262, 923.
- K. KLARSKOV, K. BREDDAM, P. ROEPSTORFF, *Anal. Biochem.*, (1989), 180, 28.

- 1990 -

- H. LAM-THANH, C. DEPRUN, Y. LE BEYEC, Rapid Comm. Mass Spectrom., (1990), 4, 41.
- H.J. VORST, M.W.E. M. VAN TILBORG, P.A. VAN VEELEN, U.R. TJADEN, J. VAN DER GREEF, Rapid Comm. Mass Spectrom., (1990), 4, 202.

ELECTROSPRAY IONIZATION [ESI]

- 1988 -

- J.A. LOO, H.R. UDSETH, R.D. SMITH, Rapid Comm. Mass Spectrom., (1988), 2, 207.

- 1990 -

- J.B. FENN, M. MANN, C.K. MENG, S.F. WONG, C.M. WHITEHOUSE, Mass Spectrom. Reviews, (1990), 9, 37.
- K.D. HENRY, F.W. Mc LAFFERTY, Org. Mass. Spectrom., (1990), 25, 490.
- C.K. MENG, C.N. Mc EWEN, B.S. LARSEN, Rapid Comm. Mass Spectrom., (1990), 4, 147.
- C.K. MENG, C.N. Mc EWEN, B.S. LARSEN, Rapid Comm. Mass Spectrom., (1990), 4, 151.
- R.D. SMITH, J.A. LOO, C.G. EDMOWDS, C.J. BARINAGA, H.R. UDSETH, Anal. Chem., (1990), 62, 882.
- R.D. SMITH, J.A. LOO, C.J. BARINAGA, C.G. EDMOWDS, H.R. UDSETH, J. Am. Soc. Mass Spectrom., (1990), 1, 53.
- S.K. CHOWDHURY, V. KATTA, B. T. CHAIT, Rapid Comm. Mass Spectrom., (1990), 4, 81.

Couplage Electrophorèse capillaire - Spectrométrie de Masse [CZE-MS] avec diverses technique d'ionisation.

CZE - PD - MS

- R. TAKIGIKU, T. KEOUGH, M.P. LACEY, R.E. SCHNEIDER, Rap. Comm. Mass Spectrom., (1990), 4, 24.

CZE - ESI - MS

- E.D. LEE, N. MUCK, J.D. HENION, T.R. COVEY, Biomed. Environ. Mass Spectrom., (1989), 18, 844.
- R.D. SMITH, H.R. UDSETH, J.A. LOO, B.W. WRIGHT, G.A. ROSS, Talenta, (1989), 36, 161.

CZE - FAB - MS

- M. ARTHUR-MOSELEY, L.J. DETERDING, K.B. TOMER, J.W. JORGENSON, Rap. Comm. Mass Spectrom., (1989), 3, 87.

— . —