

Historique

Première mesure de spectres de masse en 1912 par **Thompson** et méthode d'ionisation et passage dans un secteur magnétique par **Arnot** et **Milligan** en 1918. Utilisation en 1919 des masses atomiques par **Aston**. Montage en 1946 d'un appareil à temps de vol (TOF-MS) par **Stephens**, celui d'un analyseur par filtre quadrupolaire en 1953-58 par l'équipe de **Paul**. Branchement de la chromatographie en phase gazeuse en 1956 par **Gohlke** et **McLafferty**. Utilisation en 1965 de l'appareil ionique à cyclotron par résonance par l'équipe **Rippleet son équipe**. Application de l'ionisation chimique par **Munson** et **Field** en 1966, de l'ionisation « électrospray » par **Dole et son équipe** en 1968 et la « thermospray » par l'équipe de **Blakely**. Couplage de la chromatographie en phase liquide en 1973 par **McLafferty**. Depuis ce temps, la technique du spectromètre de masse s'est constamment améliorée.

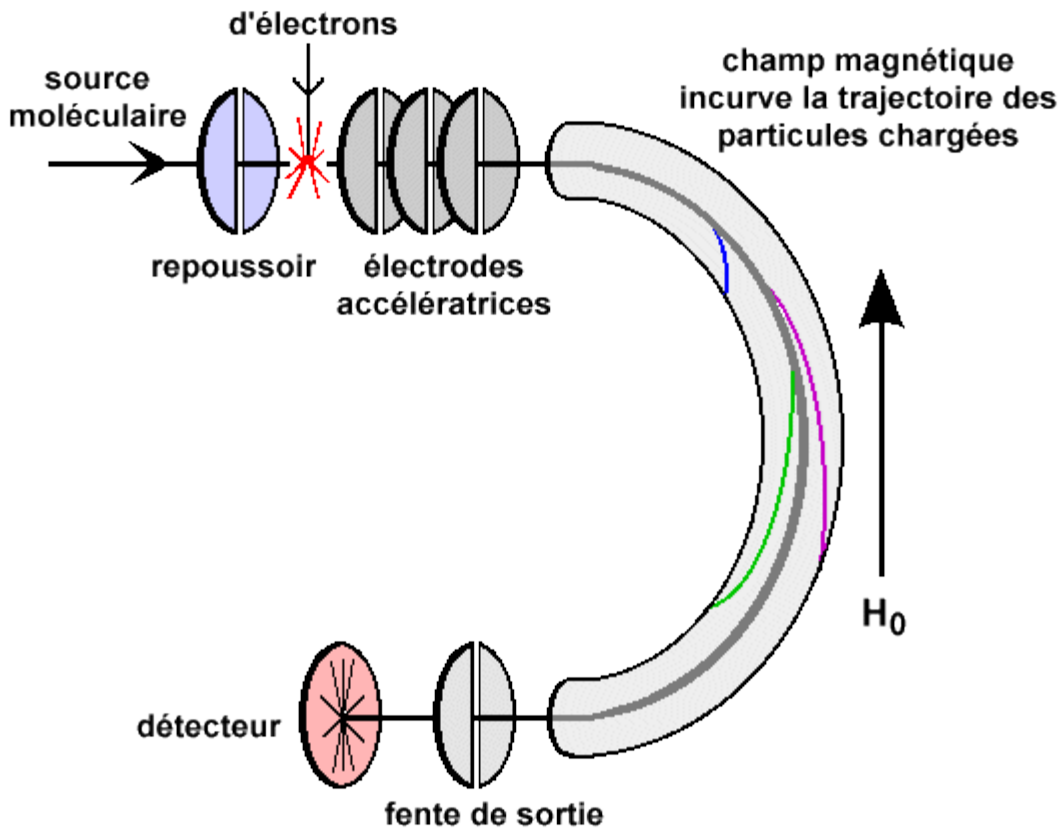
Applications

À l'origine la spectrométrie de masse servait à détecter et séparer les différents isotopes d'un élément. Elle est maintenant utilisée pour élucider la structure d'une substance en l'introduisant directement dans l'appareil ou en analysant les produits de séparation provenant de la chromatographie gazeuse, chromatographie liquide ou électrophorèse capillaire.

Description d'un spectromètre de masse

Appareil dans lequel des ions sont produits à partir d'un échantillon

- séparés selon leur rapport masse/charge
- détectés
- exprimés en fonction de leur abondance relative



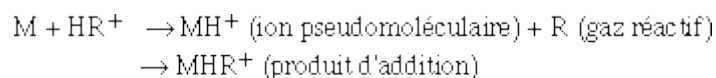
II SOURCS D'IONISATION

1- EI-MS :Impact électronique

L'ionisation est réalisée dans une chambre d'ionisation où règne un vide de 10^{-9} à 10^{-7} Torr. Un faisceau d'électrons est utilisé pour l'ionisation, et la collision se fait en éjectant un électron de la molécule, donnant une espèce M^+ , soit la casse en fragments caractéristiques. Selon l'énergie utilisée pour accélérer les électrons, il y aura plus ou moins de fragmentation.

2- CI-MS :Ionisation chimique

Cette méthode utilise un gaz réactif (à la pression d'environ 1 mm Hg) qui est ionisé par un faisceau d'électrons et donne une série d'ions qui à leur tour réagissent avec les substances à analyser. On peut utiliser divers gaz, parmi lesquels l'ammoniac, le méthane et l'isobutane. La réaction d'ionisation est la suivante :



Il s'agit d'une méthode "douce", qui casse beaucoup moins les molécules que la précédente.

«3 L'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB) permet d'analyser des molécules non vaporisables sous vide (grosses molécules biologiques). L'échantillon est mélangé en solution à une matrice liquide non volatile (glycérol, thioglycérine, alcool m-nitrobenzylique). Un faisceau à haute énergie (de l'ordre de 4 à 10 keV) d'atomes neutres (Ar ou Xe) est envoyé sur l'échantillon et la matrice dans la chambre de collision causant ainsi les phénomènes de désorption et d'ionisation. Les ions préexistants en solution sont expulsés en phase gazeuse et accélérés vers l'analyseur.

Les molécules ainsi ionisées n'ont pas beaucoup d'énergie interne, la fragmentation est donc faible mais l'ion moléculaire est facilement reconnaissable (pic intense) et la masse moléculaire est facile à déterminer.

4 Ionisation par désorption au laser d'une matrice (MALDI) *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation* " vaporise et ionise de grosses molécules biologiques (protéines et fragments d'ADN) dispersées dans une matrice solide chromophore.

Un faisceau laser pulsé est utilisé, généralement dans le domaine des ultraviolets(337 nm), pour désorber et ioniser un mélange matrice/échantillon cocristallisé sur une surface métallique, la cible.

Les molécules de matrice absorbent l'énergie transmise par le laser sous forme de photons UV, s'excitent et s'ionisent. L'énergie absorbée par la matrice provoque sa dissociation et son passage en phase gazeuse. Les molécules de matrice ionisées transfèrent leur charge à l'échantillon.

L'expansion de la matrice entraîne l'échantillon au sein de la phase gazeuse dense où il va finir de s'ioniser.

L'ionisation de l'échantillon a donc lieu soit dans la phase solide avant la désorption, soit par transfert de charge lors de collisions avec la matrice excitée après désorption. Elle conduit à la formation d'ions monochargés et multichargés de type $[M+nH]^{n+}$, avec une nette prépondérance pour les monochargés.

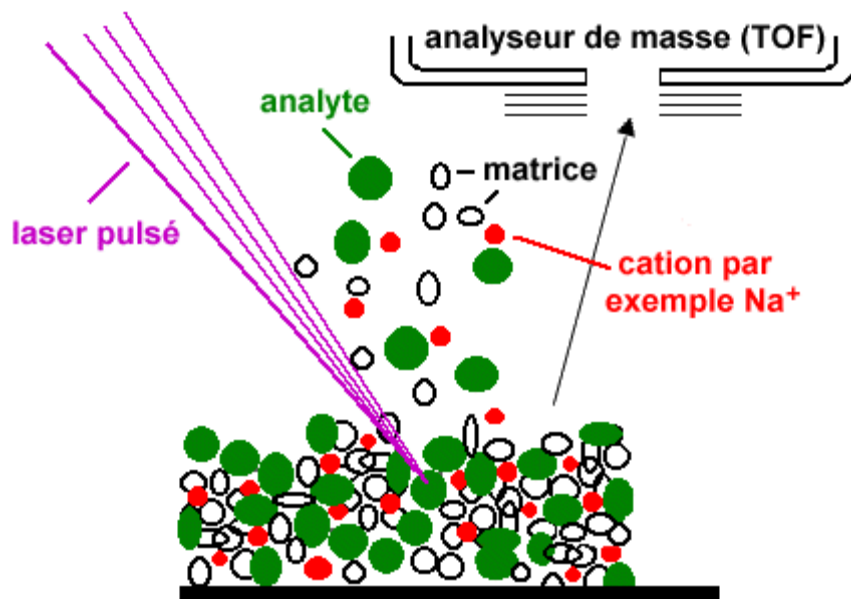


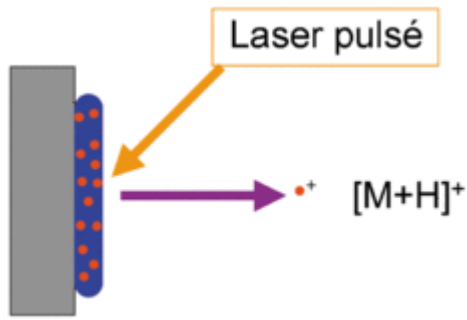
Figure 4. Schéma du procédé MALDI. Adapté de: J. Chem. Edu, 1997, 74, 1288.

Trois Étapes - chauffage rapide de la matrice par laser

- désorption de molécules neutres et intactes
- ionisation douce et sélective des molécules désorbées. L'analyse se fait par spectrométrie à temps de vol

Le phénomène d'ionisation utilise une **matrice cristallisée**. Exemple : un mélange acide sinapinique / acétonitrile / H_2O (50:50:0,1). Les propriétés de ce mélange sont :

- un caractère acide donc une source de proton pour l'ionisation des peptides
- une forte absorption optique dans les UV pour absorber rapidement et efficacement l'irradiation du laser
- la présence de groupements polaires pour une utilisation en solution aqueuse



bleu : matrice - rouge : échantillon

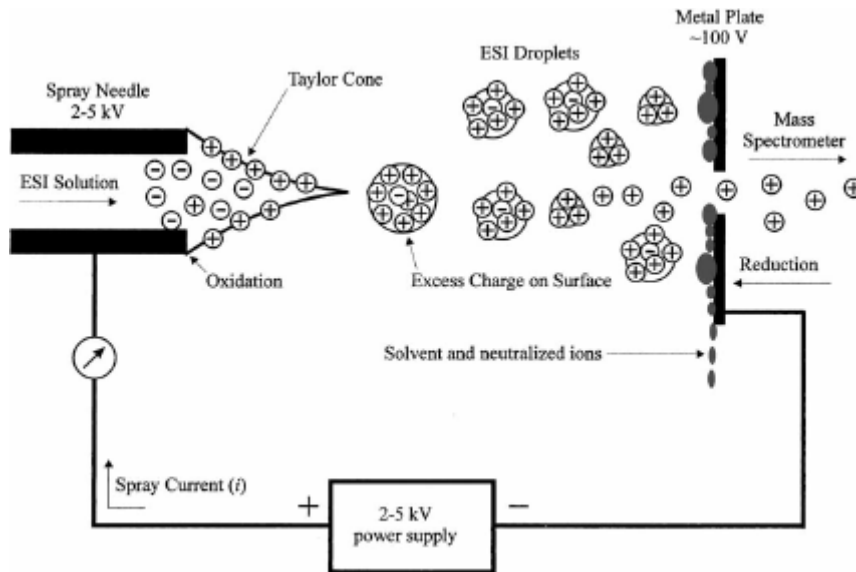
Cette technique de spectrométrie de masse permet d'établir la **carte peptidique massique** de la protéine ou **empreinte** ("*peptide mass fingerprint* - PMF").

5 L'ionisation par électro-nébuliseur ("*ElectroSpray Ionisation*" - ESI-

Les fragments peptidiques issus de l'hydrolyse par la trypsine sont en solution aqueuse volatile (mélange méthanol-eau 1:1). Cette solution est introduite dans la source par un capillaire très fin chargé et en métal.

L'ionisation des molécules a lieu dans des conditions douces (pression atmosphérique et température ambiante) : sous l'effet d'un gaz nébuliseur (N₂) et d'un champ électrique, les gouttes "explosent" (la fission Coulombique) en un brouillard de **gouttelettes chargées** (un **électrospray**).

Des ions multi-chargés comme $[M + 2H]^{2+}$ sont souvent observés.



Source :Cech&Enke (2002)

Son principe est le suivant : à pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé. Le champ électrique intense leur confère une densité de charge importante. Sous l'effet de ce champ et grâce à l'assistance éventuelle d'un courant d'air coaxial, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation. Sous l'effet d'un second courant d'air chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement. Leur densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes explosent en libérant des microgouttelettes constituées de molécules protonnées ou déprotonnées de l'analyte, porteuses d'un nombre de charges variable. Les ions ainsi formés sont ensuite guidés à l'aide de potentiels électriques appliqués sur deux cônes d'échantillonnage successifs faisant office de barrières avec les parties en aval maintenues sous un vide poussé ($<10^{-5}$ Torr). Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant, ce qui complète leur désolvatation. En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes. L'avantage de cette méthode d'ionisation est l'obtention d'ions multichargés,

pour les macromolécules, polymères. Elle permet d'autre part de générer une ionisation "douce" : des ions moléculaires sont formés en majorité.

La technique ESI-MS :

- peut-être modifié en système "*nanospray*" (débit < 1 mL/min)
- est très sensible : requière moins d'une picomole de matériel
- est fortement affectée par les sels et détergents

Caractéristiques communes aux techniques d'ionisation **MALDI** (à partir d'une phase solide) et **ESI** (à partir d'une phase liquide) :

- génération de molécules protonnées
- les ions formés sont triés en fonction de leur rapport $[m/z]$ dans un analyseur
- couplage à différents types d'analyseurs : à temps de vol, quadripôle, secteurs magnétiques/électriques, à trappe ionique ...
- détermination précise de la masse moléculaire jusqu'à plusieurs centaines de kDa
- limites de détection de l'ordre de la picomole
- analyse de mélanges complexes
- mode de mesure en ion positif $[M + H]^+$ pour les protéines qui ont des groupements qui captent des H^+ (amide et amine)
- mode de mesure en ion négatif $[M - H]^-$ pour l'ADN qui a des groupements qui cèdent des H^+ (acide et hydroxyle)

III Modes de séparation « Analyseurs »

Les analyseurs se différencient par leur principe de mesure du rapport m/z des ions, qui est :

- la dispersion des ions, fondée sur leur moment ou leur énergie cinétique (instruments à secteur magnétique ou électrique)
- la séparation dans le temps, fondée sur la vitesse des ions (TOF)
- la transmission des ions traversant un champ électrodynamique (quadripôle)
- le mouvement périodique dans un champ magnétique ou électrodynamique (pièges ou trappes à ions)

1) Secteur magnétique

L'ion est éjecté dans un milieu dans lequel règne un champ magnétique uniforme perpendiculaire au plan de la trajectoire. Du fait de la force de Lorentz, la trajectoire se courbe, et le point d'impact de l'ion (donc sa déviation) permet de connaître sa masse à partir de la charge

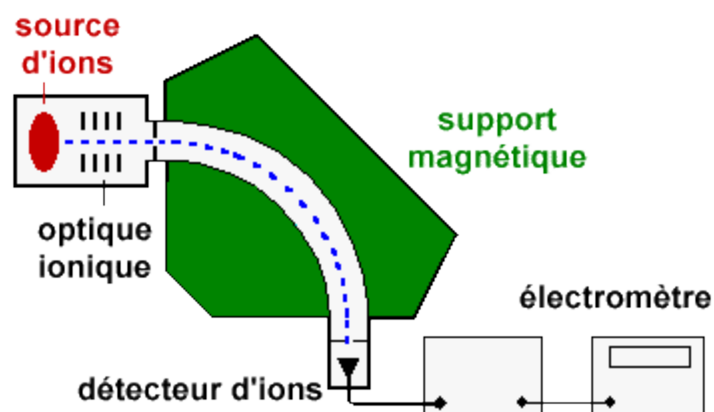


Figure 1. Schéma d'un spectromètre de masse avec secteur magnétique. Appareil à simple focalisation.

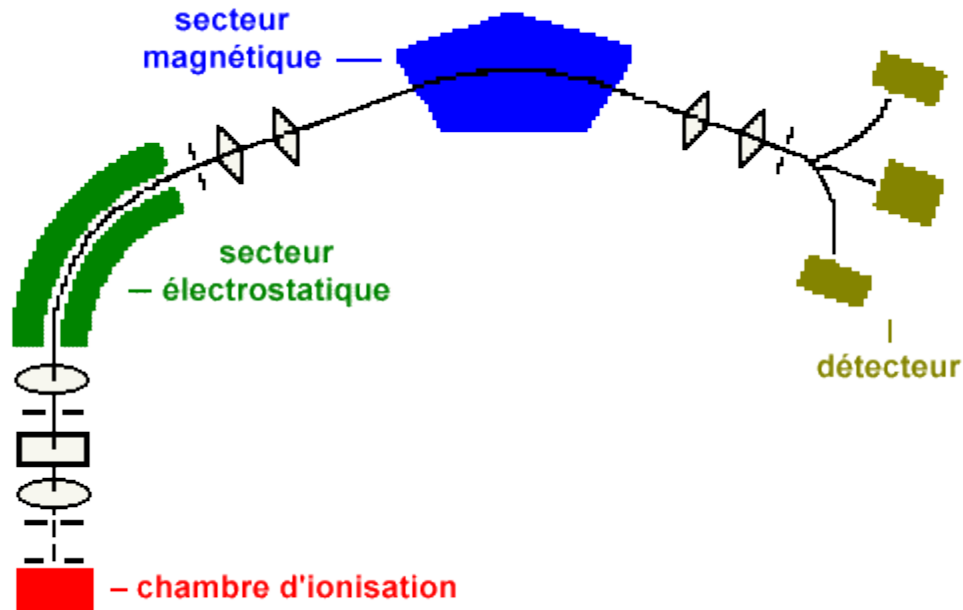


Figure 6. Schéma d'un spectromètre de masse avec secteur magnétique. Appareil à double focalisation.
Tiré, traduit et adapté de: http://sirio.cineca.it/mass_spectrom/welcome.htm

L'énergie cinétique acquise par les ions accélérés par la tension accélératrice est

$$\text{énergie cinétique} = \frac{1}{2} mv^2 = eV$$

où **m** = masse de l'ion

v = vitesse de l'ion

e = charge de l'ion

V = tension accélératrice

Les ions traversent le secteur magnétique où leur trajectoire est incurvée. Seuls les ions de m/e dont la force centrifuge = la force centripète passe dans le secteur magnétique.

$$mv^2r = HeV$$

r = rayon de courbure de la trajectoire de l'ion qui donne:

$$ce r = \frac{mV}{eH} = \frac{1}{H} \sqrt{2V \frac{m}{e}}$$

et

$$\frac{m}{e} = \frac{H^2 r^2}{2V}$$

Ce qui démontre que les ions de différents rapports m/e atteignent le détecteur en faisant varier H ou V .

Le spectromètre mesure ensuite les distances d'impact lorsque la particule a effectué un demi-cercle. La distance au point d'origine correspond au diamètre donc au double du rayon. La charge de la particule permet donc d'en déduire sa masse.

2) Filtre quadripolaire

Un quadripôle (ou quadrupôle) est constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique. Les électrodes opposées distantes de $2r_0$ sont reliées entre elles et soumises au même potentiel.

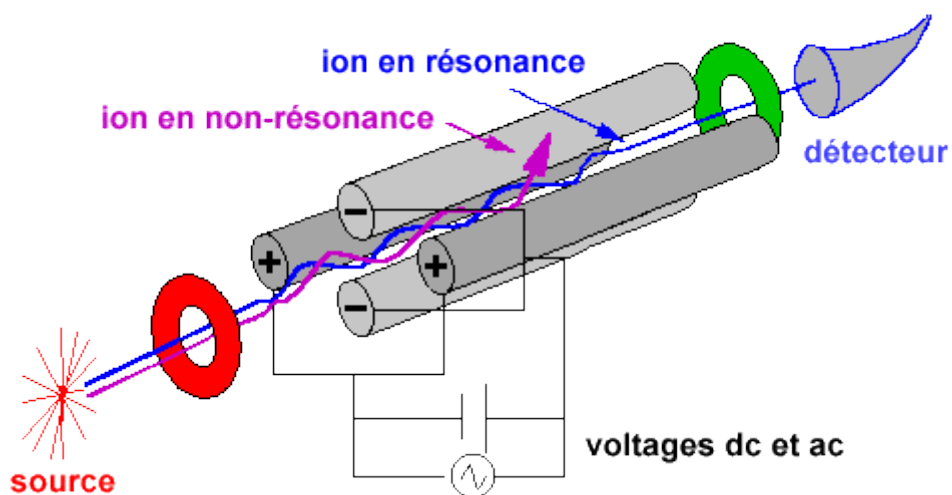
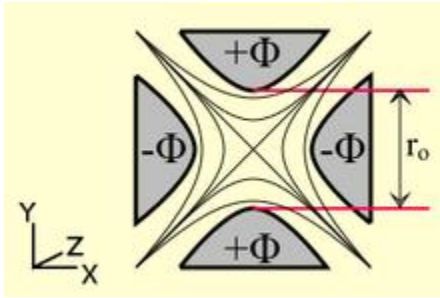


Figure 7. Schéma d'un filtre quadripolaire.



Coupe d'un quadripôle

Les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels de même valeur, mais opposés de sorte que l'écart de potentiel soit égal à ϕ_0 .

Ce potentiel ϕ_0 résulte de la combinaison de tensions, l'une continue (U) l'autre alternative (V) de haute fréquence f : $\phi_0 = U - V \cdot \cos(2\pi ft)$

En appliquant cette différence de potentiel entre chaque paire d'électrodes, il se crée un champ électrique quadripolaire. Un point de coordonnées (x, y, z) situé

dans le champ électrique sera alors soumis au potentiel : $\phi = \phi_0 \cdot \frac{x^2 - y^2}{r_0^2}$

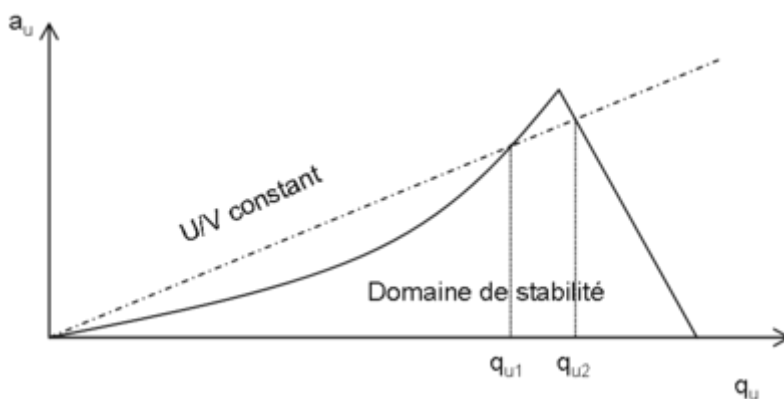


Diagramme de stabilité d'un ion dans un quadripôle

La trajectoire d'un ion pénétrant dans le quadripôle sera donc uniforme selon l'axe z et décrite par les équations de Mathieu selon les deux autres axes. Il est possible de définir en fonction des valeurs U et V des zones de stabilité telles

que les coordonnées x et y de l'ion restent strictement inférieures à r_0 . L'une d'entre elles est exploitée en spectrométrie de masse (Les ions qui se trouvent dans cette zone auront donc une trajectoire stable dans le quadripole et seront détectés). En gardant constant le rapport U/V , on obtient une droite de fonctionnement de l'analyseur. Un balayage de U avec U/V constant permet l'observation successive de tous les ions dont la zone de stabilité est coupée par la droite de fonctionnement. La résolution entre ces ions est d'autant plus grande que la pente de la droite est élevée.

Les principaux avantages du spectromètre quadripolaire résident dans sa souplesse d'utilisation, sa résolution unitaire sur toute sa gamme de masse, sa vitesse de balayage satisfaisante, ainsi que son adaptabilité à différentes interfaces permettant le couplage avec la chromatographie gazeuse ou liquide.

3) Piège à ions (ion trap)

C'est un piège ionique où la préparation, l'analyse et la détection des ions s'effectuent dans un même espace, suivant des séquences temporelles successives.

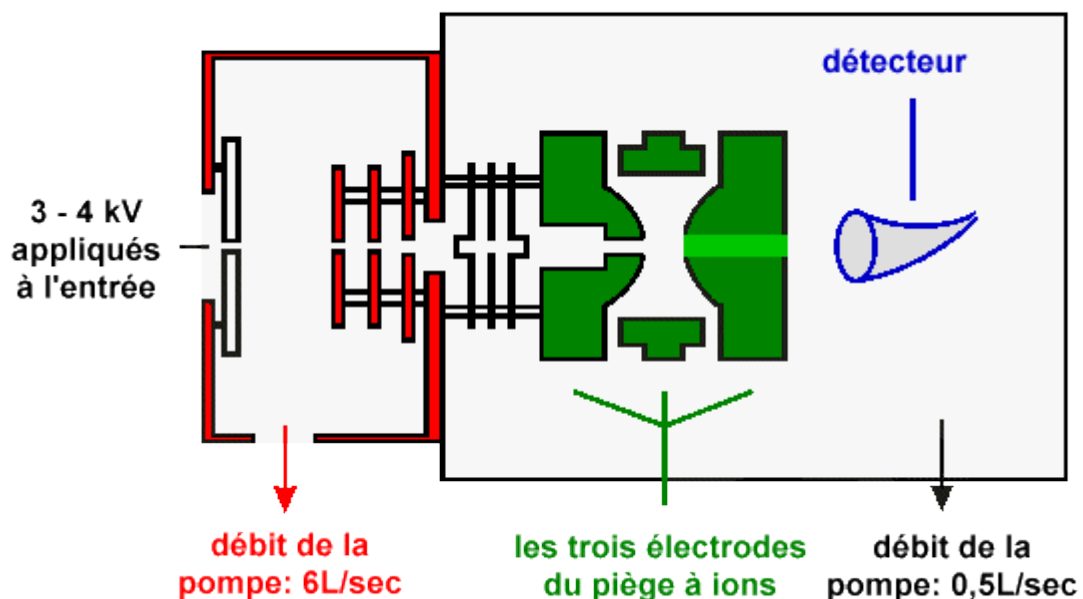


Figure 8. Schéma d'un piège à ions.

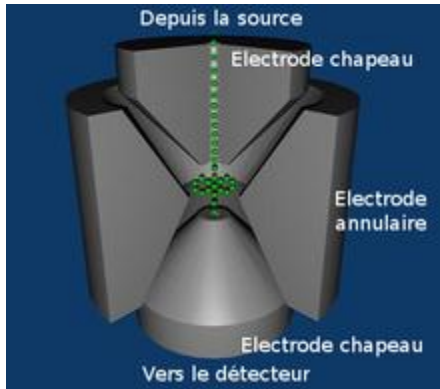


Schéma de la trajectoire des ions dans un piège ionique (en vert)

Le piège est constitué de trois électrodes à section hyperbolique : une électrode annulaire encadrée par deux électrodes-chapeaux (d'entrée et de sortie) qui forment les calottes supérieure et inférieure du dispositif. Une tension en radiofréquence $V \cdot \cos(2\pi ft)$ combinée ou non à une tension continue U est appliquée entre l'électrode centrale et les deux électrodes calottes. Le champ résultant est alors tridimensionnel. Les domaines de stabilité des ions sont à nouveau déterminés par les équations de Mathieu. Celui exploité est défini tel que lorsque les ions en sortent, leur trajectoire radiale reste stable contrairement à celle selon l'axe des z . Un balayage de l'amplitude de la radiofréquence V entraînera donc l'expulsion des ions piégés selon cet axe, vers le détecteur. Les trajectoires stables des ions, au sein du champ quadripolaire résultant sont tridimensionnelles, en forme de huit.

4) Spectromètre à temps de vol (TOF-MS)

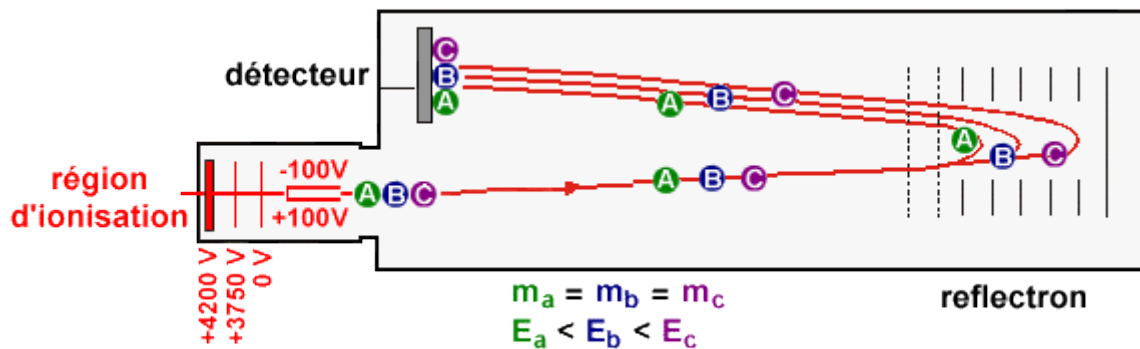


Figure 9. Schéma d'un spectromètre à temps de vol.

La spectrométrie à temps de vol (TOF-MS, selon l'acronyme anglais *Time of Flight Mass Spectrometry*) est une méthode de spectrométrie de masse dans laquelle les ions sont accélérés par un champ électrique de valeur connue². Il résulte de cette accélération que les ions de même charge électrique acquièrent la même énergie cinétique. La vitesse des ions, par contre dépend du *rapport masse/charge*. On mesure le temps mis par une particule chargée pour atteindre un détecteur situé à une distance connue. Ce temps dépendra du *rapport masse/charge* de la particule considérée. Ce sont les particules les plus lourdes qui seront accélérées aux vitesses les plus basses. La détermination du *rapport masse/charge* découle de ce temps de vol et de la connaissance des autres paramètres expérimentaux comme la position du détecteur et la tension d'accélération.

La séparation des différents ions est basée dans le spectromètre de masse à temps de vol est basée sur le fait que les ions de masses différentes se déplacent à des vitesses différentes. L'ionisation se fait en mode pulsé. Tous les ions produits sont accélérés par un champ électrique puis traversent un tube où il y a absence de champ.

Energie potentielle= énergie cinétique

$$\text{énergie cinétique} = qV$$

où **q** = charge de l'ion

V = potentiel appliqué

Comme l'énergie cinétique des ions est

$$\frac{1}{2} mv^2 = qV$$

où **m** = masse de l'ion

v = vitesse de l'ion

et

$$v = \sqrt{\frac{2qV}{m}}$$

Les ions de masse plus faible se déplacent plus vite que ceux de masse plus grande.

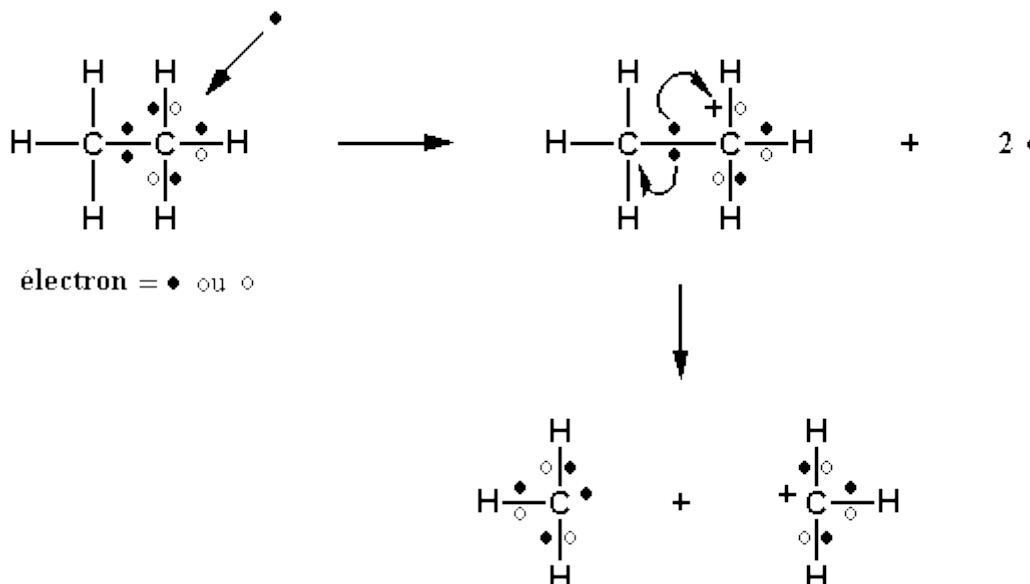
Le temps **t** que met l'ion pour parcourir la distance correspondant à la longueur du tube sans champ = L/v où **L** = longueur du tube et

$$t = \frac{L}{\sqrt{\frac{2qV}{m}}}$$

$$t = k \sqrt{\frac{m}{q}} \quad \text{avec } \frac{d}{\sqrt{2U}} = k$$

APPLICATIONS

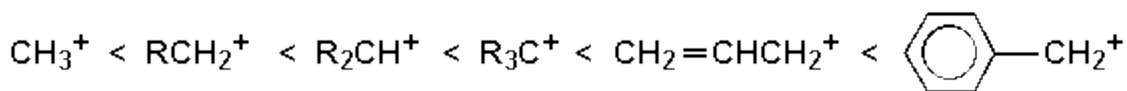
Mécanisme de l'ionisation électronique



L'impact d'un électron très énergétique sur une molécule transforme cette dernière en radical-cation avec la perte d'un électron. Suivent une série de réarrangements ou fragmentations qui dépendent de la nature et de la structure de la molécule.

La fragmentation des hydrocarbures linéaires ou ramifiés se fait dans le sens de donner le carbocation le plus stable.

Ordre croissant de stabilité:



Voir par exemple les spectres du n-butane et celui du 2-méthylpropane en figure 10. Le pic à $m/e = 43$ dans le 2-méthylpropane correspondant à un carbocation secondaire



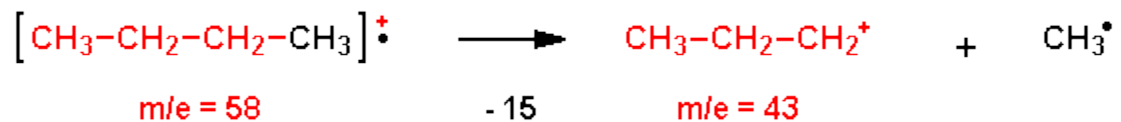
est beaucoup plus intense parce que plus stable que celui trouvé dans le butane qui correspond à un carbocation primaire



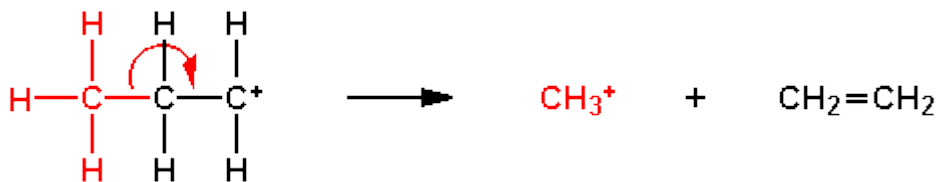
MOLÉCULE TRANSFORMÉE EN RADICAL-CATION DANS LES DIFFÉRENTES CLASSES DE COMPOSÉS

LES ALCANES

Dans les alcanes linéaires, la fragmentation se manifeste par la perte d'un méthyle; ce qui donne des fragments de $m/e = \text{masse molaire} - 15$.



En général les fragments correspondent à $m/e = 29, 43, 57, 71...$ (ou masse molaire -15). Voir l'exemple du butane (figure 10). Il peut aussi y avoir formation d'une molécule neutre d'éthène.



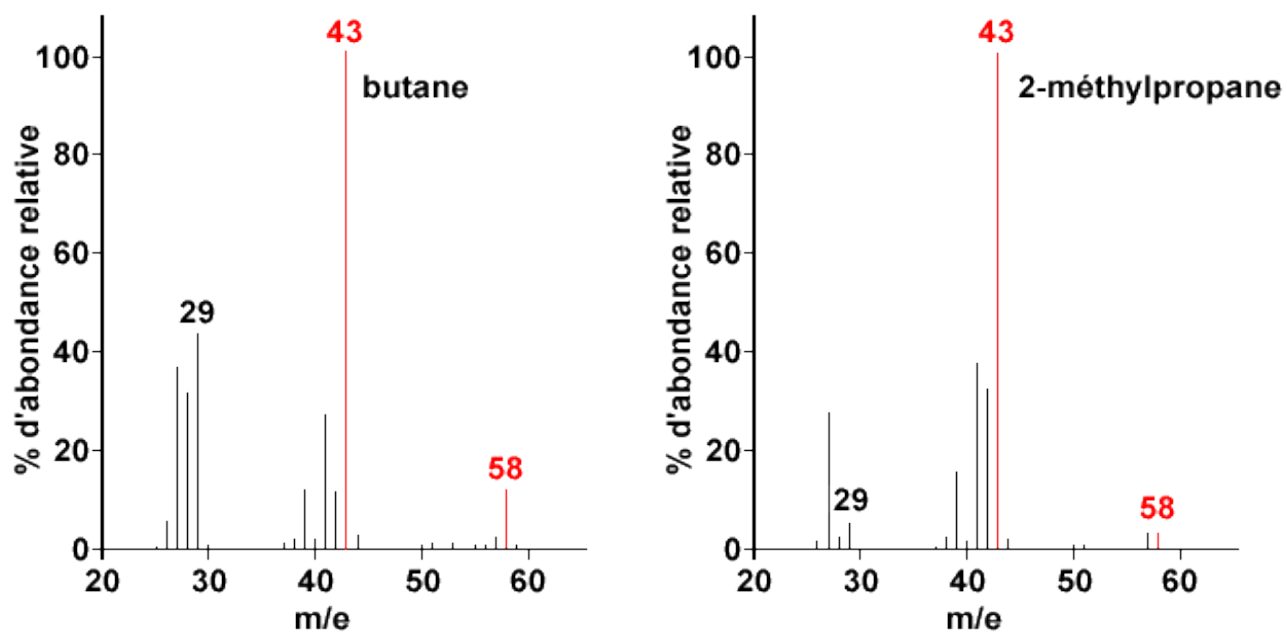
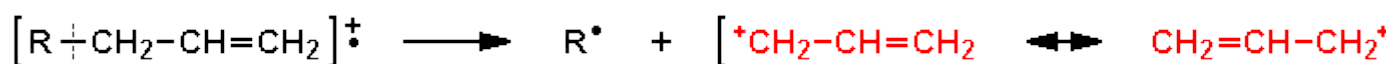


Figure 10. Spectres de masse du butane $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ et du 2-méthylpropane $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$, des isomères dont les masses molaires = 58 g/mol.

LES ALCÈNES

Les alcènes donnent très souvent par ionisation un fragment de $m/e = 41$ qui correspond au carbocation allylique.



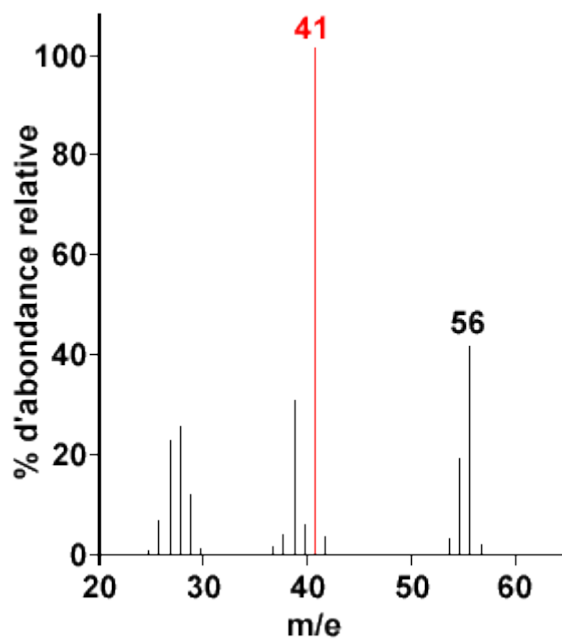


Figure 11. Spectre de masse du 1-butène $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ dont la masse molaire = 56 g/mol.

LES AROMATIQUES

Ils présentent habituellement un pic d'ion moléculaire intense car le noyau aromatique est très stable et difficilement fragmentable comme le montre le spectre de masse du benzène.

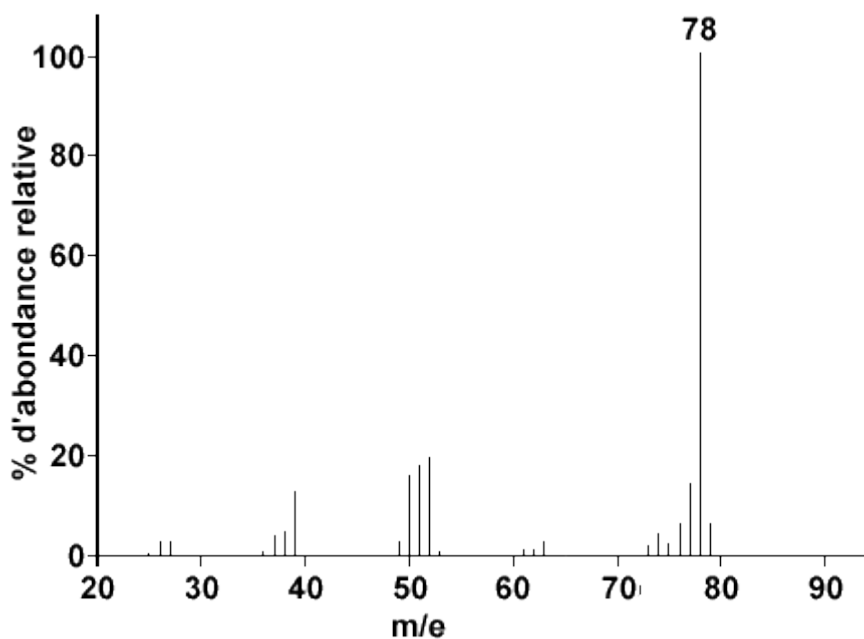
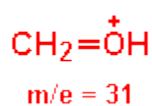


Figure 12. Spectre de masse du benzène C_6H_6 dont la masse molaire = 78 g/mol.

LES ALCOOLS

Le pic de l'ion moléculaire des alcools est presque inexistant car ils perdent une molécule d'eau très facilement. Cette perte peut même se produire sous l'effet de la chaleur avant la fragmentation. Dans ce cas particulier l'allure du spectre ressemblera plutôt à celui d'un alcène.

Le fragment le plus courant est:



Le cas des alcools ramifiés est plus difficile à analyser.

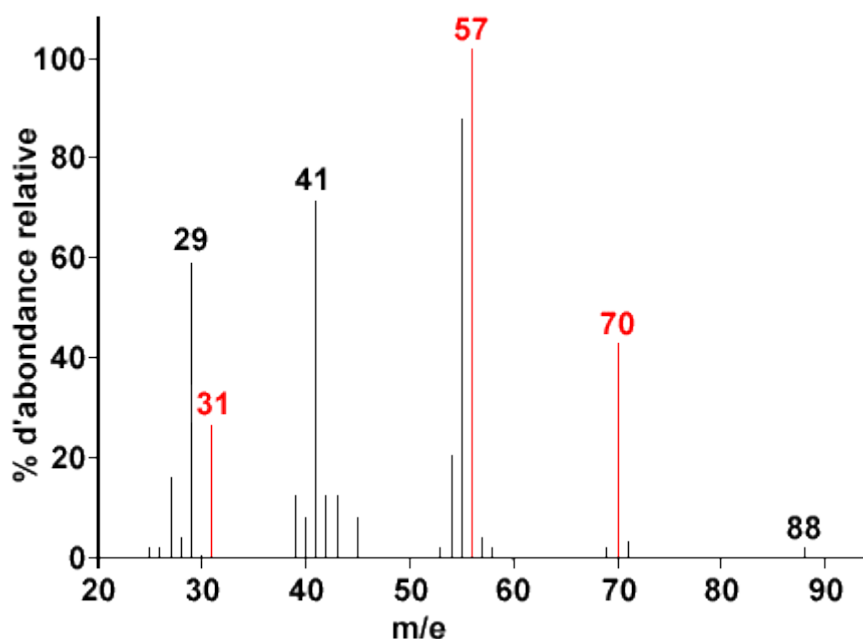
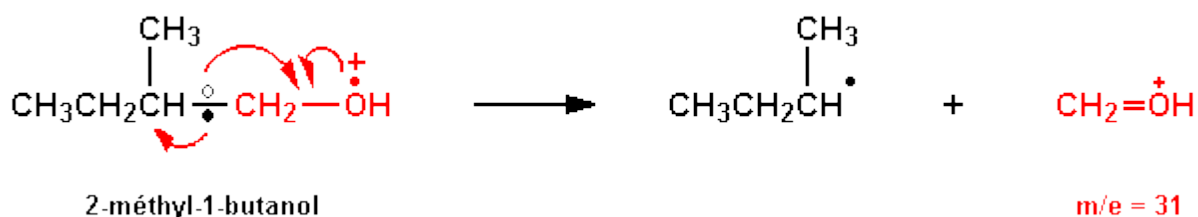
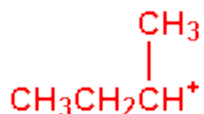


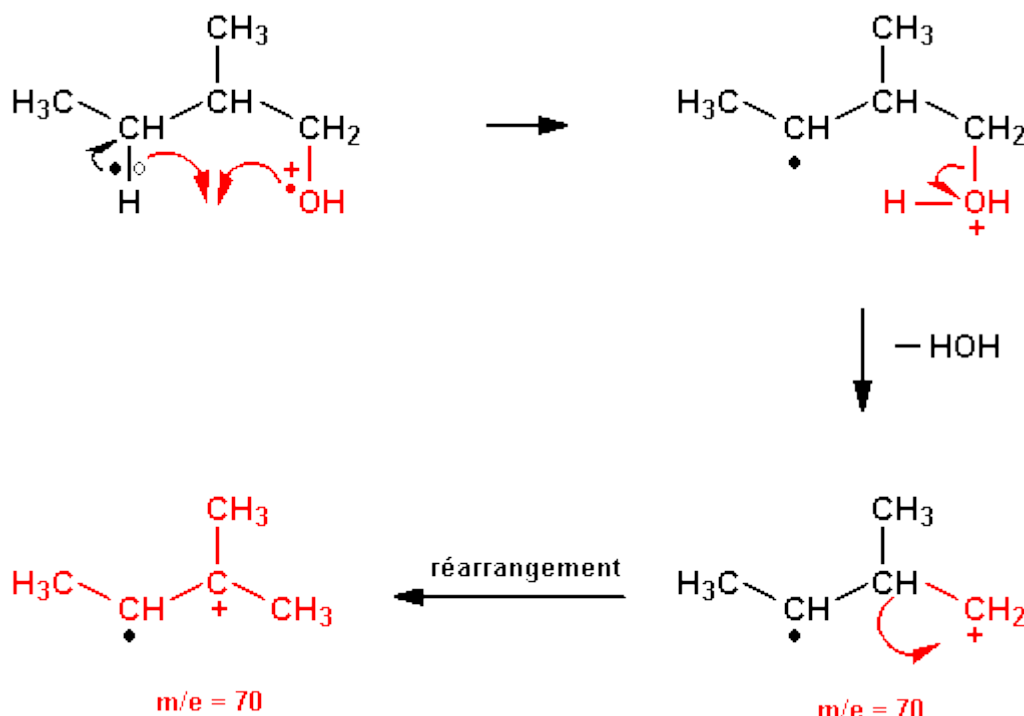
Figure 13. Spectre de masse 2-méthyl-1-butanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$ dont la masse molaire = 88 g/mol.

Le pic à $m/e = 57$ correspondrait au fragment



mais, bien qu'assez stable, il est assez difficile d'expliquer sa formation.

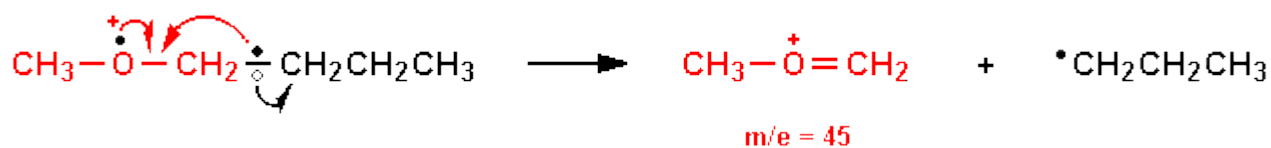
Le pic à $m/e = 70$ correspond à une déshydratation qui se ferait selon le mécanisme suivant:



LES ÉTHERS

La fragmentation des éthers se fait un peu de la même façon que celle des alcools.

a) Rupture en α du méthoxybutane.



b) Cyclisation avec formation du cyclobutane (dans ce cas particulier) et d'une molécule neutre.

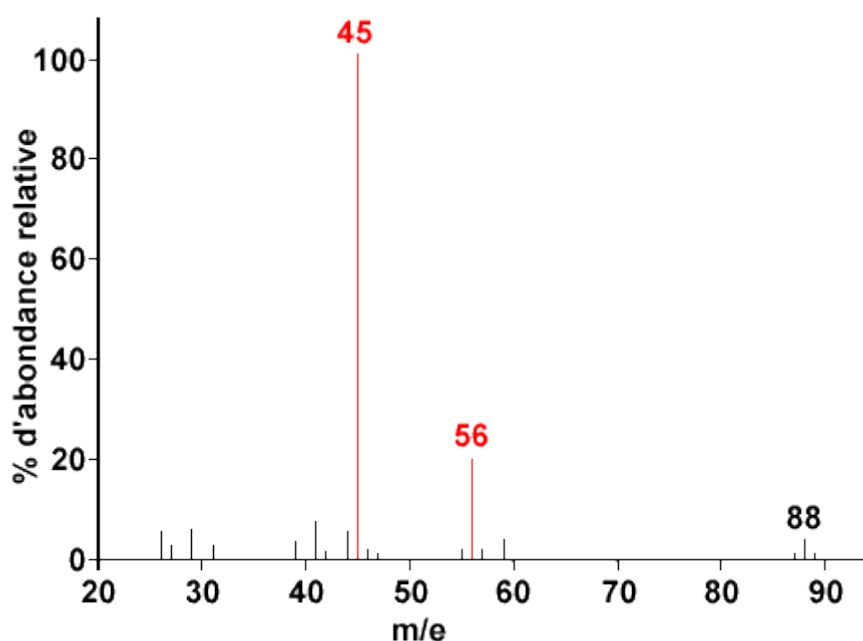
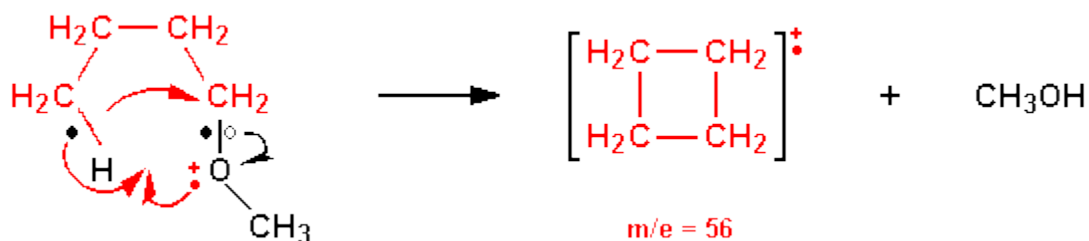


Figure 14. Spectre de masse du methoxybutane $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ dont la masse molaire = 88 g/mol.

LES AMINES

Les amines se comportent comme les alcools et les amines secondaires comme les éthers. Par exemple la fragmentation de la N-méthyl-isopropylamine donne principalement:

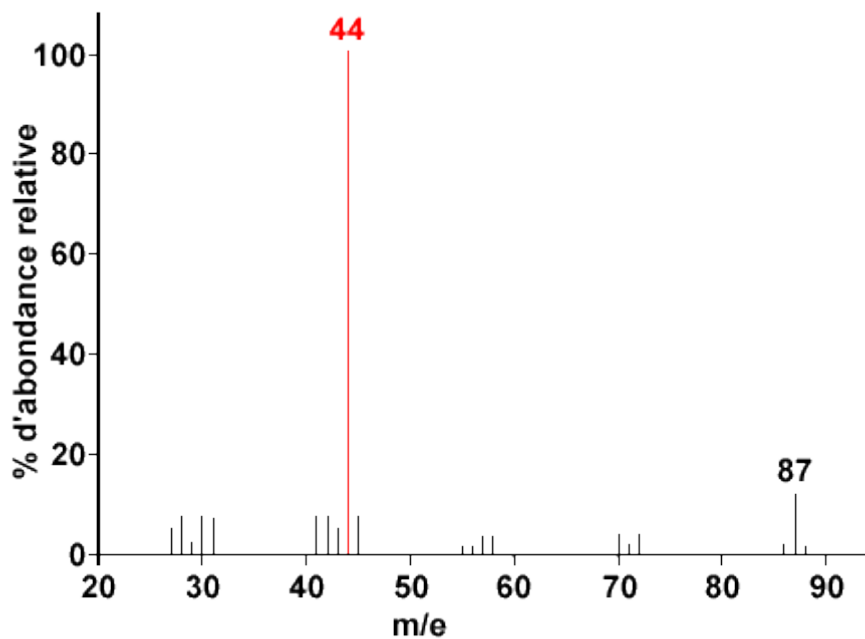
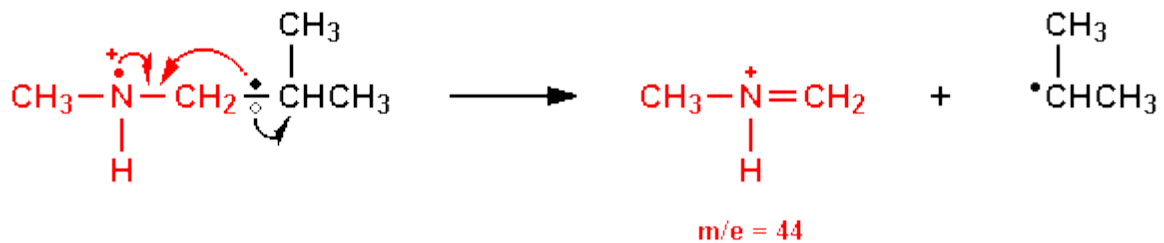
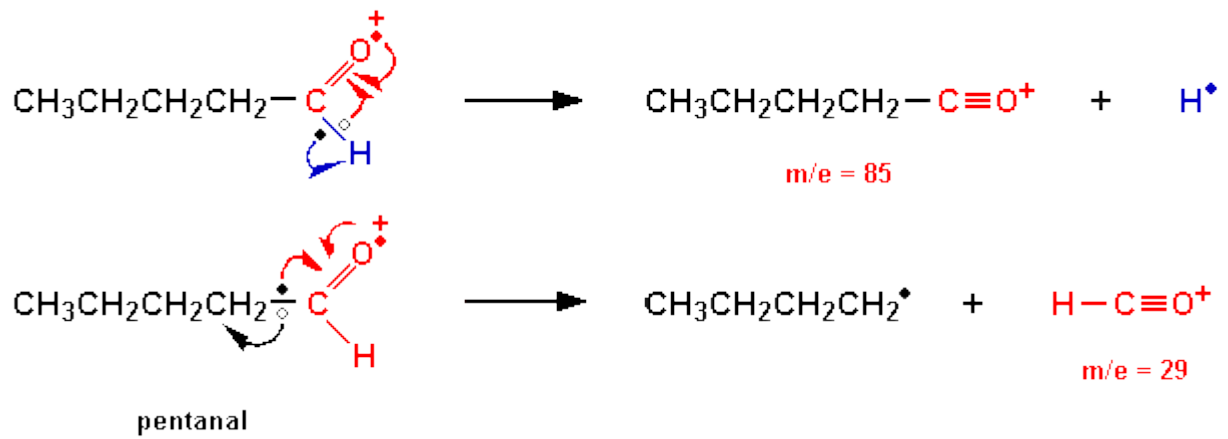


Figure 15. Spectre de masse de la N-méthyl-2-méthylpropanamine $\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ dont la masse molaire = 87 g/mol.

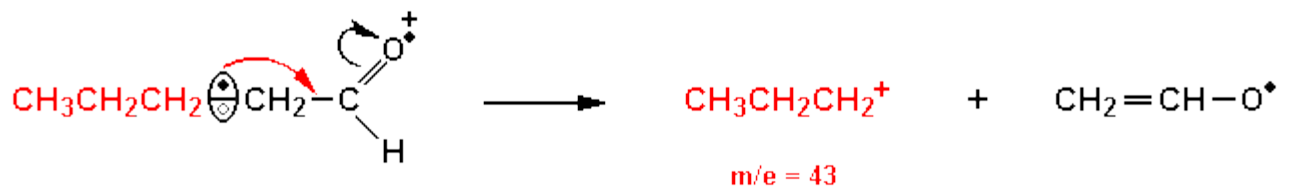
LES ALDÉHYDES

Chez les aldéhydes il y a quatre « patrons » de fragmentation. Le **pentanal** servira d'exemple.

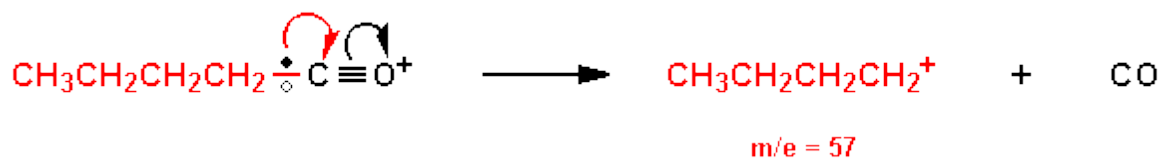
a)



b) Rupture de la liaison en β



c) Rupture de la liaison en α



d) Réarrangement de type McLafferty

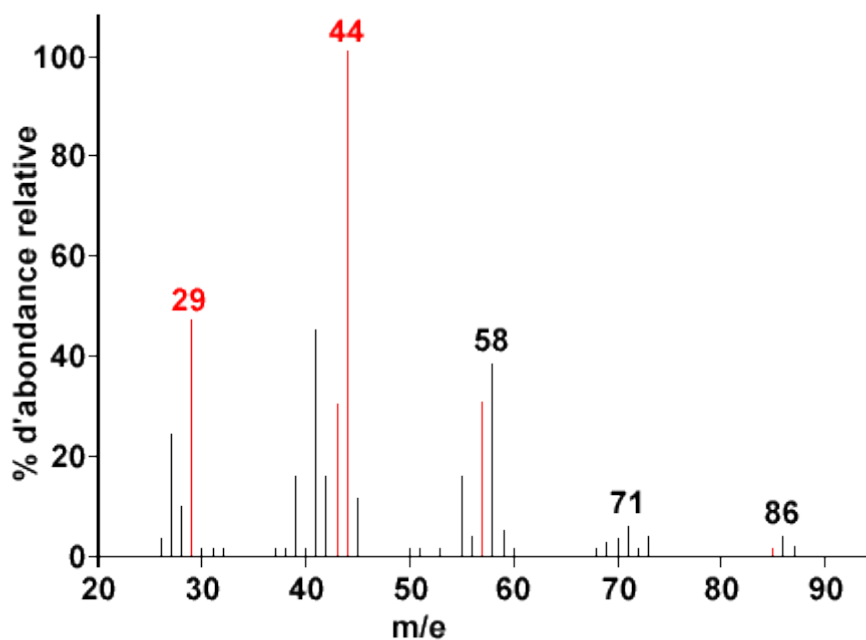
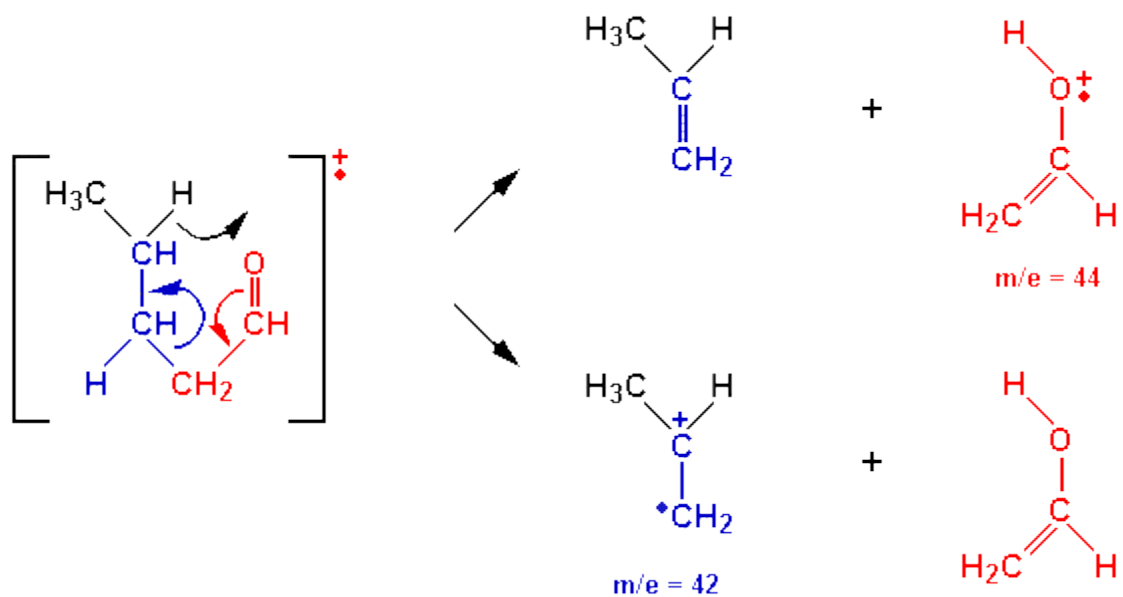
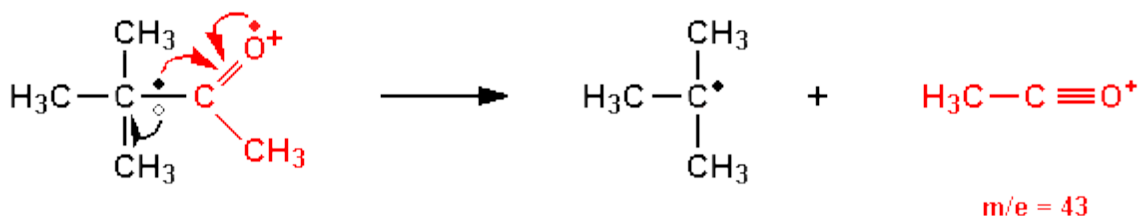


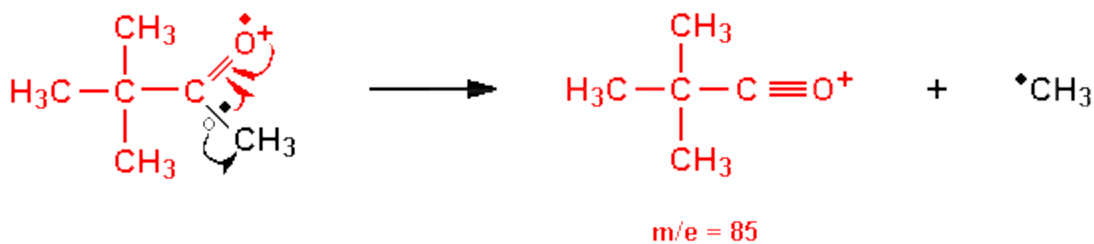
Figure 16. Spectre de masse du pentanal $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ dont la masse molaire = 86 g/mol.

LES CÉTONES

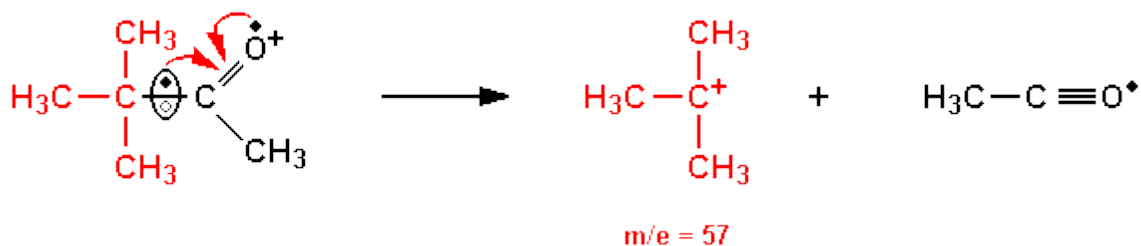
Le mode de fragmentation le plus fréquent des cétones $R'COR''$ est la rupture en α qui peut donner $R'CO^+$ ou $R''CO^+$. Ce qui donne dans le cas de la cétone dont le spectre de masse apparaît figure 17:



et dans une moindre mesure:



Le pic à $m/e = 57$ correspond au fragment qui est un carbocation très stable.



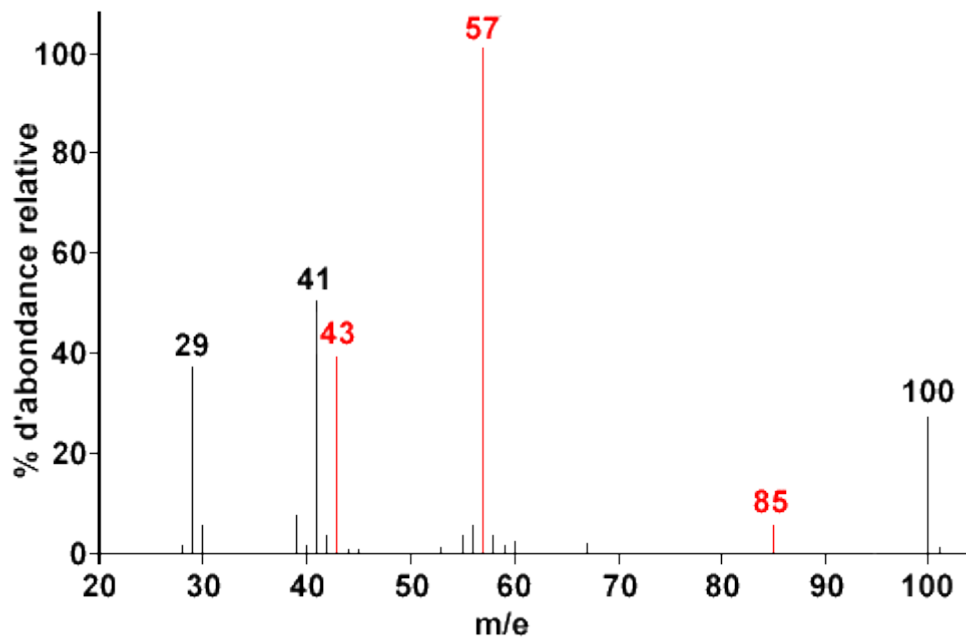
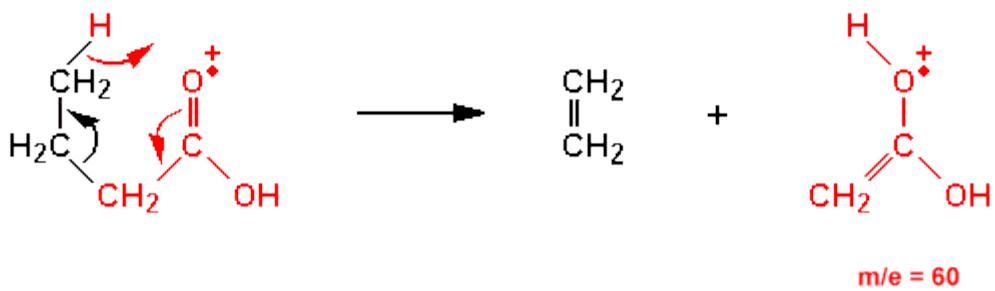


Figure 17. Spectre de masse de la 3,3-diméthyl-2-butanone $\text{CH}_3\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ dont la masse molaire = 100 g/mol.

LES ACIDES

Réarrangement de type McLafferty chez l'acide butanoïque



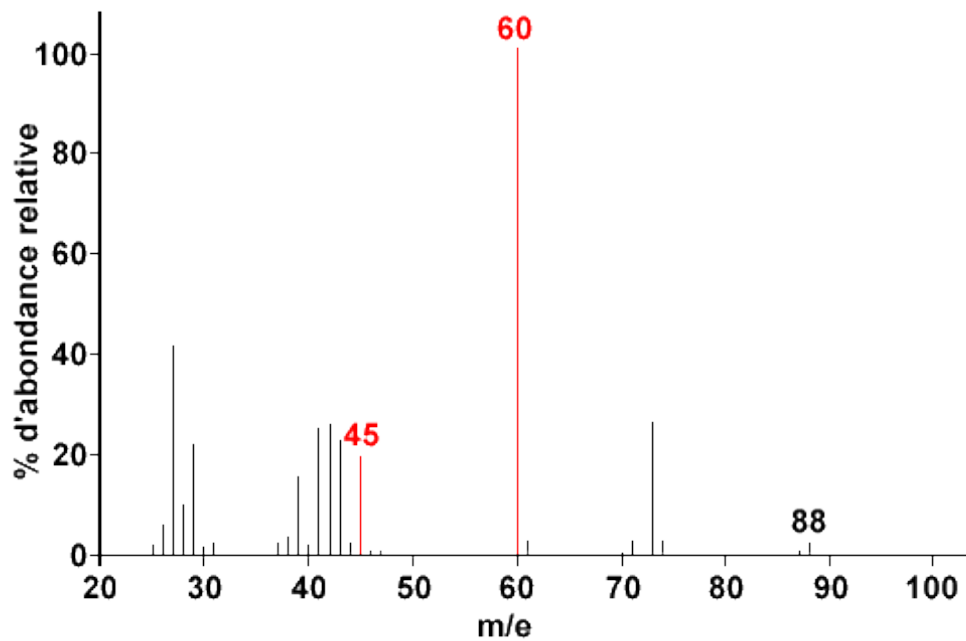
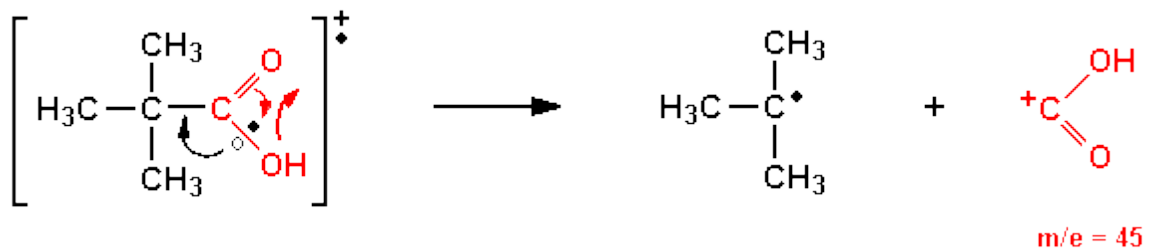
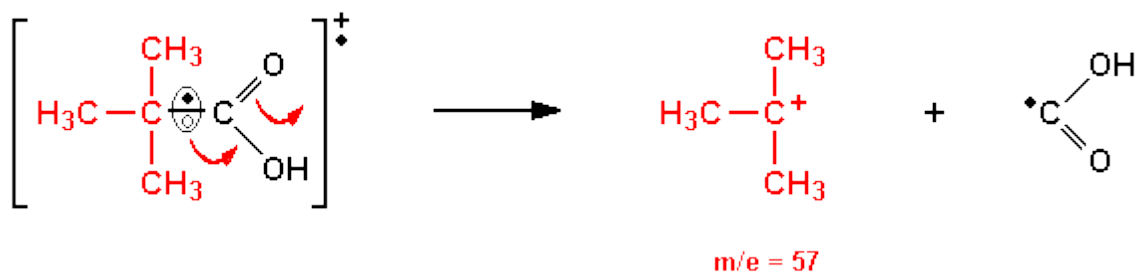


Figure 18. Spectre de masse de l'acide butanoïque $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ de masse molaire = 88 g/mol.

Fragmentation de façon à donner des carbocations très stables à $m/e = 45$ et $m/e = 57$ dans le cas de l'acide 2,2-diméthylpropanoïque. Dans la ligne du bas de ces équations il y a **rupture en α de la fonction acide ($m/e = 45$)**..



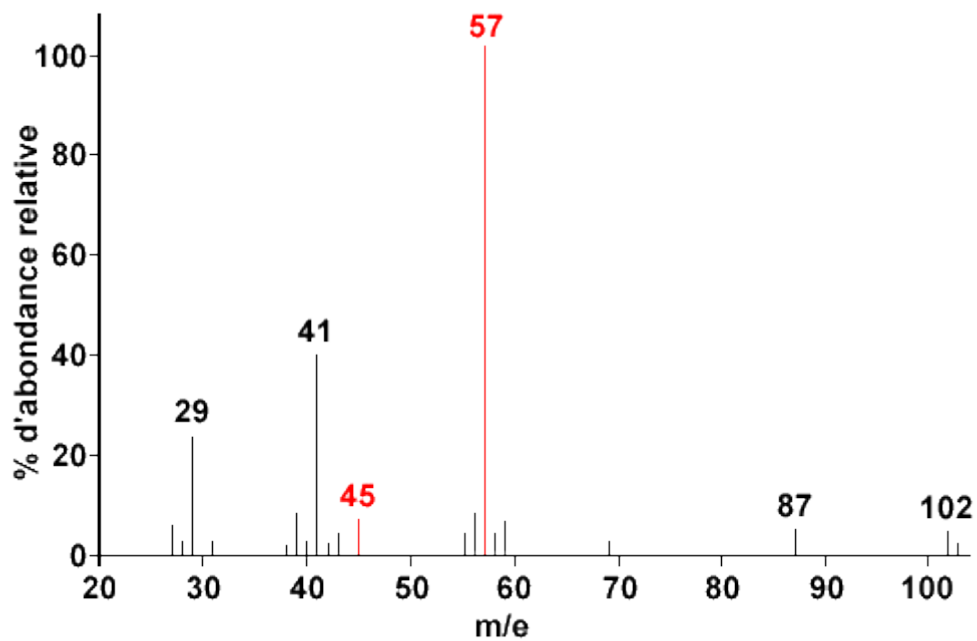


Figure 19. Spectres de masse de l'acide 2,2-diméthylpropanoïque $(\text{CH}_3)_3\text{CCOOH}$ de masse molaire = 102 g/mol.

LES ESTERS

La fragmentation des esters s'apparente à celle des acides dont voici quelques différences.

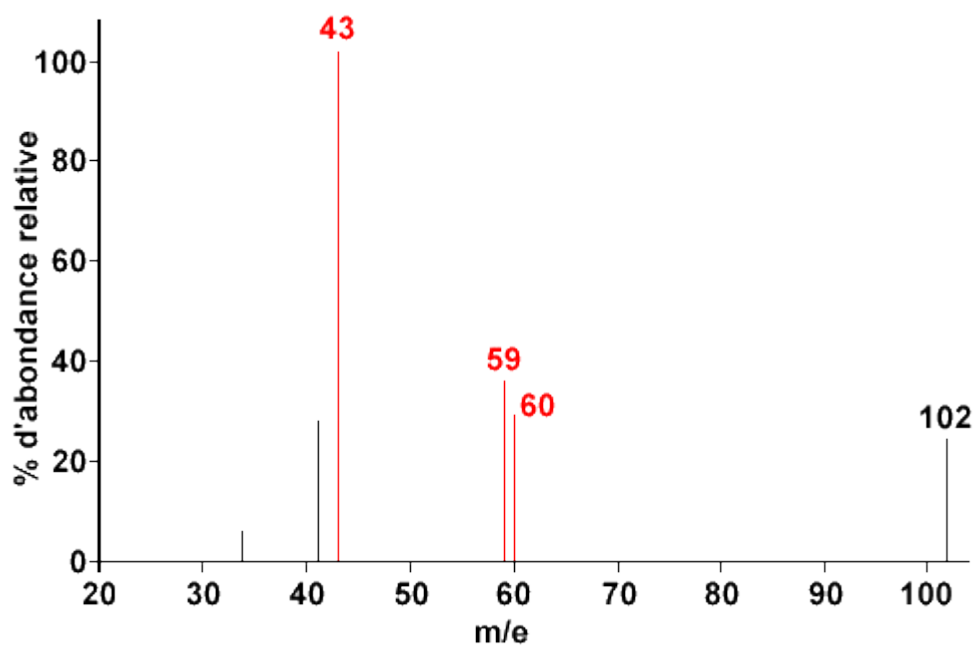
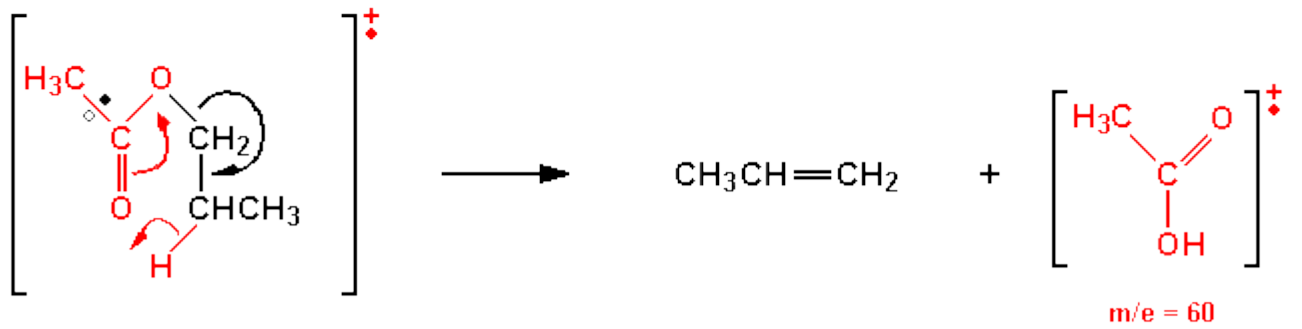
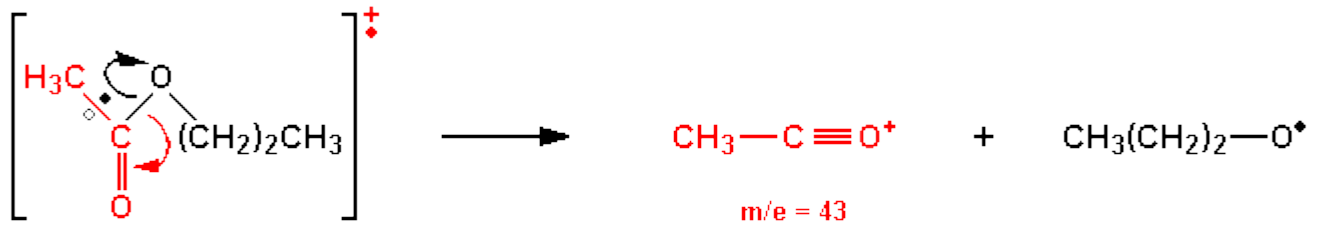
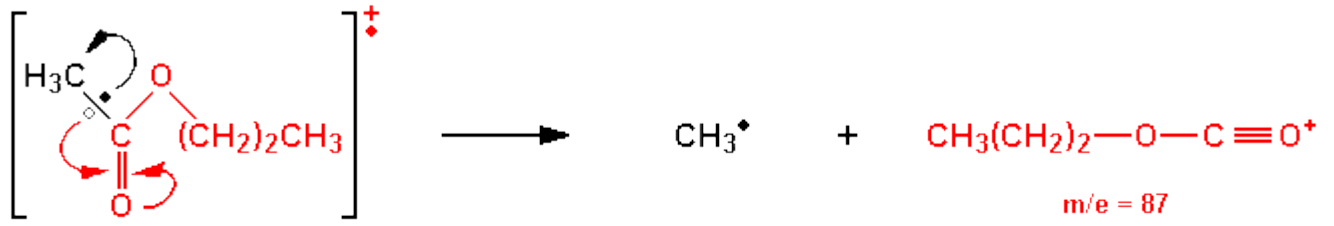


Figure 20. Spectre de masse de l'éthanoate de propyle $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ dont la masse molaire = 102 g/mol.

Pour ce qui est de l'autre ester, le spectre de masse du propanoate d'éthyle semble plus compliqué.

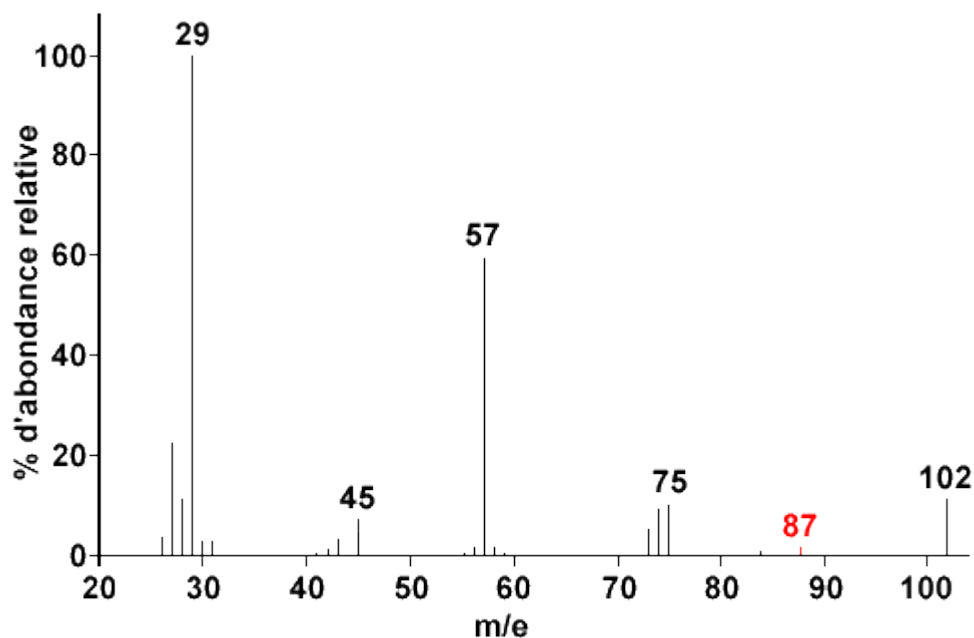


Figure 21. Spectre de masse du propanoate d'éthyle $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ dont la masse molaire = 102 g/mol.

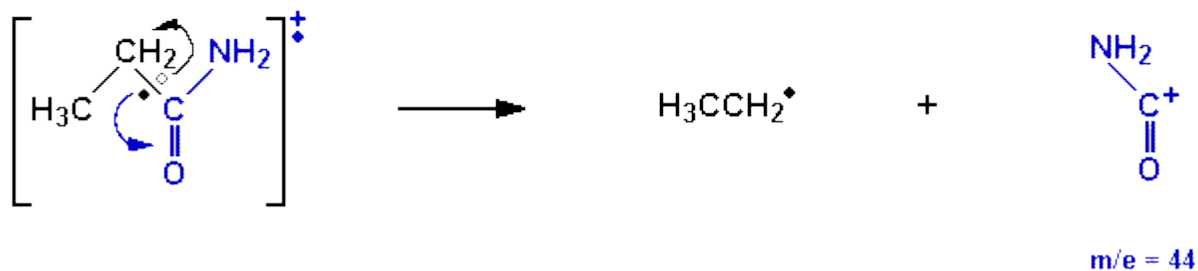
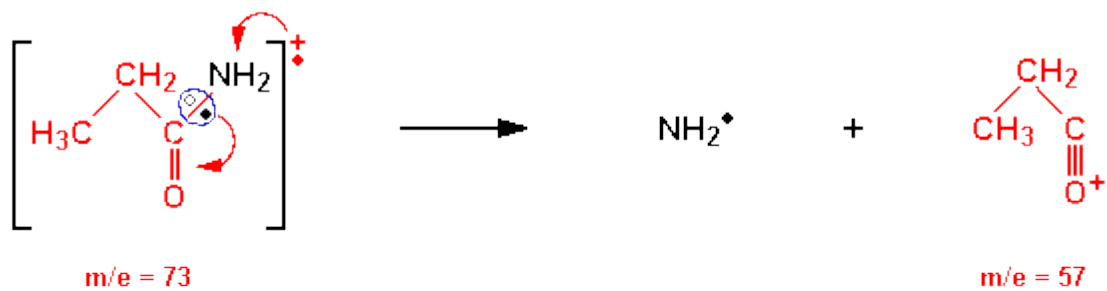
LES AMIDES

a) Le propanamide

L'ion moléculaire est habituellement observable et fournit une bonne indication de la présence d'un amide.

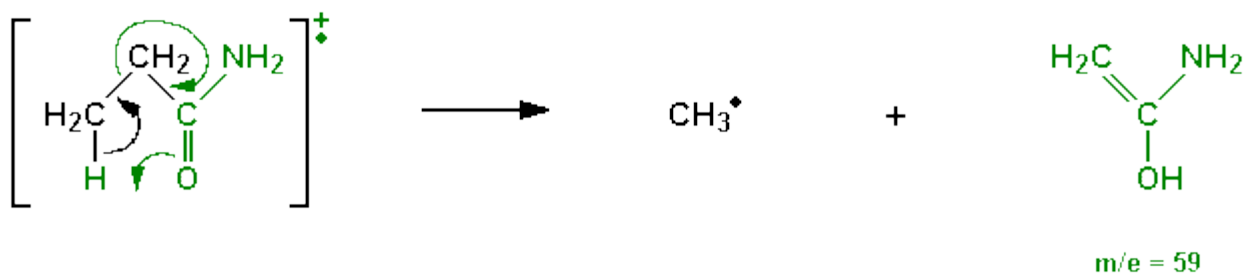
Un patron important de fragmentation implique la rupture de la liaison en α (rupture d'une ou de l'autre vers la liaison double $\text{C}=\text{O}$).

Les fragments importants sont:



Le réarrangement McLafferty peut impliquer les fonctions amides du côté chaîne alcoyle.

Voici ce réarrangement :



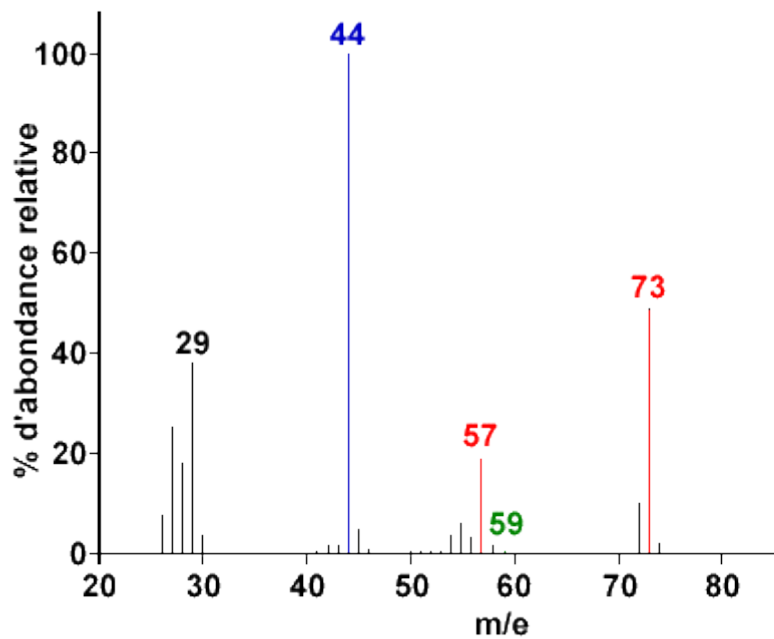
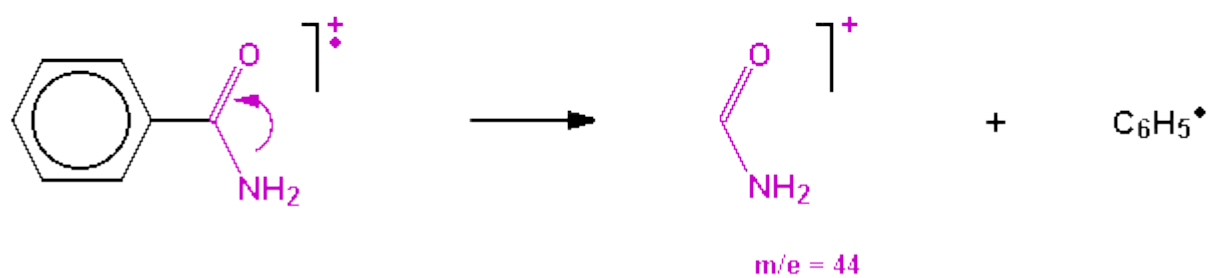
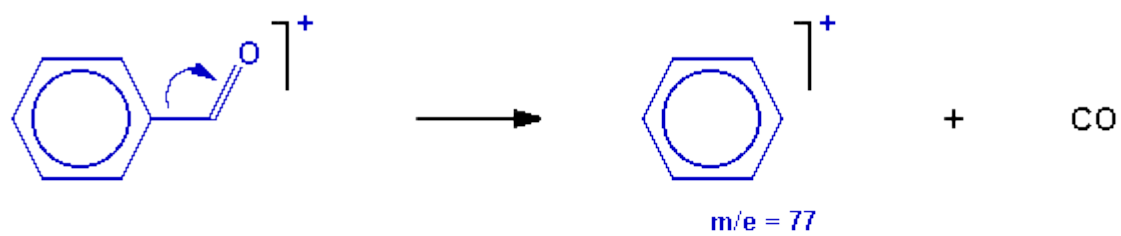
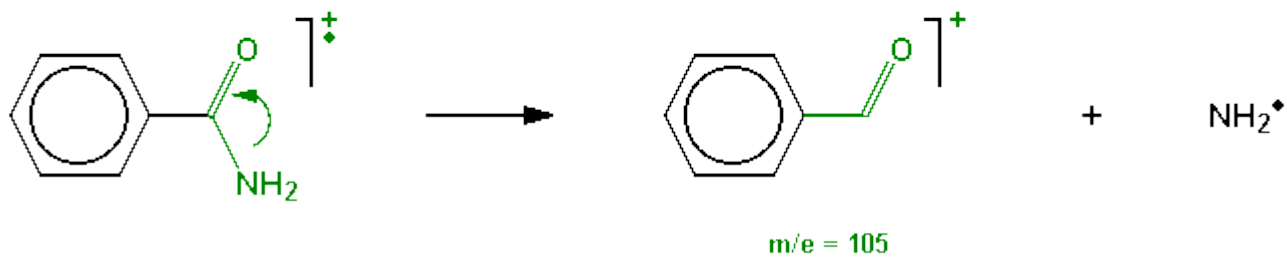
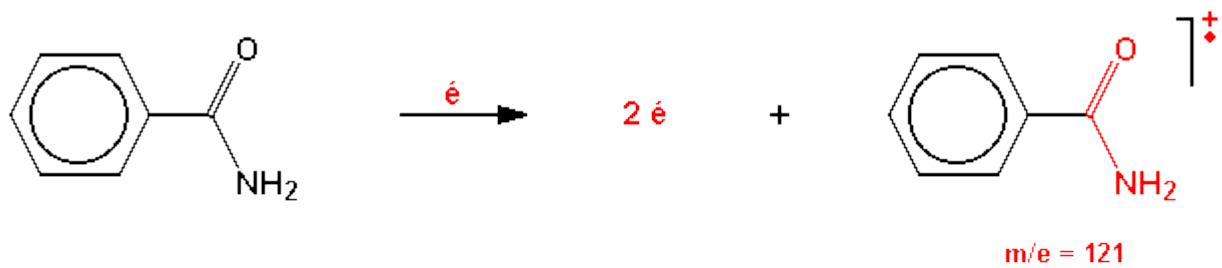


Figure 22. Spectre de masse du propanamide $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONH}_2$ dont la masse molaire = 73 g/mol.

b) Le benzamide

Différents types d'ions sont produits dans le processus d'ionisation. Le fait de ne perdre qu'un électron fait retrouver la présence de la molécule dans son entier, surtout si la molécule est stable comme un aromatique.

Les fragments importants sont:



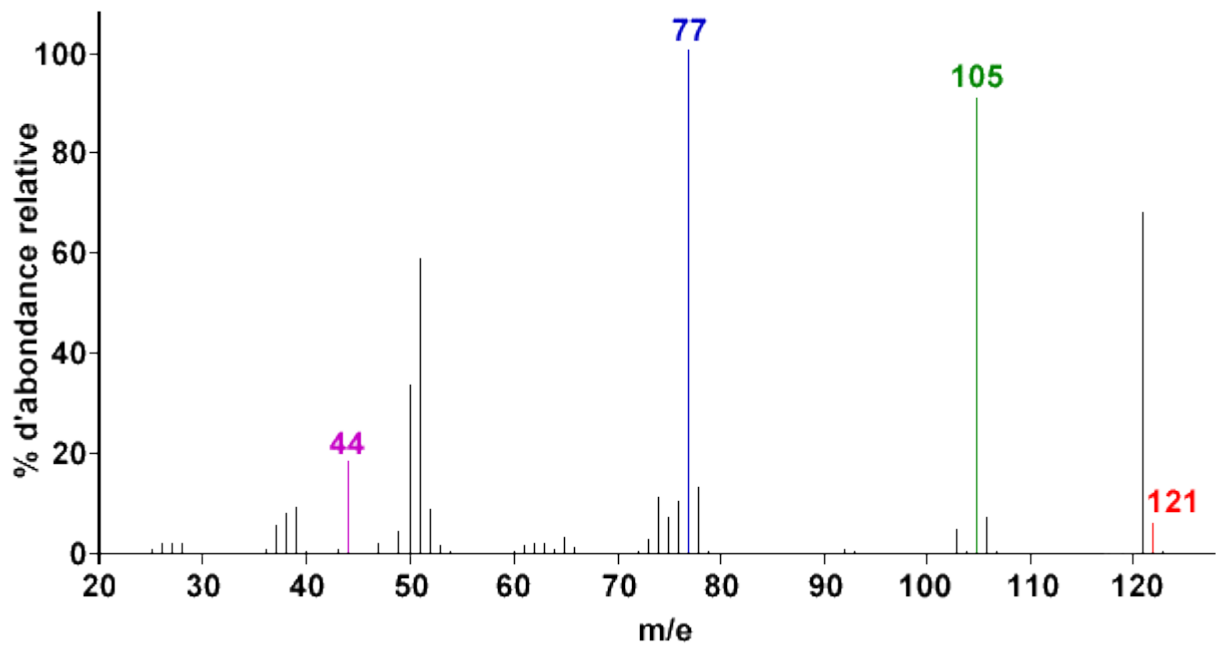


Figure 23. Spectre de masse du benzamide ArCONH₂ dont la masse molaire = 121 g/mol.

ANALYSE DE QUELQUES MOLÉCULES

Exemple #1. Analyse de C₅H₁₂O de masse molaire 88,15 dont voici le spectre de masse:

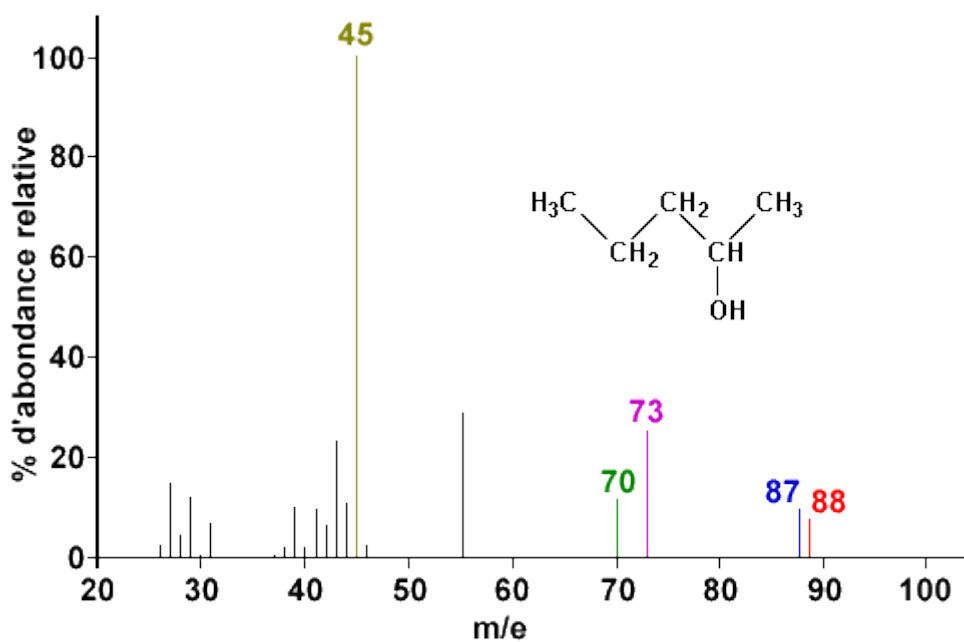
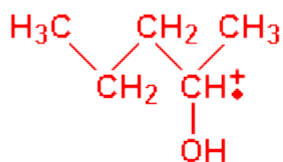
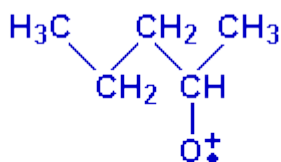


Figure 24. Spectre de masse du 2-pentanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ dont la masse molaire = 88,15 g/mol.

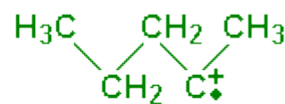
Les principaux fragments sont:



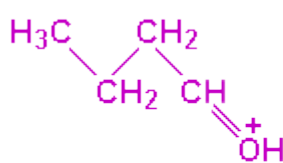
$m/e = 88$



$m/e = 87$



$m/e = 70$



$m/e = 73$



$m/e = 45$

La formule moléculaire indique une molécule saturée sans lien double ni carbonyle ni cycle.

L'ion moléculaire est très faible de même que l'abondance relative de l'ion $m-1$, ce qui est un signe de la présence d'un alcool. Le pic à **$m-15$** représente la perte d'un groupe méthyle et celui à **$m-17$** la perte d'un radical hydroxyle $-\text{OH}$. Le pic le plus grand correspond habituellement à un ion oxonium $\text{R}'-\text{CR}''=\text{OH}^+$. Ici le pic à 45 correspond à $\text{CH}_3\text{CH}=\text{OH}^+$.

Exemple #2. Analyse de $\text{C}_7\text{H}_7\text{Br}$ de masse molaire 171,04 dont voici le spectre de masse:

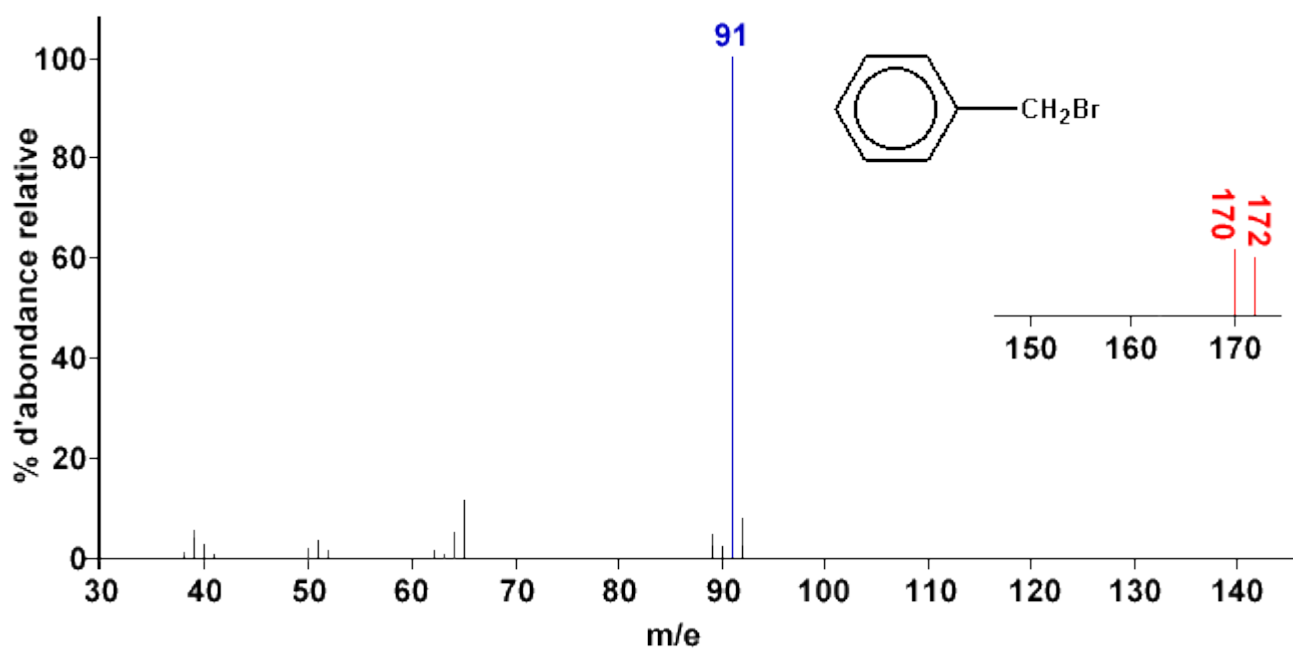
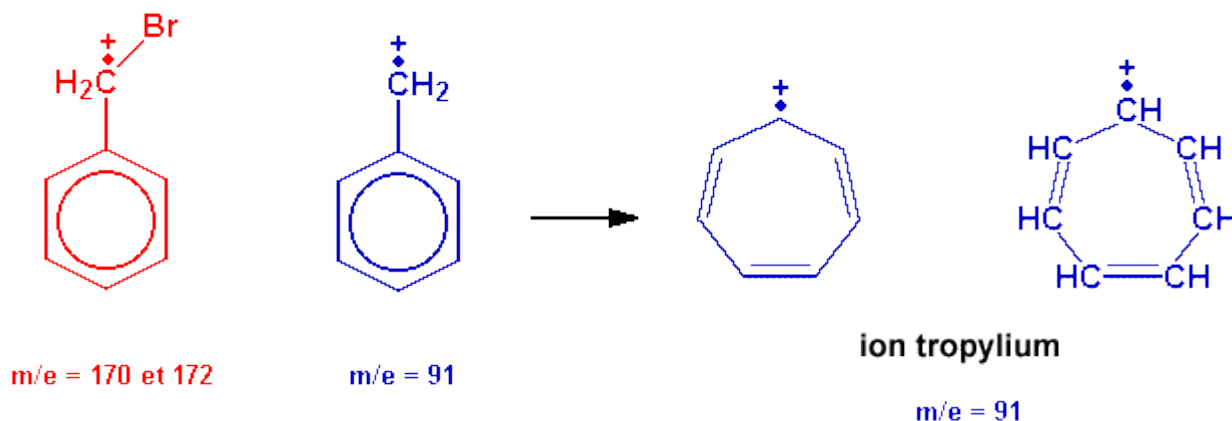


Figure 25. Spectre de masse du bromure de benzyle $ArCH_2Br$ dont la masse molaire = 171,04 g/mol.

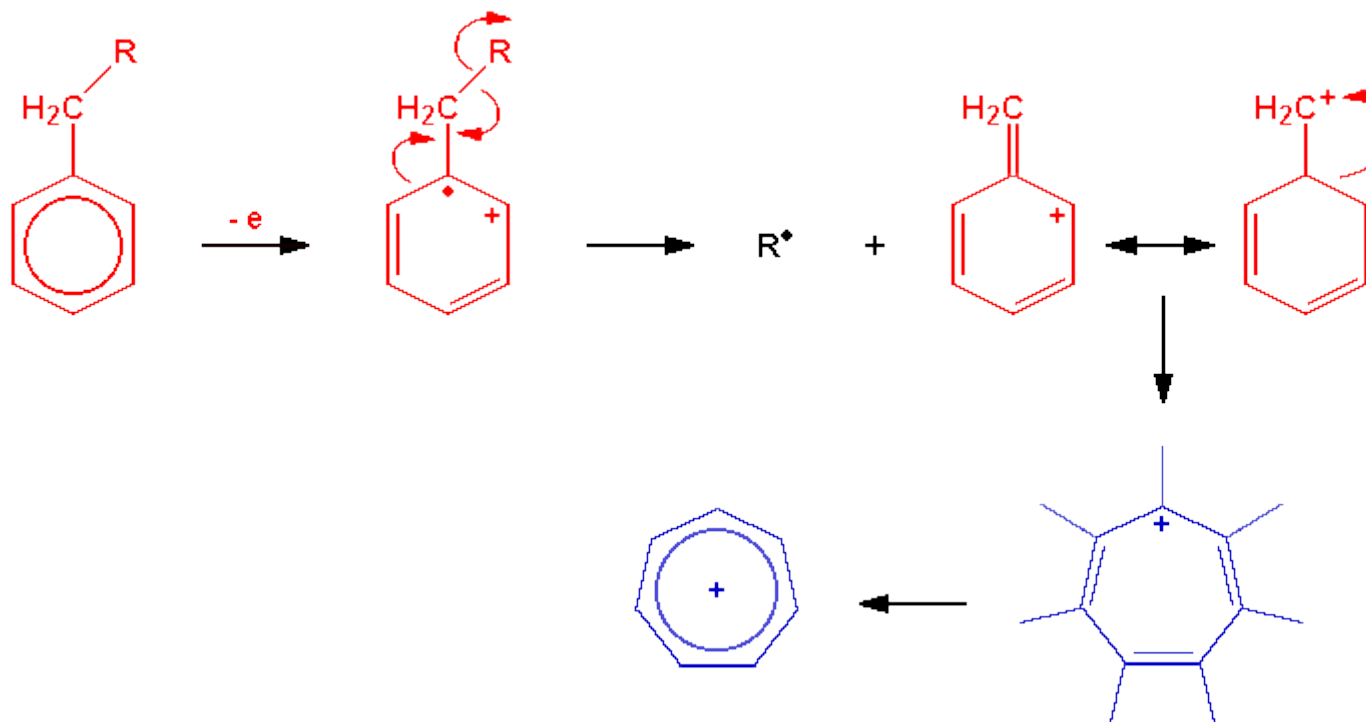
Les principaux fragments sont:



D'après la formule molaire, cette molécule possède 4 degrés d'insaturation; ce qui fait penser à une structure aromatique.

Le spectre montre autour de l'ion moléculaire deux pics assez petits et d'égale intensité suggérant la présence des deux isotopes du brome: $Br^{79,92}$ et $Br^{80,92}$. Le pic le plus important à $m/e = 91$ correspond à l'ion benzylique.

De façon générale, la formation de l'ion tropylium se fait comme ceci:



Exemple #4. Analyse de $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$ de masse molaire 192,21 dont voici le spectre de masse:

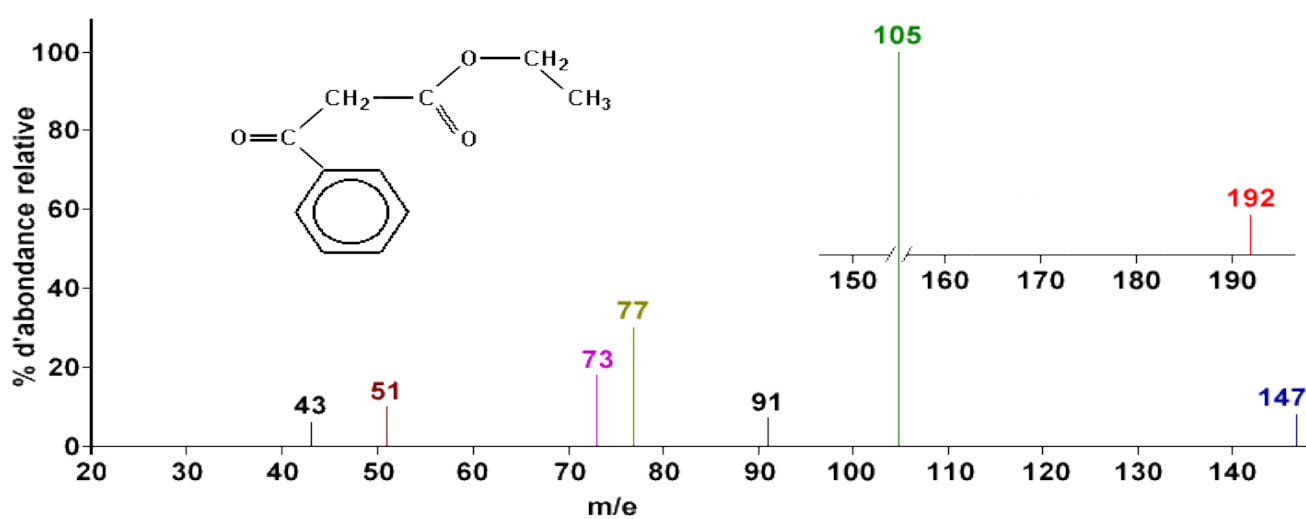
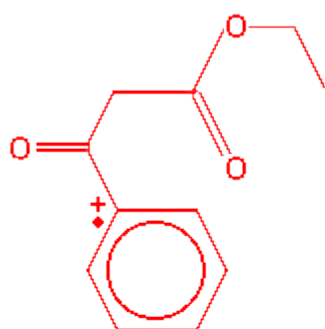
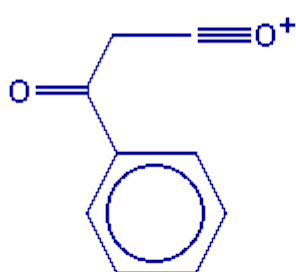


Figure 27. Spectre de masse du benzoylacétate d'éthyle (3-oxo-3-phénylpropanoate d'éthyle) $\text{ArCOCH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ dont la masse molaire = 192,21 g/mol.

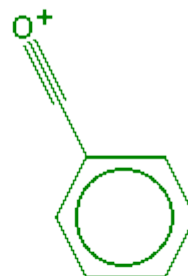
Les principaux fragments sont:



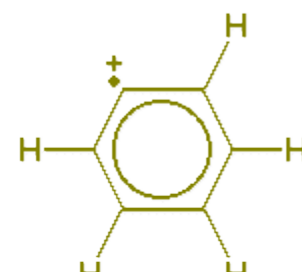
$m^+ = 192$



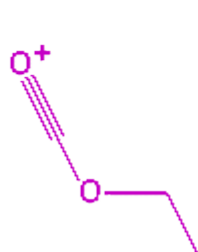
$m/e = 147$



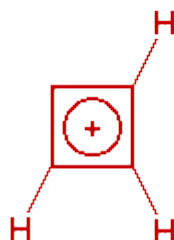
$m/e = 105$



$m/e = 77$



$m/e = 73$



$m/e = 51$

D'après la formule molaire, cette molécule possède 6 degrés d'insaturation; ce qui fait penser à une structure aromatique.

Le spectre montre autour de l'ion moléculaire assez faible et le pic à **m-45** suggère la présence d'un groupe éthoxy, $-O-CH_2CH_3$. Le pic le plus important à **m/e = 105** correspond à un carbonyle fixé à un groupe aromatique. Il y a aussi deux pics importants à **m/e = 73** et **m/e = 77**.

IDENTIFICATION DES PROTEINES

Spectrométrie de masse et recherche dans les banques de données

L'avancée majeure en termes d'identification des protéines des gels 2D (1993-1994) correspond à l'utilisation conjointe de la **spectrométrie de masse** et des **banques de données**. En s'adaptant à la biologie structurale, la spectrométrie de masse a permis de déterminer avec une sensibilité et une précision extrêmes la masse des molécules. Un spectromètre de masse se compose d'une source où s'effectuent l'**ionisation** et la désorption des ions, d'un analyseur où les ions sont séparés en fonction de leur **rapport masse sur charge (m/z)** et d'un détecteur permettant l'enregistrement et la quantification des ions.

Pour l'étude des composés peptidiques, deux modes d'ionisation sont principalement utilisés :

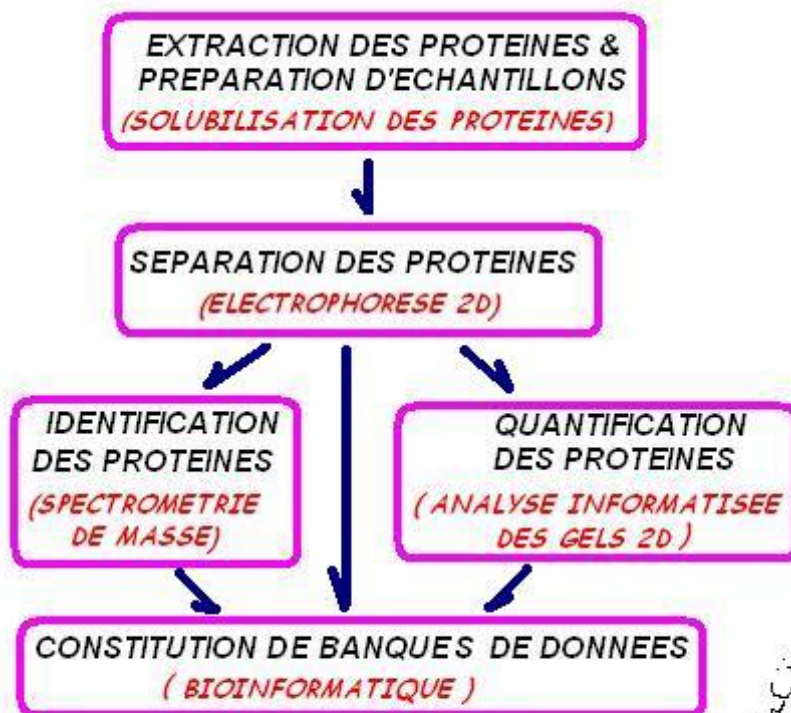
- la désorption/ionisation laser assistée par matrice (**Maldi-Tof**) qui permet de réaliser une empreinte peptidique après digestion protéolytique (empreintes peptidiques)
- la spectrométrie de masse en tandem en mode nanospray (**MS-MS**) qui permet d'obtenir une microséquence en acides aminés.

PRINCIPALES ETAPES DE LA PROTEOMIQUE :

- Extraction des protéines et préparation des échantillons
- Séparation des protéines (Electrophorèse bidimensionnelle, Chromatographie liquide en phase inverse par hydrophobicité ou par exclusion de taille selon le volume occupé)
- Révélation des protéines dans les gels puis l'analyse d'image des gels pour les quantifier.
- Récupération des spots de protéines pour l'hydrolyse chimique ou enzymatique.

- *Le cas échéant, la détermination de la séquence N-terminale par la dégradation d'Edman dans le but de rechercher des candidats dans les banques de données*
- Obtention de cartes peptidiques massiques par des techniques de spectrométrie de masse
- Détermination de la séquence complète des protéines par des techniques de spectrométrie de masse dites en tandem
- Analyse bioinformatique (identification des protéines, annotation des protéines et des gènes, recherche de motifs structuraux, analyse des structures, ...)

Schématiquement, les étapes de l'analyse protéomique sont les suivantes :



PROTEOMIQUE. LES GRANDES ETAPES

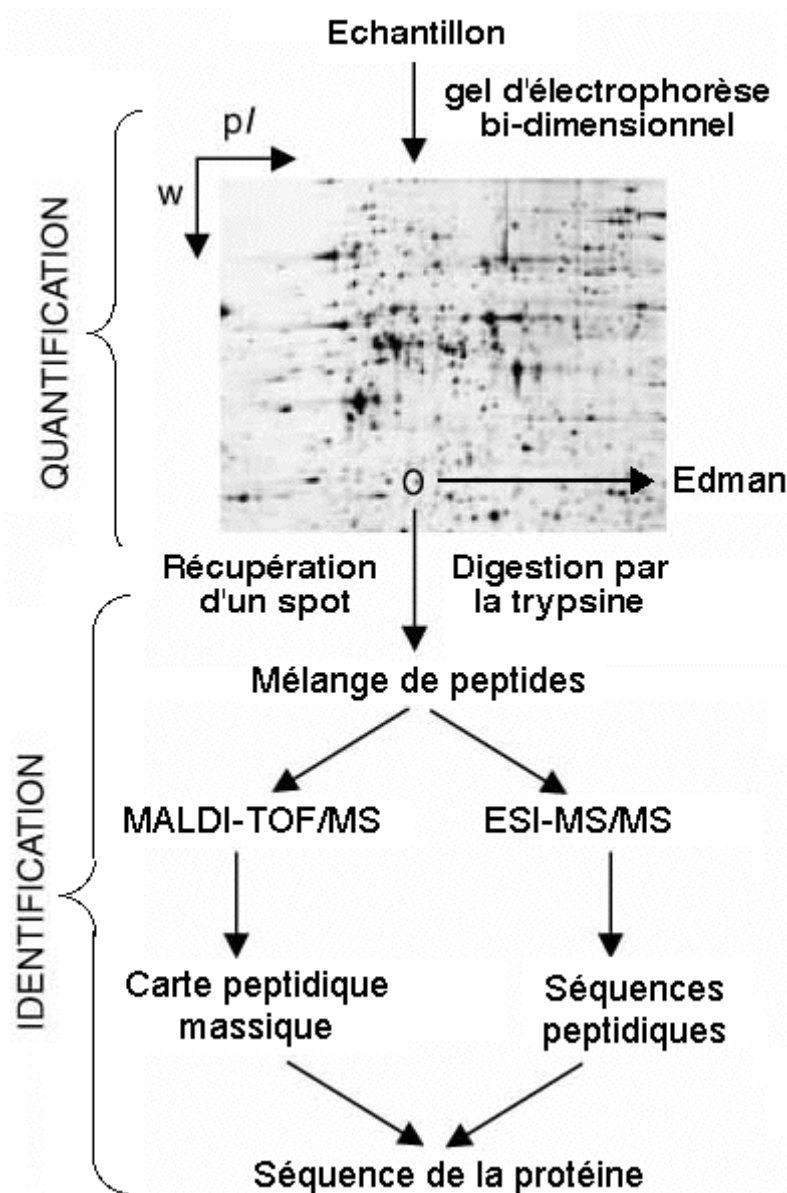


Figure adaptée de Peng & Gygi (2001)

L'hydrolyse des protéines par la trypsine

La ou les protéines contenue(s) dans un spot de l'électrophorèse bi-dimensionnelle est (sont) **hydrolysée(s)** c'est-à-dire coupées en fragments plus petits : des peptides, différents agents sont utilisés à cet effet, ils ont la particularité de couper une séquence protéique après certains acides aminés spécifiques, il est donc possible de choisir ces agents en fonction de la composition en acides

aminés de la protéine d'intérêt. La majorité de ces agents sont des enzymes les plus fréquentes sont les **protéases à sérine** (essentiellement endopeptidase). En général, on utilise la trypsine, la LysC, la **chymotrypsine**.

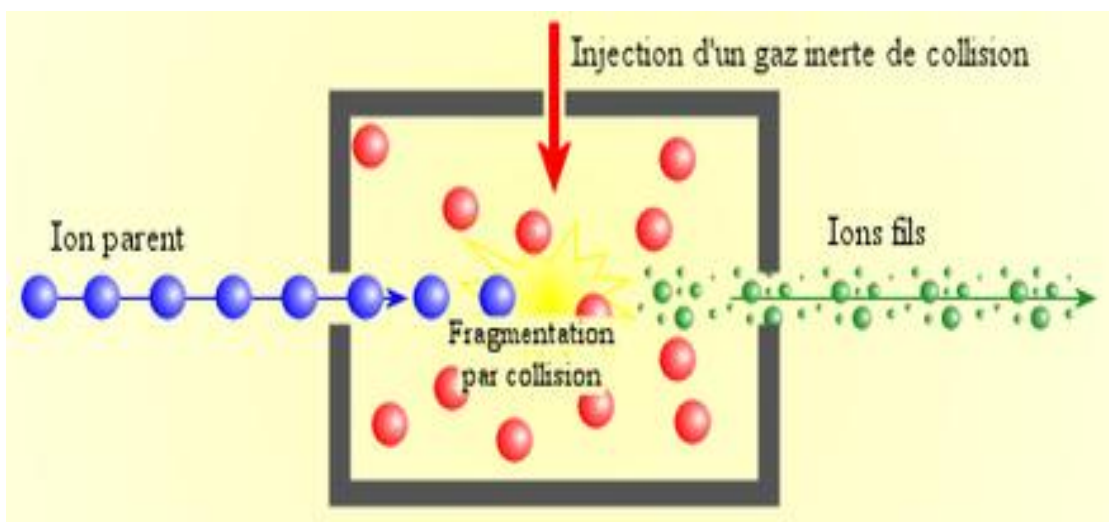
Séquençage par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse MS/MS permet de déterminer la séquence des peptides sur quelques dizaines d'acides aminés. Couplé avec des techniques de digestion (enzymatiques ou chimiques) et avec des techniques de séparation (chromatographie en phase liquide à haute performance par exemple), il est possible de caractériser une protéine.

Principe de la fragmentation

La fragmentation est le processus permettant de séparer chaque acide aminé d'un peptide. Pour des raisons de stabilité des liaisons, les séquences polypeptidiques se clivent préférentiellement au niveau des liaisons peptidiques. Il existe cependant des mécanismes complexes qui produisent d'autres types ruptures de liaison, ce qui peut rendre difficile la lecture des spectres de masses et la détermination de la séquence.

Spectrométrie de masse MS/MS



Pour fragmenter les peptides, on utilise soit plusieurs analyseurs couplés en série (spectromètre de type triple quadripoles QqQ ou de type quadripole-temps de vol Q-TOF) ou un analyseur capable de réaliser plusieurs analyses en série (spectromètre de masse de type trappe ionique IT ou de type résonance cyclotronique FT-ICR).

- Le premier analyseur permet de sélectionner un ion à fragmenter (appelé "ion parent") et d'exclure tous les autres ions présents.
- Cet ion parent est fragmenté, en général par collision avec un gaz inerte (c'est-à-dire qui ne réagit pas chimiquement avec l'ion parent) dans une cellule de collision. Cette fragmentation permet de "casser" les liaisons moléculaires, en particulier les liaisons peptidiques, et de produire des "ions fils".
- Les ions fils sont ensuite séparés par le second analyseur puis détectés.

Mode d'analyse possible

Il existe plusieurs modes d'analyse en spectrométrie de masse en tandem :

- *Fragment ion scan* (ou *Product ion scan'* ou *Daughter scan*)

Dans ce mode, un ion parent de rapport m/z donné est sélectionné. Il est fragmenté puis l'ensemble de la gamme de masse est balayée pour analyser les ions fils produits.

- *Precursor ion scan* (ou *Parent scan*)

Dans ce mode, un seul ion fils de rapport m/z donné est analysé. L'ensemble de la gamme de masse des ions parents est balayé. Ce mode permet d'analyser les ions parents qui produisent spécifiquement un ion fils donné.

- *Neutral ion scan*

Dans ce mode, les ions parents et les ions fils sont analysés sur l'ensemble de la gamme de masse. On choisit une masse m_1 , on balaye les ions parents sur l'ensemble de la gamme de masse et l'on analyse les ions fils produits de masse $m_2 - m_1$. Ce mode permet d'étudier les ions parents qui peuvent perdre un fragment neutre (et qui ne peut donc pas être analysé par le second balayage). Par exemple, on peut analyser les alcools en recherchant une différence de masse de 18 Da.

- Sans balayage

Dans ce mode, la masse de l'ion parent et de l'ion fils est déterminé. Ce mode est utilisé en quantification pour mesurer la quantité d'une molécule donnée.

Type de fragmentation

Les fragmentations peuvent être classées en fonction de leurs types :

- Fragmentation spontanée des ions métastables ou fragmentation induite par collision sur une surface (*SID Surface Induced Dissociation*), avec un gaz inerte (*CID Collision Induced Dissociation*) ou un gaz réactif (*RIM Reactant Ion Monitoring*)
- Fragmentation de haute énergie (par exemple avec un TOF/TOF), produisant beaucoup de rupture de liaisons, ou fragmentation de basse énergie, minimisant les ruptures de liaisons non peptidiques.

Stabilité des ions

En fonction de l'énergie interne des ions, les ions se fragmentent à différents temps de vie :

- ion stable : plus de 10^{-6} s
- ion métastable : entre 10^{-6} et 10^{-7} s
- ion instable : moins de 10^{-7} s

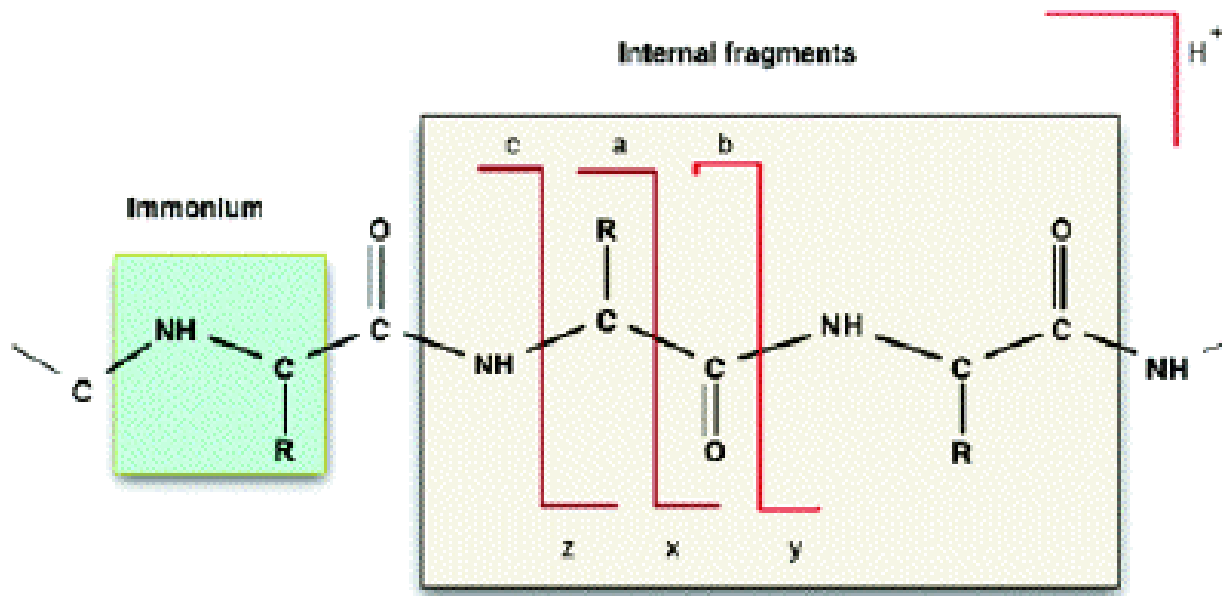
6. Quelques données pour l'interprétation des spectres de masse de peptides

a. Nomenclature des fragments peptidiques issus de la spectrométrie de masse en tandem

- Voir la nomenclature "*Mascot*"
- Roepstorff&Fohlman (1984) "*Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*" *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601

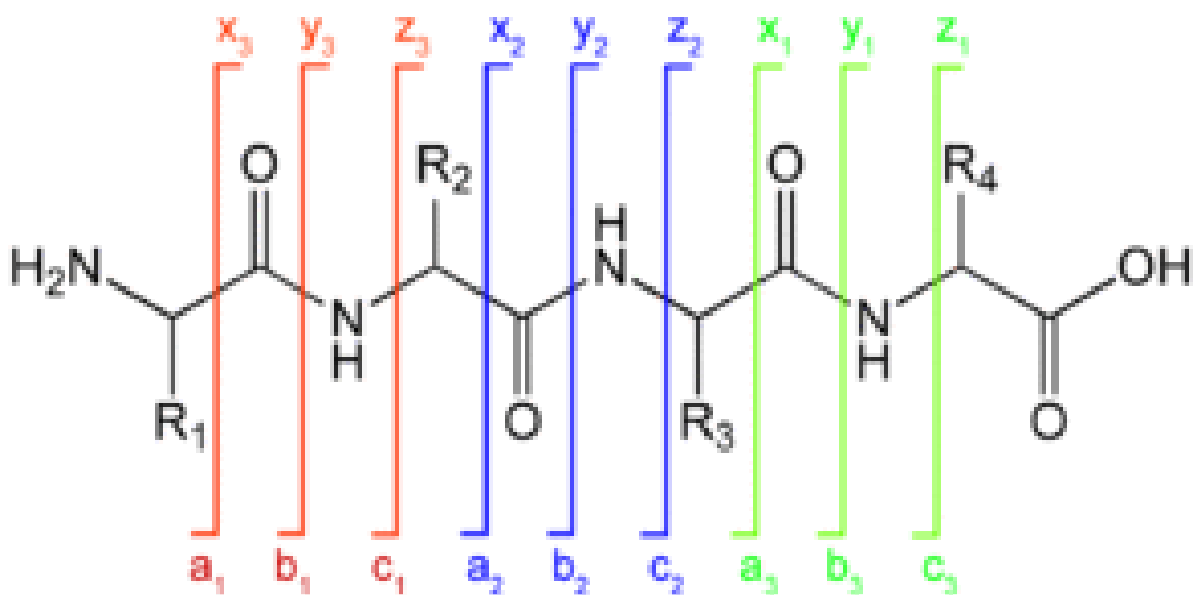
Les ions (sous-peptides ou acides aminés) qui résultent de la fragmentation des peptides par ionisation / collision sont notés de la manière suivante :

1. si la fragmentation a lieu au niveau de la liaison peptidique :



Source :Khatunet al. (2007)

- **ion b** : il contient la partie N-terminale du peptide fragmenté
- **ion y** : il contient la partie C-terminale du peptide fragmenté



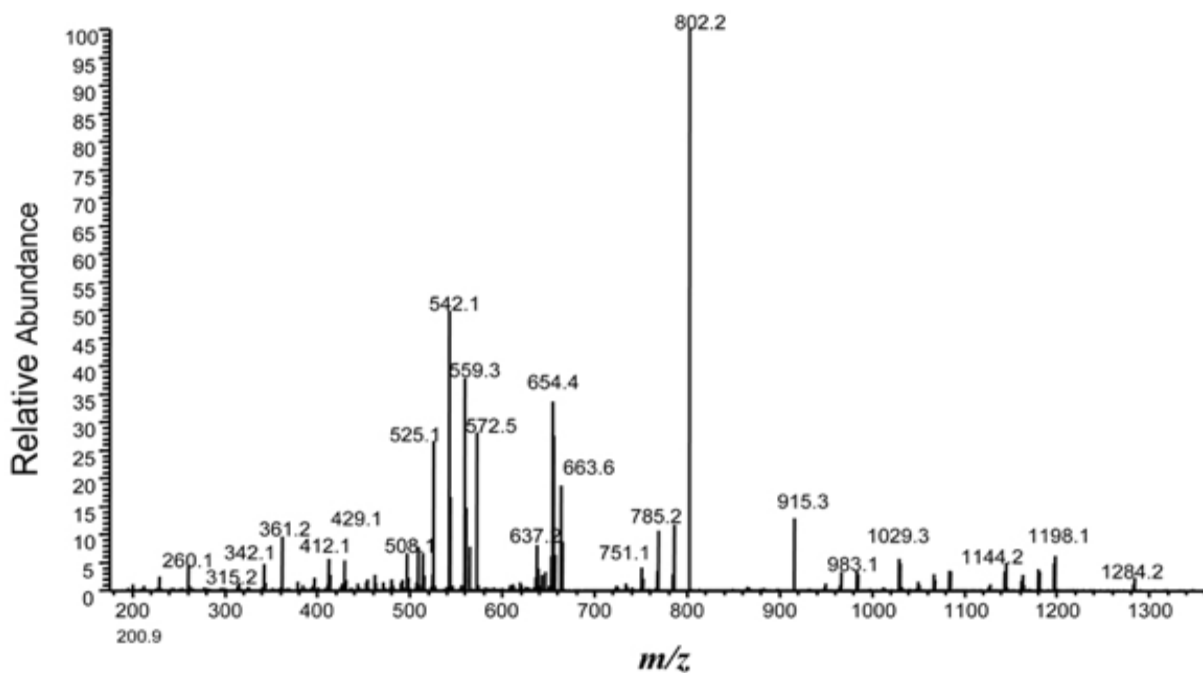
2. si la fragmentation a lieu au niveau d'une autre liaison :

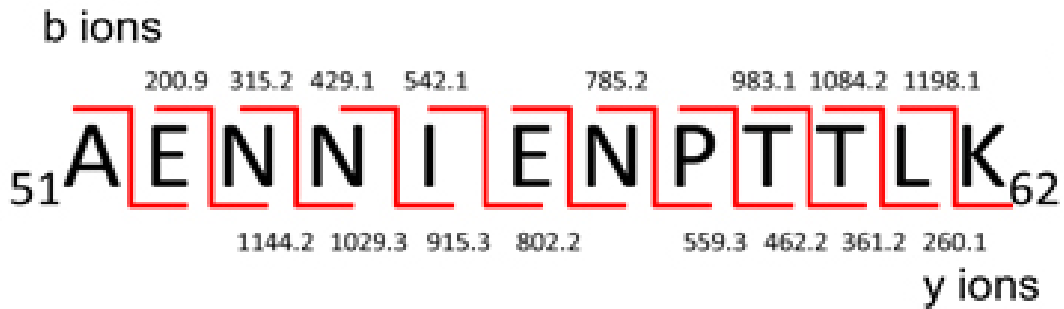
- **ion a ou c** : il contient la partie N-terminale du peptide fragmenté
- **ion x ou z** : il contient la partie C-terminale du peptide fragmenté

3. ion **immonium** : ion composé d'un fragment interne d'un seul résidu d'acide aminé (clivage mixte de type a et de type y).

Le chiffre qui accompagne la lettre indique le nombre d'acides aminés dans le fragment.

Figure ci-dessous : Exemple de diagramme de fragmentation (**en haut**) et séquence qui en est déduite.



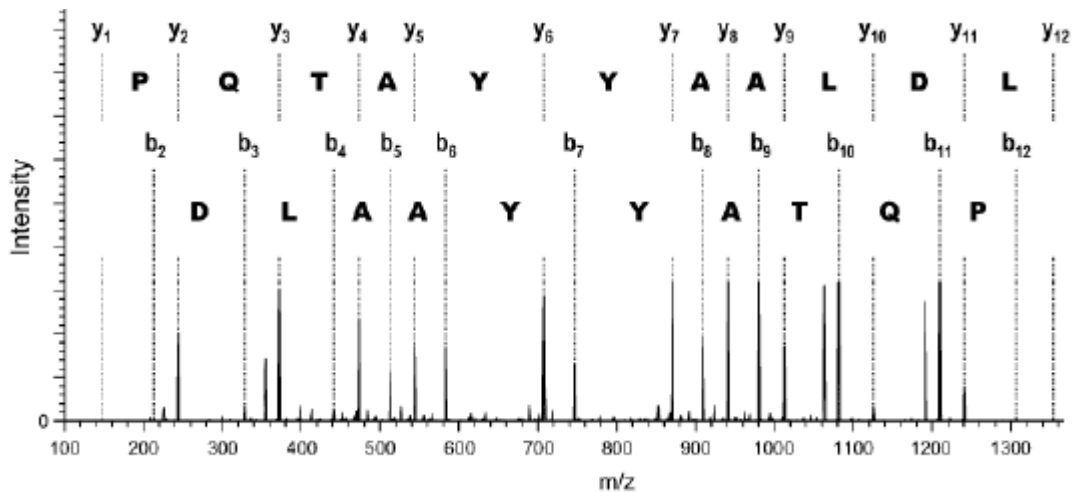


Source : Suh et al. (2011)

Les valeurs de masses des ions **b** ou **y** sont celles indiquées sur le diagramme.

Ci-dessous : spectre de masse et ions générés pour le peptide

VLDLAAYATQPK (**Brancaet al., 2007**).



	observé	213.14	328.23	441.21	512.30	583.31	746.37	909.37	980.36	1081.37	1209.41	1306.59
	théorique	213.16	328.19	441.27	512.31	583.34	746.41	909.47	980.51	1081.56	1209.62	1306.67
ions N-terminaux	b₂	b₃	b₄	b₅	b₆	b₇	b₈	b₉	b₁₀	b₁₁	b₁₂	
	V	L	D	L	A	A	Y	Y	A	T	Q	P
ions C-terminaux	y₁₂	y₁₁	y₁₀	y₉	y₈	y₇	y₆	y₅	y₄	y₃	y₂	y₁
	théorique	1353.67	1240.58	1125.56	1012.47	941.44	870.40	707.34	544.27	473.24	372.19	244.13
	observé	1353.67	1240.57	1125.57	1012.49	941.46	870.43	707.41	544.39	473.33	372.28	244.18

b. Valeurs de masses monoisotopiques et moyennes des résidus d'acides aminés

Acide aminé (code une lettre)	Valeurs de masse monoisotopique	Moyenne	Acide aminé (code une lettre)	Valeurs de masse monoisotopique	Moyenne
Alanine (A)	71.03711	71.0788	Leucine (L)	113.08406	113.1594
Arginine (R)	156.10111	156.1875	Lysine (K)	128.09496	128.1741
Asparagine (N)	114.04293	114.1038	Méthionine (M)	131.04049	131.1926
Acide aspartique (D)	115.02694	115.0886	Phénylalanine (F)	147.06841	147.1766
<u>Cystéine</u> (C)	103.00919	103.1388	Proline (P)	97.05276	97.1167
Acide glutamique (E)	129.04259	129.1155	<u>Serine</u> (S)	87.03203	87.0782
Glutamine (Q)	128.05858	128.1307	Thréonine (T)	101.04768	101.1051
Glycine (G)	57.02146	57.0519	Tryptophan (W)	186.07931	186.2132
Histidine (H)	137.05891	137.1411	<u>Tyrosine</u> (Y)	163.06333	163.1760
Isoleucine (I)	113.08406	113.1594	Valine (V)	99.06841	99.1326

Voir le tableau qui permet de connaître la différence de masse induite par une **substitution** (valeurs de masse monoisotopique)

(*Expasy - "Protein Identification Tools"*)

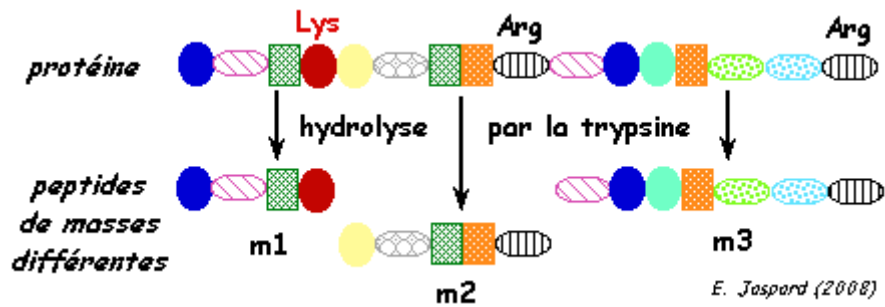
Modification post-traductionnelle	Différence de masse (monoisotopique / moyenne)	Modification post-traductionnelle	Différence de masse (monoisotopique / moyenne)
<u>Acétylation</u>	42.0106 / 42.0373	<u>Méthylation</u>	14.0157 / 14.0269
<u>ADP-ribosylation</u>	541.0610 / 541.30	<u>Myristoylation</u>	210.1984 / 210.3598
<u>Amidation</u>	-0.9840 / -0.9847	<u>Palmitoylation</u>	238.2297 / 238.4136
<u>Biotinylation</u>	226.0776 / 226.2934	<u>Phosphorylation</u>	79.9663 / 79.9799
<u>Hydroxylation</u>	15.9949 / 15.9994	<u>Sulfatation</u>	79.9568 / 80.0642

Pour calculer la masse d'un peptide :

- on fait la somme des **masses monoisotopiques** des résidus d'acides aminés du peptide.
- la masse monoisotopique est elle-même la somme des **masses exactes de chaque isotope** stable le plus léger de chaque atome d'une molécule (d'un résidu d'acide aminé en l'occurrence).
- on ajoute la masse de H₂O (18.01056)
- on ajoute celle du proton (1.00785) pour obtenir [M+H]⁺
- si les méthionines sont oxydées on ajoute 15.99491
- si les cystéines portent des résidus d'acrylamide on ajoute 71.0371
- si les cystéines sont **iodoacétylées** on ajoute 58.0071
- on ajoute la masse liée à une éventuelle modification post-traductionnelle

Pour un cours plus **détaillé** sur l'interprétation des spectres de masse en protéomique, aller à "**De Novo Peptide Sequencing Tutorial**" - "***IonSource.Com***".

La trypsine hydrolyse la **liaison peptidique** après (côté C-terminal) les acides aminés lysine et arginine, sauf si ces acides aminés sont suivis par une proline. Cependant elle peut avoir une **spécificité plus complexe**.



1. Voir le logiciel "*PeptideCutter*" - Expasy

2. Aller à la page "*MS-Digest*" du logiciel "*Prospector*". Cliquer sur "*perform digest*" pour avoir un aperçu d'un résultat d'hydrolyse *in silico* d'une protéine.

Des agents chimiques comme le bromure de cyanogène qui coupe la protéine après les méthionines peuvent aussi être employés.