

# UNIVERSITÉ D'ÉVRY VAL D'ESSONNE

## ÉCOLE DOCTORALE : DES GÉNOMES AUX ORGANISMES

### THÈSE

Présentée

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

En vue de l'obtention du grade de

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

par

**Aïcha BAGAG**

PHOTOIONISATION ET SPECTROMÉTRIE DE MASSE : UN NOUVEL  
OUTIL POUR L'IDENTIFICATION DE BIOMOLÉCULES

Soutenue le 17 Octobre 2008 devant la Commission d'Examen :

Mme Florence GONNET  
M. Andries BRUINS  
M. Laurent DEBRAUWER  
Mme Catherine LANGE  
M. Alexandre GIULIANI  
M. Olivier LAPREVOTE

Présidente  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

*A Rachid,*

*Pour ton amour et ton soutien inconditionnel depuis toutes ces années. Pour ta capacité à trouver les mots justes et réconfortants, pour ta patience et le bonheur que tu m'apportes jour après jour. Pour toutes ces raisons qui font que tu es mon mari. Merci à toi pour m'avoir supporté et resté patient même dans les moments difficiles. Ce travail n'aurait pu voir le jour sans ton soutien et c'est pour toutes ces raisons que je tiens à te dédier ce travail de thèse.*

*A mes parents,*

*Vous avez veillé sur moi depuis ma naissance jusqu'à ce que je suis ; vous m'avez assuré une vie digne ; vous avez manifesté beaucoup de sacrifices afin de me voir grandir devant vos yeux. Aujourd'hui, vient mon tour pour vous remercier en vous offrant ce travail qui est le fruit de vos sacrifices. Maman, Papa, je vous dois toute ma vie ! Cette réussite est aussi la vôtre.*

*A ma sœur Fatima,*

*Pour tous les moments de bonheur partagés. Pour m'avoir encouragée et réconfortée dans les moments de doute et soutenue dans mes projets professionnels et personnels. Merci grande sœur.*

*A Hassan, Fayssal et Rachid,*

*Pour votre gentillesse et vos encouragements. Vous êtes pour moi des frères exemplaires. Merci pour avoir réussi à supporter une sœur caractérielle. Merci.*

*A ma belle famille,*

*Ils ont toujours été présents pour moi et ce depuis le début de mon travail de thèse. Je les remercie du fond du cœur pour leurs encouragements et leur amour.*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Olivier LAPREVOTE**, directeur de thèse, de m'avoir accueillie dans son équipe, de ses compétences scientifiques, de son enthousiasme quotidien, de son dynamisme pour la valorisation des résultats, et des formations et congrès auxquels il m'a permis de participer.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Docteur **Alexandre GIULIANI**, responsable scientifique de cette thèse, pour la qualité de son encadrement et la confiance qu'il m'a témoignée en me laissant une grande liberté d'action, valorisant ainsi ma thèse comme un projet professionnel. Sa constante disponibilité, sa bonne humeur, son enthousiasme, ses conseils, ses compétences scientifiques et nos enrichissantes discussions m'ont permis de mener mes travaux dans les meilleures conditions, d'élargir mes connaissances à l'interface physique-chimie et de me former à des techniques nouvelles.

J'adresse également mes remerciements à Madame la Docteur **Florence GONNET** pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur **Andries BRUINS** pour l'honneur que vous me faites en ayant accepté d'être rapporteur de ces travaux, pour ces discussions enrichissantes lors des différents congrès internationaux.

Je tiens aussi à remercier **Laurent DEBRAUWER** d'avoir accepté d'être l'un des rapporteurs de ce travail de thèse.

Un grand merci à **Catherine LANGE** pour m'avoir fait l'honneur de votre présence au sein de mon jury de thèse, pour m'avoir initié à la spectrométrie de masse.

Je remercie également le Professeur **Jean-Yves LALLEMAND** pour la confiance que vous m'avez témoigné en m'accordant ce financement qui m'a permis de mener à bien cette thèse.

Tous mes remerciements vont également à :

**Farida Benabdallah**, pour tous ces bons moments partagés, nos échanges scientifiques et personnels.

**Isabelle Schmidt-Afonso**, pour ton amitié, ces heures passées devant la chaîne HPLC pour purifier ce fameux « DF8 », tous tes conseils de maman.

**Vincent Guérineau**, pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

*Alain Brunelle, pour toute l'expérience que tu as su m'apporter, pour ton aide dans la compréhension de la physique des particules*

*Nora Tahallah, pour ton amitié, ces très bons moments partagés lors des congrès, toutes ces discussions sur notre vision du monde.*

*Jean Pierre Le Caer, pour ta bonne humeur et tes précieux conseils.*

*David TOUBOUL, pour tous ces bons moments partagés, nos échanges scientifiques.*

*Delphine DEBOIS, pour ta bonne humeur au sein du bureau.*

*Alexandre Seyer, j'espère que le laboratoire saura t'apporter tout ce que tu recherches*

*Julie et Sylvie, pour votre accueil, votre disponibilité et votre bonne humeur.*

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

# SOMMAIRE

Introduction Générale.....	1
----------------------------	---

## 1<sup>ère</sup> PARTIE : GENERALITES

<b>CHAPITRE 1 : Quelques notions fondamentales.....</b>	<b>4</b>
---	----------

I. INTERACTION LUMIERE/MATIERE.....	4
-------------------------------------	---

I.1 Principaux processus d'interaction du photon.....	4
I.1.1 La diffusion Rayleigh.....	5
I.1.2 La diffusion Thomson .....	5
I.1.3 L'effet Raman.....	6
I.1.4 La photoabsorption.....	6
I.1.5 Comparaison des processus.....	7

II. STRUCTURE ELECTRONIQUE DES ATOMES ET DES MOLECULES.....	8
---	---

II.1 Structure des molécules.....	8
I.1.1 Approximation de Born-Oppenheimer.....	8
I.1.2 Approximation de Hartree-Fock.....	9
I.1.3 Energie des orbitales.....	10
II.2 Physicochimie d'une molécule électroniquement excitée .....	11
II.3 Diagramme de Jablonski.....	14
II.3.1 Emissions radiatives.....	15
II.3.2 Processus non radiatifs.....	16

III. STABILITE ET REACTIVITE DES IONS EN PHASE GAZEUSE.....	17
---	----

III.1 La théorie de la réaction unimoléculaire en spectrométrie de masse .....	18
III.1.1 La théorie statistique RRKM/QET.....	19
III.1.2 Facteurs influençant le calcul de la constante de vitesse .....	21
a) La géométrie de l'état de transition.....	21
b) Le temps de résidence des ions.....	22
III.1.3 Application de la théorie des réactions unimoléculaires à la SM.....	23
a) La fenêtre d'observation.....	24
b) L'énergie interne $E_{\text{int}}$ déposée sur l'ion.....	24
III.2 Energie interne.....	26
III.2.1 L'ion précurseur .....	26
III.2.2 L'excitation secondaire.....	27
III.2.3 Principe de la mesure d'énergie interne des ions par les thermomètres chimiques .....	30
III.3 Cinétique de dissociation des ions selon une distribution d'énergie interne .....	35
III.3.1 A haute pression ou « rapid energy exchange limit » .....	36
III.3.2 A basse pression ou « slow energy exchange limit ».....	38

Références bibliographiques I.....	39
------------------------------------	----

<b>CHAPITRE 2 : Spectrométrie de masse</b> .....	44
I. LE SPECTROMETRE DE MASSE.....	44
I.1 Qu'est ce que la spectrométrie de masse.....	44
I.2 Qu'est ce qu'un spectromètre de masse.....	45
I.3 Le spectromètre utilisé : le QStar pulsar <i>i</i> .....	46
II. LE DETECTEUR EQUIPANT LE SPECTROMETRE DE MASSE .....	48
III. L'ANALYSEUR DE MASSE .....	49
III.1 Les analyseurs de type quadripolaire.....	49
III.2 L'analyseur à temps de vol.....	52
III.2.1 Principe général .....	52
III.2.2 Le réflectron.....	53
III.2.3 L'injection orthogonale.....	54
IV. L'INTERFACE.....	57
IV.1 Paramètres instrumentaux caractérisant l'interface.....	57
<i>Références bibliographiques II</i> .....	60
<b>CHAPITRE 3 : La photoionisation à pression atmosphérique (APPI)</b> .....	61
I. INTRODUCTION ET BREF HISTORIQUE.....	61
I.1 Détection par photoionisation couplée à la chromatographie en phase gazeuse ...	61
I.2 Détection par photoionisation couplée à la chromatographie en phase liquide .....	61
I.3 Les prémices de la spectrométrie de masse par photoionisation.....	62
I.4 Principe de base de ces sources : le <i>thermospray</i> .....	65
I.4.1 Relation entre la température de chauffage et la température de spray...66	
I.4.2 Influence de la température dans deux systèmes de solvants.....67	
I.4.3 Influence du débit de solvants : exemple dans l'eau.....68	
I.4.4 Influence de la tension de cône.....69	
I.4.5 Influence du potentiel d'extraction.....70	
I.4.6 Conclusions sur les résultats obtenus.....70	
II. PROPRIETES ET MECANISMES DE L'APPI .....	72
II.1 Principe de base.....	72
II.2 Photoionisation « directe ».....	75
II.3 Photoionisation « assistée ».....	76
II.3.1 Transfert de proton.....	77
II.3.2 Transfert de charge.....	80
II.4 Photoionisation en mode négatif : implication des photoélectrons .....	80
II.4.1 Recombinaisons dissociatives et mécanismes apparentés.....	83
II.5 Effet de la nature du solvant et du dopant sur les processus d'ionisation .....	84

III. CHAMP D'APPLICATION DE LA PHOTOIONISATION.....	86
III.1 Analyse de composés pharmaceutiques .....	86
III.1.1 Les stéroïdes.....	86
III.1.2 Les métabolites.....	87
III.2 Analyse environnementale et polluants.....	88
III.3 Analyse de biomolécules .....	89
III.3.1 Les peptides.....	89
III.3.2 Les lipides.....	90
III.3.3 Les acides nucléiques.....	91
III.4 Autres applications.....	91
III.4.1 Produits naturels : les flavonoïdes.....	92
III.4.2 Composés dans les matrices alimentaires.....	92
III.4.3 Composés organiques synthétiques.....	92
III.4.4 Analyse géologique.....	93
III.4.5 Les polymères .....	94
IV. RECENTS DEVELOPPEMENTS DE LA SOURCE ET SES COUPLAGES.....	96
IV.1 Couplage de l'APPI à un spectromètre de type FTICR.....	96
IV.2 Combinaison des sources à photoionisation : émergence des sources « duales »	97
IV.3 La miniaturisation des sources APPI.....	98
IV.4 Couplage de l'APPI avec d'autres méthodes séparatives.....	102
IV.5 Une technique très proche de l'APPI : l'APLI .....	104
IV.6 Le DAPPI.....	105
V. LES LIMITATIONS DE CETTE TECHNIQUE.....	107
<i>Références bibliographiques III</i> .....	109
<b>CHAPITRE 4: Les sources de lumière</b> .....	126
I. SOURCES DE RAIES : LES LAMPES A DECHARGES.....	126
I.1 Historique.....	126
I.2 Principe de fonctionnement.....	126
I.3 Cas des lampes de photoionisation (PID).....	127
II. LES SOURCES ACCORDABLES : LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON.....	128
II.1 Généralités.....	128
II.2 L'installation du rayonnement synchrotron SOLEIL.....	129
III. LA LIGNE DE LUMIERE DISCO.....	132
III.1 Présentation de la ligne DISCO.....	132
III.2 Aimant et tête de ligne .....	132
III.3 L'optique.....	136
III.4 Le vide.....	138
III.4.1 Le pompage différentiel.....	138
III.5 Synchronisation QStar/monochromateur.....	140
<i>Références bibliographiques IV</i> .....	142

## 3<sup>ème</sup> PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

<b>CHAPITRE 5: Etude d'acides nucléiques.....</b>	<b>143</b>
I. INTRODUCTION GENERALE.....	143
I.1 Généralités sur les acides nucléiques .....	143
I.2 Propriétés physico-chimiques des bases nucléiques.....	146
II. ETUDE DE BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES EN APPI.....	147
II.1 Conditions expérimentales.....	147
II.2 Photoionisation en absence de dopant : photoionisation directe.....	148
II.3 Photoionisation en présence de dopant : photoionisation assistée.....	154
II.4 Expériences de dissociations induites par collision .....	156
III. ETUDE DE RIBO- ET DEOXYNUCLEOSIDES EN APPI-MS.....	160
III.1 Les ribonucléosides .....	160
III.2 Les déoxynucléosides .....	165
IV. ETUDE DE RIBO- ET DEOXYRIBONUCLEOTIDES EN APPI-MS.....	166
IV.1 Les ribonucléotides .....	166
IV.2 Les déoxyribonucléotides.....	170
V. CONCLUSIONS GENERALES.....	171
<i>Références bibliographiques V.....</i>	<i>172</i>
<b>CHAPITRE 6: Etude d'oligodéoxynucléotides.....</b>	<b>175</b>
I. INTRODUCTION GENERALE.....	175
I.1 Fragmentation des oligonucléotides par spectrométrie de masse .....	175
I.2 Fragmentation d'oligonucléotides en mode d'ionisation négatif .....	176
II. ETUDE DE DI- ET TRIMERES .....	179
II.1 Optimisation des conditions expérimentales .....	179
II.1.1 Choix du solvant et du tampon.....	179
II.1.2 Optimisation des paramètres de la source.....	180
II.2 Etude de nucléotides en mode d'ionisation positif .....	180
II.2.1 Cas d'un dinucléotide d(TA).....	181
II.2.2 Cas d'un trinucleotide d(TAG).....	185
II.3 Etude de nucléotides en mode d'ionisation négatif .....	186
II.2.1 Cas du dinucléotide d(TA).....	186
II.2.2 Cas du trinucleotide d(TAG).....	188
III. DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS & CONCLUSION.....	189
<i>Références bibliographiques VI.....</i>	<i>195</i>



<b>CHAPITRE 7: Etude d'oligosaccharides</b> .....	201
I. INTRODUCTION GENERALE.....	201
II. NOMENCLATURE ET OBSERVATION DES FRAGMENTS.....	202
III. ETUDE D'OLIGOSACCHARIDES NATIFS.....	206
III.1 Etude d'un sucre simple : le glucose.....	206
III.1.1 Conditions expérimentales.....	207
III.1.2 Photoionisation du glucose en mode positif dans le système de solvant H <sub>2</sub> O/MeOH (50 :50, v/v).....	207
III.1.3 Photoionisation du glucose en mode positif dans le chloroforme .....	210
III.1.4 Photoionisation du glucose en mode négatif.....	211
III.2 Etude de quelques disaccharides natifs.....	212
III.2.1 Photoionisation dans le système H <sub>2</sub> O/MeOH (50 :50, v/v).....	212
III.2.2 Photoionisation des disaccharides dans le chloroforme.....	217
III.3 Etude de deux trisaccharides.....	221
IV. ETUDE D'OLIGOSACCHARIDES PERMETHYLES.....	225
IV.1 Etude du glucose perméthylé.....	225
IV.2 Etude de disaccharides perméthylés.....	230
IV.2.1 Etude dans le système H <sub>2</sub> O/MeOH (50 :50, v/v).....	230
IV.2.2 Etude dans le chloroforme.....	233
IV.3 Etude de trisaccharides perméthylés.....	236
IV.3.1 Etude du cellotriose (III' β).....	236
IV.3.2 Etude du raffinose (III' α).....	238
V. CONCLUSIONS.....	239
<i>Références bibliographiques VII</i> .....	241
<b>CHAPITRE 8: Etude de peptides</b> .....	244
I. INTRODUCTION GENERALE.....	244
I.1 Nomenclature de fragmentation des peptides .....	244
I.1.1 Nomenclature pour le mode positif.....	244
I.1.2 Etude de peptides en mode d'ionisation négatif.....	247
I.2 Brève revue de la littérature des mécanismes observés en ECD.....	249
I.2.1 Principe de base de l'ECD.....	250
I.2.2 Mécanismes proposés.....	250
I.3 Rappel des travaux antérieurs obtenus en photoionisation .....	253
I.4 Objectif de l'étude.....	255
II. ETUDE DU PEPTIDE NATIF .....	255
II.1 Conditions expérimentales.....	255
II.1.1 Peptide étudié.....	255
II.1.2 Optimisation des paramètres de la source.....	260

II.2 Comparaison du mode positif et mode négatif.....	261
II.3 Spectres MS/MS de DF8 dans iPrOH.....	265
II.4 Spécificité de formation des ions de type <i>c</i> .....	266
III. ETUDE DU PEPTIDE DANS DES CONDITIONS ACIDES.....	268
III.1 Comparaison avec le peptide natif ( <i>i.e</i> en solution non acidifiée).....	268
III.2 Etude des massifs isotopiques des ions de séquence <i>c</i> .....	270
III.3 Origine des ions <i>c</i> en présence d'acide.....	272
IV. CONCLUSION.....	273
<i>Références bibliographiques VIII</i> .....	275

## 4<sup>ème</sup> PARTIE : PERSPECTIVES

<b>CHAPITRE 9: Dégâts des radiations ionisantes.....</b>	<b>280</b>
I. INTRODUCTION GENERALE.....	280
I.1 Importance des dégâts des radiations sur les systèmes vivants.....	280
<i>I.1.1 Toxicité des radiations ionisantes.....</i>	<i>281</i>
I.2 Classification des dommages.....	281
I.3 Les objectifs de ce travail.....	283
<i>I.3.1 Photoionisation à 10 eV sur un nébulisat et étude de l'effet du milieu sur la dégradation des oligonucléotides.....</i>	<i>283</i>
<i>I.3.2 Procédés expérimentaux mis en œuvre - Etude des oligonucléotides....</i>	<i>284</i>
II. RESULTATS.....	285
II.1 Photoionisation dans l'eau en présence d'acétone (1 à 4 %).....	286
II.2 Photoionisation dans l'eau en présence d'acétone deutérée (1 à 4 %).....	288
II.3 Photoionisation dans D <sub>2</sub> O en présence d'acétone.....	288
III. DISCUSSION.....	290
III.1 Mécanismes des dommages indirects sur les nucléotides.....	290
III.2 Et les dommages sur les protéines ?.....	292
<i>Références bibliographiques IX</i> .....	293

---

Conclusions Générales.....	296
Figures.....	298
Tableaux.....	310

## ANNEXES

**ARTICLE 1** : Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of nucleic bases, ribonucleosides and ribonucleotides .....313

**ARTICLE 2** : Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of oligodeoxyribonucleotides .....323

**ARTICLE 3** : Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of per-O-methylated oligosaccharides related to D-xylans.....334

## ABREVIATIONS UTILISEES DANS CE MEMOIRE

### *Abréviations et notations :*

AE : Affinité électronique

AP : Affinité Protonique

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

Da : *Dalton* (unité de mesure de la masse moléculaire, équivalente aux grammes/mole)  
1 Da =  $1/12^{\text{ème}}$  de la masse du carbone 12 = 1 u

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

EI : Energie d'ionisation

ESI : *Electrospray Ionization*, Ionisation par électronébulisation

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

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

FIA : *Flow Injection Analysis*

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

GC : *Gas Chromatography*, Chromatographie en phase gazeuse

IC : Ionisation Chimique

IE : Ionisation Electronique

LC : *Liquid Chromatography*, Chromatographie en phase liquide

$m/z$  : rapport masse sur nombre de charges

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

MS : *Mass Spectrometry*, Spectrométrie de masse

PID : *Photoionization Detection*, Détection par photoionisation

TIC : *Total Ion Current*, Courant ionique total

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

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

# *Introduction générale*

# Introduction Générale

L'adaptation de la spectrométrie de masse à l'analyse de protéines membranaires et de peptides hydrophobes reste un défi important, ces composés demeurant souvent rétifs aux méthodes d'ionisation traditionnelles. D'autres biomolécules, à caractère hydrophobe ou amphiphile posent également un certain nombre de problèmes analytiques tant du point de vue des méthodes séparatives que du couplage de ces dernières à la spectrométrie de masse. Le Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'ICSN a entrepris dans ce contexte de tirer profit d'un nouveau mode d'ionisation : *la photoionisation à pression atmosphérique (APPI)*.

Des résultats préliminaires ont permis de montrer que l'APPI est une méthode efficace pour l'étude de composés biologiques hydrophobes et ce, avec une sensibilité similaire à celle de l'*electrospray*. Outre leur mesure de masse, l'APPI conduit, dans le cas de peptides hydrophobes, à la formation de fragments de séquence spécifiques qui suggèrent des processus de fragmentation analogues à ceux décrits récemment en FT-ICR et qui sont à la base des stratégies dites « *top-down* » en protéomique. La puissance analytique potentielle de cette technique est donc considérable si l'on considère aussi qu'elle admet tout type de solvants, de tampons et détergents et, *ipso facto*, qu'elle peut être adaptée à tous les modes de chromatographie en phase liquide.

Ce travail se développe sur trois axes principaux. D'une part, il s'agit d'appliquer cette méthode d'ionisation à de nouvelles familles de molécules et d'en élargir ainsi son domaine d'application. Comme nous l'avons vu précédemment, l'APPI s'était révélée performante pour une grande variété de composés tels que les flavonoïdes, stéroïdes, hydrocarbures polyaromatiques, etc.... Jusqu'à maintenant, les études effectuées en photoionisation à pression atmosphérique se sont uniquement focalisées sur des composés hydrophobes. Néanmoins, la photoionisation pourrait s'étendre à d'autres composés, et plus particulièrement des composés ayant un caractère amphiphile plus marqué, comme les peptides, les acides nucléiques, les oligonucléotides, les oligosaccharides etc.... Ces composés biologiques peuvent se révéler *à priori* inadaptés à la photoionisation. Nous avons pourtant démontré, au cours de ce travail de thèse, que cette prometteuse technique pouvait s'appliquer parfaitement à ces principales classes de biomolécules. Ces résultats illustrent

l'intérêt de la photoionisation à pression atmosphérique qui permet d'obtenir simultanément des informations sur la masse et sur la structure de ces biomolécules, sans avoir recours à des expériences de MS/MS. L'APPI génère de nombreuses fragmentations en source, parfois les ions fragments obtenus sont particuliers et différents de ceux observés classiquement en CID par exemple. Cette technique peut donc dans certains cas donner accès à une sorte de MS<sup>3</sup>, d'où un intérêt analytique majeur de cette méthode.

D'autre part et parallèlement à cela, ce travail a pour but de comprendre les phénomènes de fragmentation sous APPI de façon à pouvoir les contrôler. Pour cela, nous nous sommes attachés à l'étude des mécanismes de formation des ions ainsi qu'à l'élucidation des voies de fragmentation. En effet, ces dernières se caractérisent par la production abondante de fragments souvent exotiques. Jusqu'ici, peu d'efforts ont été consacrés à l'étude des processus fondamentaux d'ionisation qui se produisent en source en dépit de leur complexité, de leur richesse et de leur potentialité analytique. De plus, ce travail a aussi permis de démontrer l'impact du milieu (solvant) sur le mécanisme de formation des ions sous irradiation UV à pression atmosphérique. Ainsi l'étude et la connaissance des mécanismes fondamentaux de formation des ions en APPI viseront *in fine* au contrôle de la formation des ions précurseurs et par voie de conséquence, à celui des fragments générés en source. Il nous apparaît que les potentialités de l'APPI pour la génération en source d'espèces réactives commencent à être entrevues par ce travail de thèse.

Enfin, l'expérience de photoionisation à pression atmosphérique sera transférée à l'installation de rayonnement synchrotron SOLEIL sur une ligne de lumière dans l'ultraviolet. Ce travail de thèse a donc inclus la préparation au transfert de l'expérience sur la ligne de lumière DISCO. L'objectif de ce projet est d'irradier des substances organiques ou des molécules simples par un faisceau de photons ultraviolets, de longueur d'onde variable et précise, à pression atmosphérique. Les avantages du rayonnement synchrotron comme source sont nombreux. D'un point de vue technique, DISCO permettra une accordabilité en longueur d'onde puisqu'on pourra travailler sur une large gamme d'énergie pouvant aller entre 4 et 20 eV (300-60 nm) ainsi qu'une pureté spectrale puisque nous n'aurons plus la contamination à 10,6 eV observée actuellement. Par ailleurs, les flux de photons seront supérieurs à ceux délivrés par la lampe UV actuelle (de l'ordre de 100 fois supérieur environ). La sensibilité sera donc augmentée avec l'utilisation du rayonnement synchrotron.

L'avantage analytique de l'utilisation du rayonnement synchrotron est l'ajout d'une dimension supplémentaire sur les spectres LC-APPI-MS/MS qui est la longueur d'onde apportant une information complémentaire.

Enfin, les deux applications fondamentales que pourrait apporter l'utilisation de cette source accordable sont : d'une part, la mesure des énergies d'ionisation de composés non volatils qui restent inconnus et d'autre part, cette expérience pourrait mettre en évidence la présence d'un éventuel seuil énergétique à la réaction de transfert d'hydrogène ou encore étudier la photochimie des solvants et des gaz.



# *Première partie*

## *Généralités*

*Chapitre 1 :*  
*Quelques notions fondamentales*

# CHAPITRE 1 : Quelques notions fondamentales

## I. INTERACTION LUMIERE/MATIERE

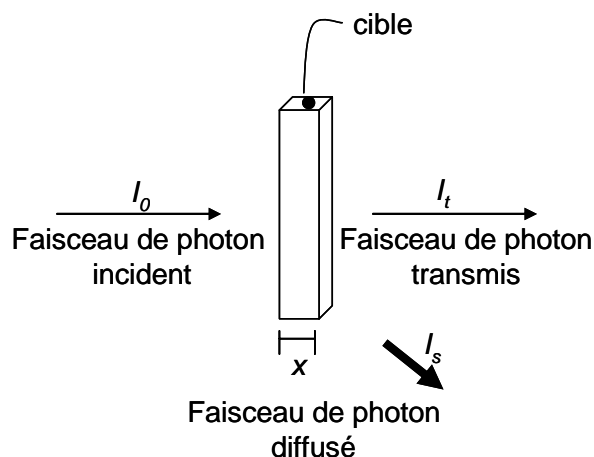
L'interaction du rayonnement avec la matière est un sujet qui recouvre la plupart des domaines de la physique et de la chimie mais aussi de nombreuses autres disciplines. A ce vaste champ d'étude s'ajoutent la variété et le grand domaine des énergies des rayonnements disponibles, et l'importance relative que prennent les divers processus d'interaction en fonction du domaine énergétique.

Une telle étude peut se limiter au passage du rayonnement. On est alors concerné par le devenir du faisceau utilisé (absorption, diffusion, ralentissement, etc...) et par ses conséquences directes (ionisation, excitation, création de défauts, apparition d'espèces chimiques plus ou moins réactives, etc...). Cette approche purement macroscopique est indispensable, en particulier parce qu'elle a conduit aux méthodes de détection de ces rayonnements. Une description plus détaillée nécessite la compréhension du mécanisme même de l'interaction, en particulier avec les électrons puisqu'ils constituent l'essentiel du milieu d'interaction. Le rayonnement est alors une sonde, souvent très bien adaptée à l'observation de la structure de la matière. Cet aspect est directement lié à la grande variété de spectroscopies.

### I.1 Principaux processus d'interaction du photon

L'interaction des photons avec la matière est un phénomène complexe qui fait intervenir de nombreux processus. La plupart du temps, l'importance de ces processus dépend de l'énergie du photon. Nous avons décidé de porter une plus grande attention aux photons du domaine de l'ultraviolet (puisque c'est le sujet de cette thèse).

Lorsqu'une radiation électromagnétique, possédant une longueur d'onde  $\lambda$ , passe à travers une cible d'épaisseur  $dx$ , plusieurs interactions peuvent avoir lieu. Comme résumé par la *figure 1a*, la lumière peut être transmise, diffusée ou absorbée.



**Figure 1a** : Les différentes interactions lumière/matière possibles

On peut imaginer plusieurs processus d'interaction du photon selon que l'on considère son absorption totale ou simplement sa diffusion (élastique ou inélastique) sur un électron (libre ou lié), ou dans le champ électrique de l'électron ou du noyau. La plupart de ces phénomènes ont été observés et nous en donnerons par la suite une rapide description.

### *1.1.1 La diffusion Rayleigh*

La diffusion Rayleigh est un mode de diffusion des ondes, par exemple électromagnétiques ou sonores, dont la longueur d'onde est très supérieure à la taille des particules diffusantes. On parle de diffusion élastique, car cela se fait sans variation d'énergie, autrement dit, l'onde conserve la même longueur d'onde. La diffusion de la lumière par effet Rayleigh est un processus dans lequel la radiation incidente est déviée d'un angle mais reste intacte en terme de longueur d'onde. La différence de la section efficace pour cette diffusion de lumière à travers un angle  $\theta$  dans un élément solide a été donné par Berkowitz [Berkowitz, 1979] qui estime la valeur de l'intégrale de la section efficace égale à  $4\pi$  pour  $\lambda = 100 \text{ nm}$  et pour  $\alpha(\lambda) \approx 1 \text{ \AA}^3$  elle est de  $10^{-24} \text{ cm}^2 = 1 \text{ barn}$ .

### *1.1.2 La diffusion Thomson*

La diffusion Thomson est la diffusion d'un photon de faible énergie sur une particule chargée de matière au repos, généralement un électron libre. Dans cette diffusion qui s'effectue pour des énergies faibles, le rayonnement électromagnétique est absorbé puis

réémis par la particule. Durant cette interaction l'énergie transmise à la particule chargée par le photon est négligée, tant que l'énergie des photons ne dépasse pas 45 keV, il s'agit alors d'une diffusion élastique. La direction de propagation de l'onde électromagnétique associée au photon change sans diminution de l'énergie. Cette diffusion est similaire à la diffusion Rayleigh à la différence près que cette dernière s'effectue sur des particules chargées liées à des atomes.

Pour une petite valeur de  $\lambda$  (de l'ordre des dimensions moléculaires), la section efficace de la diffusion de Rayleigh devient indépendante de la longueur d'onde. Ce domaine est appelé la région de diffusion de Thomson et sa section efficace est donnée par :

$$\sigma = \frac{8}{3} \pi r_e^2$$

où  $r_e = e^2/m_e c^2$  correspondant au rayon de l'électron. La diffusion de Thomson est alors égale à 0,66 barn.

### 1.1.3 L'effet Raman

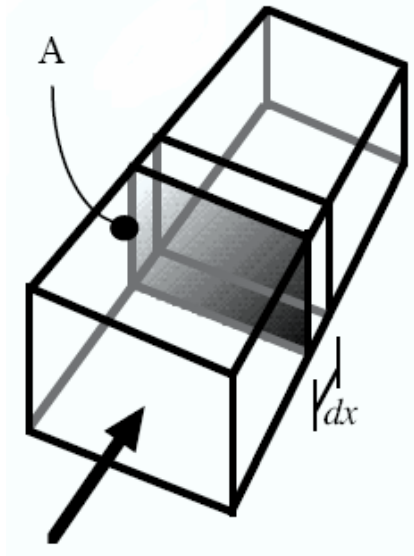
Cet effet consiste en la diffusion inélastique d'un photon, c'est à dire le phénomène physique par lequel un milieu peut diffuser de la lumière en modifiant légèrement sa fréquence. Ce décalage en fréquence correspond à un échange d'énergie entre le rayon lumineux et le milieu. Cet échange peut avoir plusieurs causes : vibrations du cristal ou de la molécule, excitations magnétiques... La mesure de ce décalage permet de remonter à certaines propriétés du milieu. On parle alors de spectroscopie Raman.

Les diffusions Rayleigh et Thomson ont lieu sans modification de la longueur d'onde. Il existe aussi des processus de diffusion inélastique à faible énergie de photon, où la radiation incidente est diffusée avec une longueur d'onde différente. La diffusion par effet Raman appartient à cette catégorie de diffusion inélastique. Afin d'évaluer l'importance de la diffusion Raman, le rapport d'intensité entre les lignes Raman et les lignes Rayleigh doit être considéré. Selon Berkowitz, le rapport est inférieur à 1-10 %.

### 1.1.4 La photoabsorption

On considère le croquis de la **figure 1b**. Un flux de photon incident irradie un bloc possédant une surface A, une épaisseur notée  $dx$  et rempli de  $n$  particules. L'absorption de photons incidents par les molécules cibles résulte en une transition  $i \rightarrow j$ , réduisant ainsi le

nombre  $n$  de particules [Herzberg, 1966]. Ce processus conduit à la réduction de l'énergie électromagnétique à travers le bloc  $dx$ . L'intensité absorbée est définie comme l'énergie absorbée par unité de temps.



**Figure 1b**: Phénomène de photoabsorption dans le volume  $A.dx$

Pour un faisceau monoénergétique, après la traversée d'une épaisseur  $x$  d'un écran (**Figure 1b**), l'intensité transmise  $I_t$  (nombre de photons par unité de temps) est liée à l'intensité incidente  $I_0$  par la relation classique décrite par l'équation suivante :

$$dI = -I_0.N.dx.\sigma$$

où  $\sigma$  est la section efficace totale de photoionisation

Selon Berkowitz [Berkowitz, 1979], la section efficace de photoabsorption peut être estimée à  $\sigma \sim 10^{-21} \text{ m}^2 = 10^7 \text{ barn} = 10 \text{ Mb}$ .

### *1.1.5 Comparaison des processus*

Les valeurs des sections efficaces de ces différents processus indiquent que le phénomène de photoabsorption domine largement sur les processus de diffusion dans la gamme d'énergie d'intérêt par au moins un facteur  $10^7$  : 10 Mbarn pour la photoabsorption

contre  $\sim 1$  barn pour les processus de diffusion. Par conséquent, lorsqu'on considère l'interaction lumière/matière dans le VUV, domaine d'intérêt de ce travail, tous les autres processus peuvent être négligés et l'effet d'atténuation du faisceau de photon à travers une cible de particules absorbantes est entièrement et uniquement décrit par la photoabsorption.

## II. STRUCTURE ELECTRONIQUE DES ATOMES ET DES MOLECULES

### II.1 Structure des molécules

#### *II.1.1 Approximation de Born-Oppenheimer*

L'approximation de Born-Oppenheimer suppose que la fonction d'onde totale décrivant l'état général d'une molécule peut être séparée en différentes parties décrivant le mouvement électronique et nucléaire [Michl, 1990a] :

$$\Psi = \Psi_{el} \Psi_{nucl} \tag{Equation 1}$$

où l'indice *el* indique le mouvement des électrons et *nucl* se réfère à celui du noyau. Cette séparation est basée sur la grande différence de masse entre les électrons et le noyau. Les électrons peuvent donc réagir presque instantanément aux déplacements du noyau et, avec une bonne approximation, les électrons voyagent autour du noyau qui est fixe.

Une autre approximation, apparentée à celle de Born-Oppenheimer, permet de séparer le mouvement nucléaire en ses différents composants. Cette approximation est dite adiabatique et conduit à l'équation suivante :

$$\Psi = \Psi_{el} \Psi_{vib} \Psi_{rot} \tag{Equation 2}$$

où les indices *rot* et *vib* font référence aux mouvements rotationnels et vibrationnels des noyaux. La justification de cette approximation est fondée sur les différences de l'échelle de temps au cours de laquelle se produisent les mouvements et leurs énergies relatives.

Ainsi, l'énergie totale peut être écrite comme la somme des contributions de ces différents types de mouvement.

La *fonction d'onde électronique*, décrivant le mouvement des électrons, dépend explicitement des coordonnées électroniques, comme l'indique l'équation de l'énergie électronique ci-après :

$$H_{el}(x, R)\psi_{el}(x, R) = E_{el}(R)\psi_{el}(x, R) \quad \text{Equation 3}$$

où  $x$  correspond aux coordonnées de l'électron,  $R$  décrit la géométrie moléculaire sélectionnée et  $H_{el}(x, R)$  l'opérateur Hamiltonien électronique, contient tous les facteurs gouvernant les mouvements des électrons. L'énergie potentielle est représentée par le terme  $E_{el}(R)$  fonction de  $R$ . L'équation 3 possède un nombre infini de solutions  $\psi_{el}^i(x, R)$  associées à une énergie  $E_{el}^i(R)$  et chaque  $\psi_{el}^i(x, R)$  appartient à une représentation irréductible du groupe ponctuel associé à  $R$ .

La *fonction d'onde vibrationnelle* pour une molécule donnée dans son  $i^{\text{ème}}$  état électronique peut être trouvée par résolution de l'équation de Schrödinger suivante :

$$H_{nucl}(R)\psi_{vib}^i(x) = E_{vib}\psi_{vib}^i(R) \quad \text{Equation 4}$$

où l'hamiltonien  $H_{nucl}$  contient des facteurs gouvernant les mouvements du noyau incluant l'énergie potentielle  $E_{el}(R)$  du mouvement nucléaire.

### 1.1.2 Approximation de Hartree-Fock

Le point crucial de l'équation 3 est l'énergie potentielle électron-électron dans  $H_{el}(x, R)$ , qui dépend de la séparation  $r_{ij}$  entre les électrons  $i$  et les électrons  $j$ . En première approximation, l'hamiltonien des électrons, n'interagissant pas entre eux, est supposé *à priori* de la forme :

$$H^{NI} = \sum_{i=1}^n \left[ -\frac{1}{2m_e} \nabla_i^2 + \sum_{A=1}^N -\frac{qZ_A}{4\pi\epsilon_0 r_{iA}} \right] = \sum_i h_i \quad \text{Equation 5}$$

où  $A$  représente les différents atomes constituant la molécule,  $N$  le nombre d'atomes libres,  $n$  le nombre d'électrons,  $h_i$  est l'hamiltonien pour l'électron célibataire dans le nuage nucléaire.



Les énergies de potentiel électron-électron sont alors estimées en considérant que chaque électron est en mouvement autour des électrons  $n-1$  restants :

$$H_{el} = \sum_i h_i + \frac{1}{2} \sum_{\substack{i,j \\ i \neq j}} \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad \text{Equation 6}$$

Pour un système à  $n$  électrons, on exprime l'énergie comme suit :

$$E = \sum_{i=1}^n \epsilon_i^0 + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \sum_{\substack{j=1 \\ i \neq j}}^n [J_{ij} - K_{ij}] \quad \text{Equation 7}$$

Dans la première partie de l'équation 7,  $\epsilon_i^0$  représente l'énergie d'un électron dans le domaine du noyau nu. Le second terme de cette équation représente l'effet des interactions électroniques. Les intégrales  $J_{ik}$  et  $K_{ik}$  dépendent des deux orbitales  $i$  et  $k$  :

$$J_{ik} = \iint \psi_i^*(j) \psi_i(j) \frac{e^2}{r_{jl}} \psi_k^*(l) \psi(l) d\tau_j d\tau_l \quad \text{Equation 8}$$

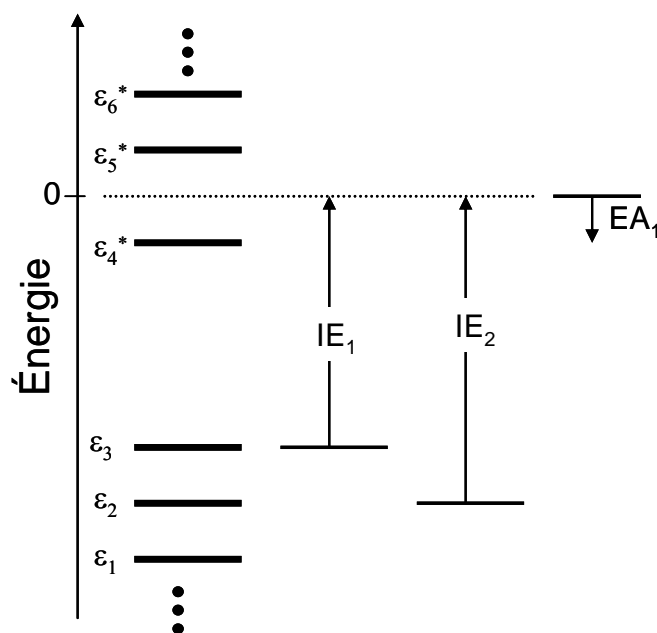
$$K_{ik} = \iint \psi_k^*(j) \psi_i(j) \frac{e^2}{r_{jl}} \psi_i^*(l) \psi(l) d\tau_j d\tau_l \quad \text{Equation 9}$$

Les intégrales  $J_{ik}$  sont appelées intégrales de Coulomb puisqu'elles décrivent la répulsion mutuelle classique des nuages électroniques. Quand aux intégrales  $K_{ik}$ , appelées aussi intégrales d'échange, elles n'ont pas de contrepartie classique et sont des interactions d'échange entre les paires d'électrons de même spin.

### II.1.3 Energie des orbitales

La différence d'énergie entre l'état de la molécule neutre (état fondamental) et l'état des espèces ioniques (état excité) est définie comme la première énergie d'ionisation. L'expression de l'énergie de l'ion formé par l'arrachement d'un électron de l'orbitale  $\psi_k$  est similaire à l'expression de l'énergie pour une molécule neutre, donnée par l'équation 7 où l'on ne retrouve pas les termes dus à l'absence de l'électron  $k$ . En supposant que les quantités  $\epsilon_i^0$ ,  $J_{ij}$  et  $K_{ij}$  soient identiques dans la molécule et dans l'ion, la différence d'énergie entre la molécule et l'ion est identique à l'expression de l'énergie de l'orbitale. Il s'agit du

théorème de Koopman. La relation entre l'énergie des orbitales et la valeur de l'énergie mesurée, donnée par le théorème de Koopman, est illustrée par la *figure 2* [Rabalais, 1977].

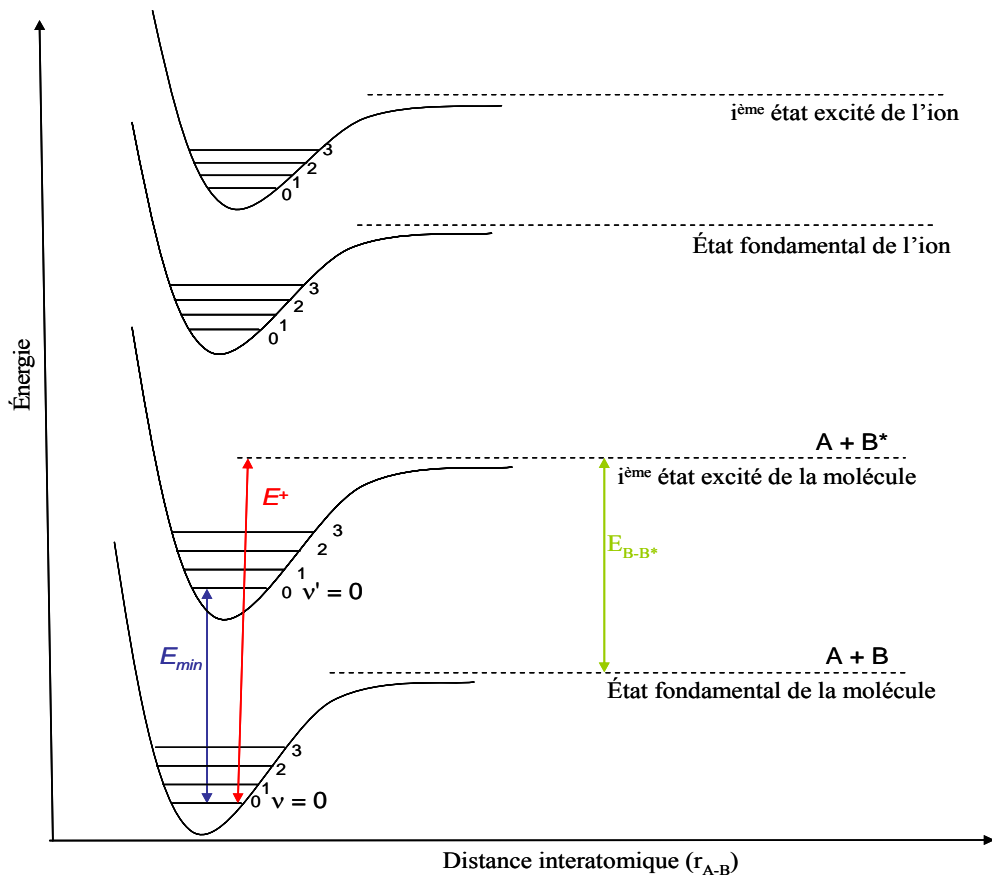


*Figure 2* : Théorème de Koopman

Le théorème de Koopman est approximatif, cependant, il a été montré qu'il est fiable pour les premières énergies d'ionisation ( $IE_1$ ,  $IE_2$ , ...) et l'affinité électronique ( $EA_1$ ) des molécules organiques (à 0,5 eV près).

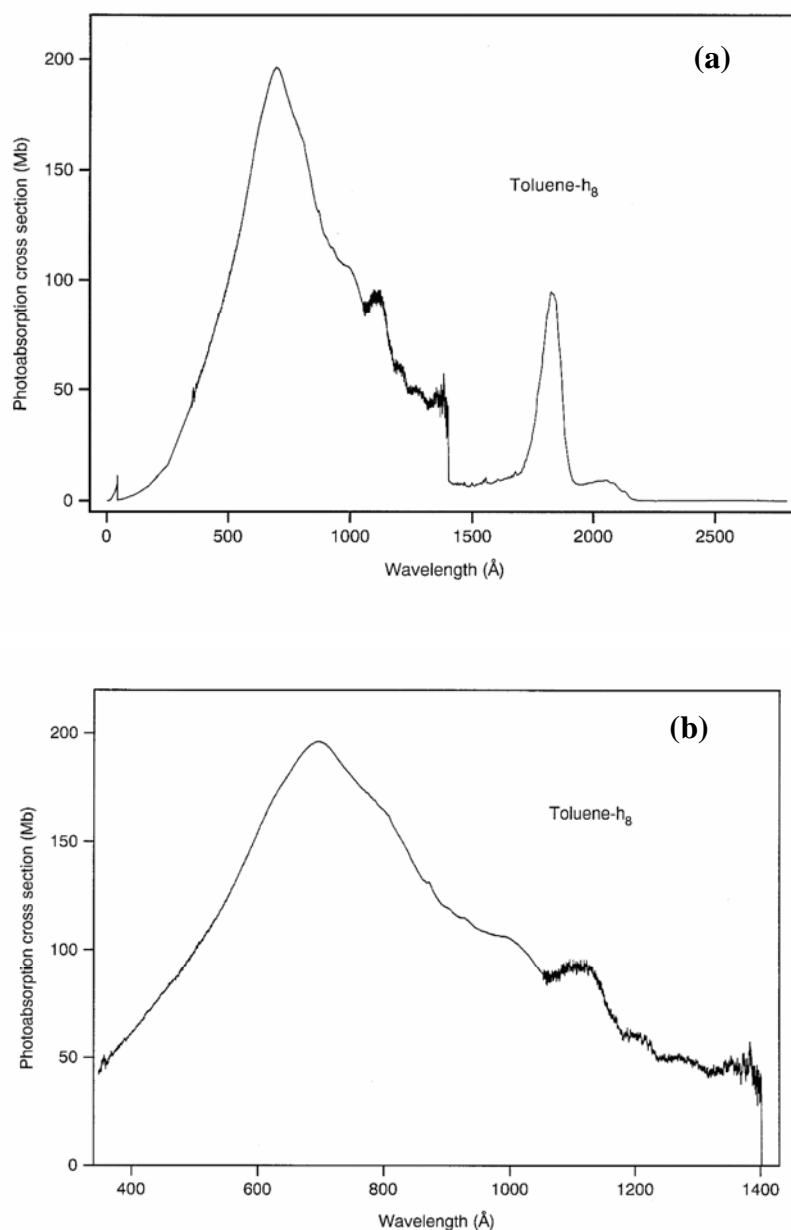
## II.2 Physicochimie d'une molécule électroniquement excitée

Le domaine d'intérêt de ce travail est l'UV visible. L'absorption d'un photon peut porter la molécule dans un état électronique excité éventuellement vibrationnel excité ou encore ioniser la molécule pour donner un cation radical et un photoélectron. Ces différentes transitions électroniques sont illustrées à la *figure 3* où sont schématisées les courbes d'énergie potentielle.



**Figure 3** : Courbes de potentiel du niveau fondamental et d'un niveau  $i^{\text{ème}}$  excité de la molécule et de l'espèce ionique

Sous le seuil d'ionisation, l'absorption de photons porte la molécule vers des états excités. Lorsque l'énergie des photons augmente et permet d'atteindre le premier seuil d'ionisation, la section efficace se partage entre l'excitation de la molécule neutre et la production de cation. La **figure 4** compare les sections efficaces absolues de photoabsorption et de photoionisation mesurées pour le toluène par Shaw *et al.* [Shaw, 1998].



**Figure 4** : Sections efficaces absolues (a) de photoabsorption du toluène et (b) de photoionisation du toluène

Il apparaît que pour les grandes longueur d'onde, la section efficace de photoionisation est faible en comparaison de la section efficace de photoabsorption. Cela traduit le fait que des états excités neutres sont peuplés préférentiellement à des états ioniques. En revanche, lorsque la longueur d'onde des photons diminue, les sections efficaces d'ionisation augmentent et représentent la totalité de la section efficace d'absorption à 80 nm. Il est intéressant de noter que vers 117 nm (10 eV) – 124 nm (10,6 eV) la photoabsorption conduit presque totalement à l'ionisation de la molécule.

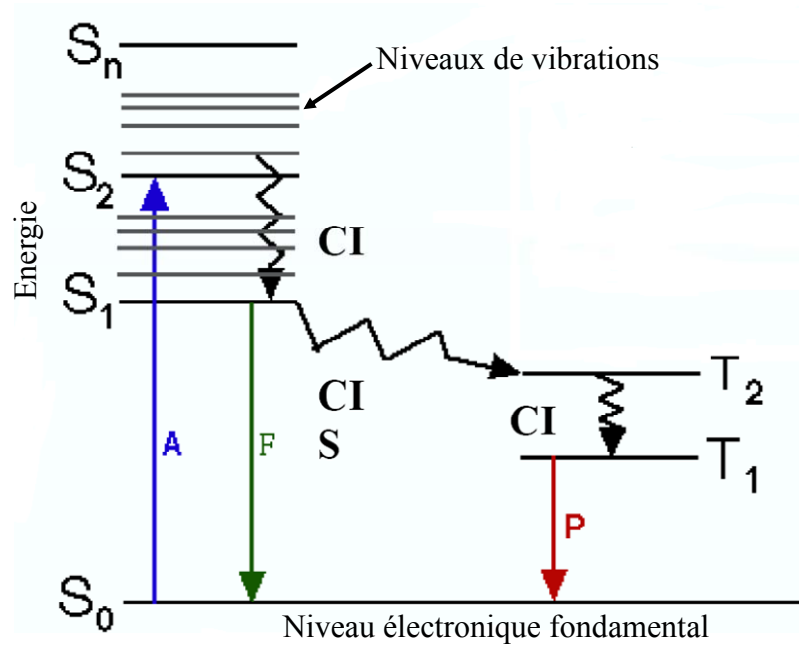
### II.3 Diagramme de Jablonski

Par définition, une molécule à l'état fondamental est dite stable. Dans la très grande majorité des cas, les molécules susceptibles de fluorescer dans le visible possèdent un système d'électrons appariés dans cet état. Selon le principe de Pauli, au maximum deux électrons peuvent parcourir la même orbitale dans l'état fondamental et sont alors de spins opposés (mode de rotation de l'électron sur lui-même). Par conséquent le spin global de la molécule est nul, et l'état fondamental est un état "singulet" de repos. Les électrons de la couche périphérique se trouvent sur l'orbitale disponible de plus faible énergie, ou orbitale "liante". Les échanges d'énergie avec un rayonnement électromagnétique se font par saut d'énergie, les électrons passent donc d'une orbitale quantique à l'autre. Après absorption d'un photon de longueur d'onde suffisamment énergétique (dans la bande d'adsorption des molécules), il se produit un apport d'énergie :  $E = hc/\lambda$  que les électrons absorbent, où  $h$  est la constante de Planck,  $c$  est la vitesse de la lumière et  $\lambda$  est longueur d'onde

Ils accèdent alors à un niveau d'énergie plus élevé et la molécule se trouve dans un état énergétique supérieur : elle est dite "excitée". Les niveaux d'énergie atteints étant par nature instables, la durée de vie d'un électron sur un tel niveau est de l'ordre de quelques nanosecondes. La molécule "excitée" devient alors le siège d'une série de réactions dont les manifestations sont diverses, jusqu'à son retour à l'état stable. Les photons qui ont des longueurs d'onde situées dans l'ultraviolet (< 400 nm) et le visible (> 400 nm) ont une énergie suffisante pour générer une excitation électronique spécifique des molécules. Deux types de processus photophysiques permettent à la molécule excitée de dissiper son énergie excédentaire :

- les processus de désactivation non radiative
- les processus de désactivation radiative (ou luminescence)

Selon le spin, on distingue 2 états excités caractérisés d'énergie et de nature différente : l'état singulet instable (noté S sur la *figure 4*) et l'état triplet métastable (noté T sur la *figure 4*).



**Figure 5** : Diagramme de Jablonski. Les flèches bleues, rouges et vertes indiquent une émission ou une absorption du rayonnement avec A : Absorption, F : Fluorescence, P : Phosphorescence, CIS : Croisement intersystème et CI : conversion interne

### II.3.1 Emissions radiatives

Les états excités peuvent se relaxer par émission de lumière concomitant à un changement simultané de leur état électronique. Les processus radiatifs sont gouvernés par les mêmes mécanismes que ceux impliqués dans le phénomène d'absorption de la lumière à partir de l'état fondamental.

Les processus radiatifs sont répertoriés en deux classes : la fluorescence et la phosphorescence (noté F et P sur la **figure 5**). En fluorescence, le rayonnement est généré par une transition entre des états de même multiplicité (singulet excité-singulet fondamental). Si l'émission se produit entre deux états de multiplicité différente (triplet-singulet par exemple), le phénomène est appelé phosphorescence (noté P). Le diagramme de Jablonski, décrit sur la **figure 5**, schématise l'ensemble du processus d'excitation et de désactivation. Dans ce diagramme, la transition  $S_0 \rightarrow S_1$  a lieu après absorption d'un photon mais elle peut aussi être due à d'autres mécanismes d'excitation tels que l'impact d'électron. Le croisement intersystème (CIS), la conversion interne (CI) et la relaxation vibrationnelle sont des processus de relaxation qui ne résultent pas en une émission de lumière. Ce sont donc des processus non radiatifs.

### *II.3.2 Processus non radiatifs*

Un des processus non radiatifs les plus couramment rencontrés est la décomposition thermique dans laquelle l'énergie est dissipée en un mouvement thermique.

Ces relaxations vibrationnelles peuvent être soit intramoléculaires soit intermoléculaires en équilibre avec le milieu environnant. Les conversions internes (CI) et les croisements intersystème (CIS) sont des transitions non radiatives. Parmi ces émissions non radiatives, le CI est le phénomène le plus rapide suivi par un refroidissement vibrationnel et un croisement intersystème (CIS).

Des réactions chimiques peuvent aussi avoir lieu dans des états excités, de manière directe ou non. Les réactions directes sont de loin les réactions photochimiques les plus rapides et l'une des plus connue est la rupture de la liaison C-X où X = Br, I [Michl, 1990b]. L'excitation vibrationnelle d'un état excité peut conduire à une réaction chimique de manière similaire aux réactions activées thermiquement. Dans certains cas, l'excitation électronique ouvre de nouveaux chemins réactionnels qui sont dans certains cas difficilement accessibles. Par exemple, dans le cas où une barrière énergétique à la réaction est observée dans  $S_i$  et  $T_i$ , on peut la surmonter par une excitation de  $S_j$  ou  $T_j$  avec  $j > i$  et par une conversion interne (*figure 5*) [Michl, 1990c].

### III. STABILITE ET REACTIVITE DES IONS EN PHASE GAZEUSE

La formation d'un spectre de masse peut se décomposer en trois étapes ;

- formation et/ excitation de l'ion précurseur en phase gazeuse
- fragmentation (unimoléculaire) de cet ion précurseur
- identification puis détection des ions produits

Suivant leurs conditions de formation et leur « histoire », les ions présents dans un spectromètre de masse ont une certaine quantité d'énergie interne. Plus précisément, ils ont une certaine distribution en énergie interne ( $E_{int}$ ). Cette dernière a une influence sur le spectre obtenu [Vékey, 1996]. Si des ions ont une énergie interne élevée, une proportion importante se fragmentera, le spectre présentera de nombreux pics correspondant à divers ions fragments. Par contre, s'ils ont une énergie interne faible, les ions moléculaires ne se fragmenteront pas ou peu. Les ions précurseurs, suivant leur structure et leur énergie interne, peuvent se fragmenter suivant plusieurs réactions compétitives. La probabilité qu'un ion précurseur se décompose suivant une réaction donnée dépend de la vitesse de cette réaction. Par conséquent, les constantes de vitesse déterminent le ratio entre les ions précurseurs et ions produits, ainsi que les abondances relatives entre les ions produits. De plus, ces constantes de vitesse dépendent de l'énergie interne de l'ion précurseur. Les théories sur les vitesses de réactions sont habituellement reliées à des processus thermiques au cours desquels les molécules sont constamment activées et relaxées par collisions avec d'autres molécules (solvant, gaz, tampon, etc...). Dans ce cas, l'énergie interne de la molécule est décrite par une température thermodynamique macroscopique. Cette température ne présente pas uniquement l'énergie interne moyenne des espèces selon une distribution  $P(E)$  (qui définit la probabilité d'une espèce ayant une énergie spécifique) mais décrit également sa distribution généralement sous la forme Maxwell-Boltzmann. Ces distributions  $P(E)$  sont normalisées à 1. Par contre, les ions en phase gazeuse produits en spectrométrie de masse à basse pression sont des systèmes quasiment isolés dans la fenêtre de temps considérée. Les collisions sont considérées comme improbables et l'énergie interne (sa distribution) ne peut donc pas être décrite par une température. Il est donc nécessaire d'apporter un certain nombre de modifications aux théories statistiques sur les vitesses de réaction afin que ces dernières puissent être applicables en spectrométrie de masse. Pour ce faire, la théorie statistique : Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus [Marcus, 1951 et Marcus, 1952] Quasi Equilibrium Theory [Rosenstock, 1952] (RRKM/QET), proposée vers 1952, est utilisée.



### III.1 La théorie de la réaction unimoléculaire en spectrométrie de masse

#### *Un peu d'histoire .....*

Les origines de la théorie statistique RRKM/QET proviennent des années 1920 lorsque le mécanisme thermique d'une réaction unimoléculaire a été établie pour la première fois par Lindemann [Lindemann, 1922].

#### **Equation 1 :**



M est un gaz inerte tel que l'argon.

Ce mécanisme distingue l'étape d'activation/désactivation et de dissociation. Bien qu'il est encore difficile de modéliser les étapes d'activation et de désactivation, l'étape de la dissociation unimoléculaire peut être déterminée précisément.

La première version de la théorie statistique a été proposée par Rice, Ramsberger [Rice, 1927 et Rice 1928] et Kassel [Kassel, 1928] (théorie RRK). Cette théorie modélise le système en considérant  $s$  le nombre d'oscillateurs harmoniques classiques identiques. Dans ce modèle, la constante de vitesse de réaction  $k$  est exprimée comme une fonction de l'énergie interne  $E_{int}$  de l'ion étudié :

$$k(E) = \nu \left( \frac{E_{int} - E_0}{E_{int}} \right)^{s-1} \quad \text{Equation 2}$$

$\nu$  : facteur entropique (dit « de fréquence ») qui caractérise l'état de transition de la réaction

$E_{int}$  : énergie interne de l'ion moléculaire avant fragmentation

$E_0$  : énergie d'activation, c'est l'énergie interne minimale nécessaire à la fragmentation

$s$  : nombre des oscillateurs

Le terme  $\nu$  peut être défini par la relation suivante :

$$\nu = \left[ \frac{E_{int} - E_0}{h} \right] e^{\Delta S^\ddagger / k_B} \alpha \frac{\prod_j \nu_j^\ddagger}{\prod_j \nu_j} \quad \text{Equation 3}$$

$\Delta S^\ddagger$  : variation d'entropie d'activation du système. Ce terme traduit les exigences stériques et géométriques du complexe activé

( $\nu_j^\ddagger$  : fréquences vibrationnelles de l'état de transition,  $\nu_j$  : fréquences vibrationnelles de l'état initial).

$\Delta S^\ddagger$  est d'autant plus faible que l'état de transition associé à la réaction de dissociation est plus ordonné. Bien que ce traitement mathématique permette dans la plupart des cas une bonne approximation des aspects cinétiques des processus de dissociations d'ions parents en spectrométrie de masse, le fait de considérer une non quantification des oscillateurs est inexacte, ce qui entraîne une surestimation des constantes de vitesse. Afin de pallier ce problème, le nombre d'oscillateurs est parfois réduit de 20 à 30% par rapport à sa valeur réelle. Le modèle RRK [Rice, 1927 et Rice, 1928] n'est pertinent que pour des analyses qualitatives d'évolution de constantes de vitesse de réaction. Elle ne pourra donc pas être utilisée pour modéliser de manière quantitative les expériences de spectrométrie de masse.

En 1952, Rosenstock *et al.* [Rosenstock, 1952] ont développé la théorie du quasi-équilibre (QET) dans le cadre des réactions de fragmentation des ions moléculaires en spectrométrie de masse. Parallèlement, Rice et Marcus [Marcus, 1951 et Marcus 1952] développèrent la théorie Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus (RRKM) à partir des travaux de Rice et Ramsperger puis Kassel [Rice, 1927 ; Rice, 1928 et Kassel, 1928] dans les années 1920. Même si la théorie QET est traditionnellement citée quand les ions entrent en jeu, alors que la théorie RRKM l'est quand ce sont des molécules neutres, il est aujourd'hui reconnu qu'il y a une seule théorie statistique avec des nuances dans le traitement.

### *III.1.1 La théorie statistique RRKM/QET*

La théorie RRKM/QET qui est en fait la version microcanonique de la théorie de l'état de transition repose sur des simplifications [Gilbert, 1990] et des postulats [de Hoffmann, 1999]. Cette théorie suppose que les cinétiques des réactions sont contrôlées par l'état de transition. La fragmentation des ions est donc toujours une fragmentation sous contrôle cinétique et les processus sont en régime permanent, parfois allant dans le même sens que le contrôle thermodynamique, mais pas nécessairement.

La théorie RRKM/QET est basée sur les hypothèses suivantes [Rosenstock, 1952 et Rosenstock, 1963] :

- (i) Le temps nécessaire pour la dissociation est long par rapport au temps d'interaction amenant à l'excitation.
- (ii) La vitesse de dissociation de l'ion précurseur est lente comparativement à la vitesse de redistribution de l'énergie interne sur tous ses degrés de liberté.
- (iii) Dans le spectromètre de masse, un ion est un système isolé dans un état d'équilibre interne (un "système isolé" signifie qu'il n'y a pas d'échange d'énergie vibrationnelle avec son environnement, et, que son énergie interne est distribuée statistiquement au travers de ses différents oscillateurs internes). Il s'agit du principe d'ergodicité [Lorquet, 2000]. Par conséquent, la vitesse de fragmentation des ions dépend seulement de l'énergie interne et tend vers une valeur limite dans le domaine des hautes énergies internes pour un processus donné.
- (iv) Les ions fragments sont formés par des réactions unimoléculaires consécutives et compétitives.

L'équation RRKM/QET [Marcus, 1951 ; Marcus, 1952 et Rosenstock, 1952] donnant la vitesse de réaction pour une molécule à une énergie interne donnée  $E_{int}$  et une énergie d'activation  $E_0$  s'écrit :

$$k(E) = \frac{\sigma P^\ddagger(E_{int} - E_0)}{h \rho(E_{int})} \quad \text{Equation 4}$$

$\sigma$  : dégénérescence de la réaction, c'est-à-dire le nombre de chemins réactionnels équivalents

$h$  : constante de Planck

$P^\ddagger(E_{int}-E_0)$  : nombre d'états de l'état de transition d'énergie comprise entre  $E_0$  et  $E_{int}$

$\rho(E_{int})$  : densité d'état du réactif d'énergie interne  $E_{int}$

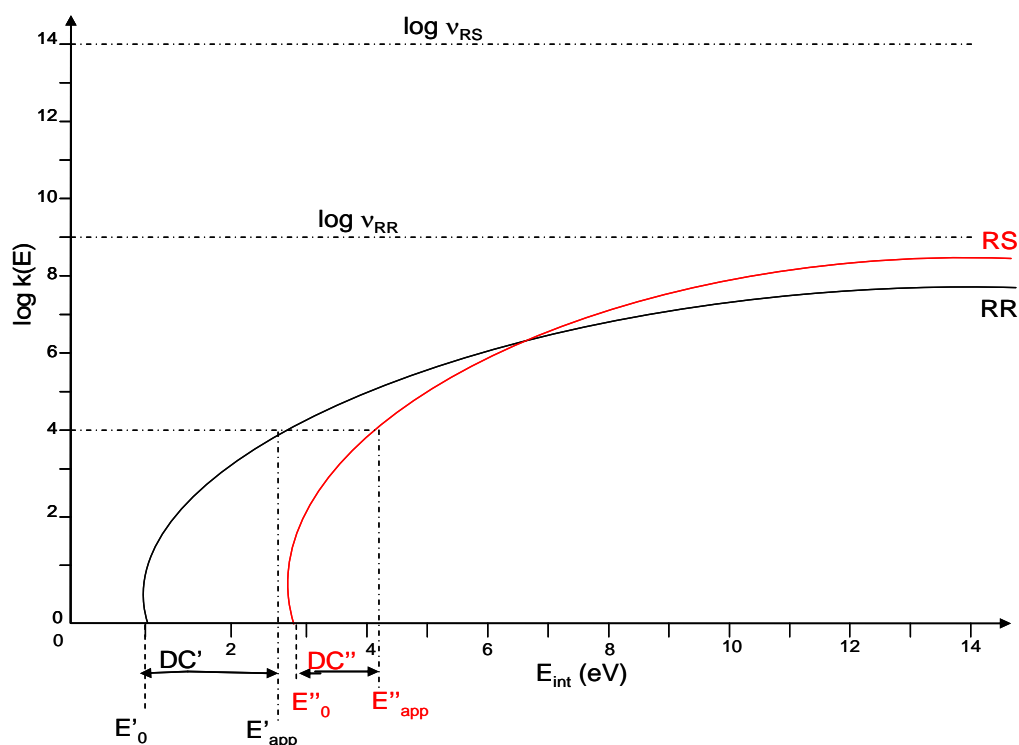
La répartition d'énergie interne se fait sous forme de quanta correspondant aux fréquences des oscillateurs de l'ion. Chaque mode de répartition de cette énergie représente un état. La notion de densité d'états définit le nombre de possibilités de répartir une quantité d'énergie donnée sur les oscillateurs de l'ion considéré. La réaction de fragmentation est

d'autant plus rapide que le facteur de fréquence  $\nu$  est élevé, ce qui signifie que l'état de transition est « lâche » (*loose*) plutôt que « tendu » (*tight*).

### III.1.2 Facteurs influençant le calcul de la constante de vitesse à une énergie interne donnée

#### a) La géométrie de l'état de transition

Le calcul de la constante de vitesse de dissociation impose la connaissance des fréquences vibrationnelles (ou fichier de fréquences) respectives de l'état initial de l'ion considéré ainsi que celles de son état de transition. La connaissance de ces deux termes permettrait de calculer la variation d'entropie  $\Delta S^\ddagger$  (**Equation 3**). Dans ce cas, la nature du processus de fragmentation est connue. Les fréquences vibrationnelles de l'état initial de l'ion considéré sont accessibles par calcul quantique tandis que celles de l'état de transition n'est généralement pas accessible. Si la nature du processus de fragmentation est connue, le facteur de fréquence est estimé. Généralement, la géométrie du complexe activé (état de transition) est décrite comme une géométrie « lâche » ou « tendue ». La géométrie de l'état de transition est dite « lâche » lorsque aucune des rotations n'est bloquée, c'est le cas des ruptures simples (RS) où l'état de transition est très proche de l'état final ( $\Delta S^\ddagger > 0$ ). Cette géométrie implique une densité d'état élevée et donc un facteur de fréquence important (estimé =  $10^{13-15} \text{ s}^{-1}$  selon [Vékey, 1996]). A l'inverse, la géométrie de l'état de transition est dite « tendue » lorsque certains degrés de liberté de rotation sont bloqués et que d'autres fréquences vibrationnelles peuvent changer ( $\Delta S^\ddagger < 0$ ), ceci implique une densité d'état relativement faible et donc un facteur de fréquence faible (estimé =  $10^{6-12} \text{ s}^{-1}$  selon [Vékey, 1996]). C'est le cas des réarrangements (RR). La **figure 6** montre des évolutions typiques de  $\log k(E) = f(E_{\text{int}})$  de deux processus compétitifs (une rupture simple et un réarrangement). Lorsque l'on trace les courbes  $\log k(E) = f(E_{\text{int}})$ , la limite de  $\log k(E)$  quand l'énergie interne tend vers l'infini correspond à  $\log \nu$ . Par conséquent, la vitesse de réaction maximale sera d'autant plus élevée que le facteur de fréquence aura une valeur élevée, c'est le cas en particulier lorsque l'état de transition est lâche.



**Figure 6** : Courbes  $\log k(E) = f(E_{\text{int}})$  dans le cas d'une dissociation compétitive faisant intervenir un mécanisme de fragmentation par rupture simple (RS) et un mécanisme de fragmentation par réarrangement (RR) à partir de l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  du butylbenzène obtenu par impact électronique couplé à un triple quadripôle

b) Le temps de résidence des ions

La fenêtre de temps d'observation ( $\tau$ ) imposée par le spectromètre de masse (source d'ionisation, analyseur de masse) limite l'ion produit empêchant l'observation de réaction à son seuil d'énergie d'activation (qui impliquerait un temps d'observation infini). Les temps peuvent varier de  $10^{-12}$  à quelques secondes selon le type de source et d'analyseur utilisés. Les valeurs typiques de temps de résidence des ions listés ci-dessous correspondent à des ions de masse moléculaire moyenne (pour des grosses molécules, le temps de résidence peut être plus long). Le temps de résidence dans la source à impact électronique est souvent considéré de l'ordre de 1  $\mu\text{s}$  alors qu'il est de 100  $\mu\text{s}$  en *electrospray*. Dans un piège ionique, ou dans la cellule d'un spectromètre FTICR, le temps de résidence des ions peut être de plusieurs centaines de millisecondes, contre 10 à 100  $\mu\text{s}$  dans un instrument à secteurs. L'énergie interne qui permet l'observation d'une réaction de dissociation est l'énergie d'apparition  $E_{\text{app}}$  qui est supérieure à  $E_0$  (**Figure 6**). La différence entre ces deux termes est appelée le déplacement cinétique [Lifshitz, 1982 ; Dunbar 1996 et Vékey, 1996]  $DC = E_{\text{app}} - E_0$ .

Connaissant le temps de décomposition imposé par l'appareil, l' $E_{app}$  peut être déduit à partir de la **figure 6** [ $\log k(E)$  en fonction de  $E_{int}$ ]. Pour que la réaction soit observée, il faut que l'ion excité ait suffisamment d'énergie interne pour se décomposer dans le laps de temps qui lui est disponible pour le faire.

### *III.1.3 Application de la théorie des réactions unimoléculaires à la spectrométrie de masse*

La théorie RRKM/QET qui représente un outil essentiel pour prévoir et expliquer les phénomènes de décomposition en spectrométrie de masse va permettre de corréler les abondances relatives des ions moléculaires et des ions fragments avec l'énergie interne, le temps de vie des ions précurseurs, la conformation du complexe activé et l'énergie d'activation. Les problèmes qui se posent en spectrométrie de masse sont essentiellement des problèmes de compétition entre fragmentations, à savoir, quelle est, parmi deux ou plusieurs fragmentations compétitives caractérisées par des mécanismes de fragmentation différents (ou non) et nécessitant des énergies d'activation différentes, celle qui domine à une énergie donnée. La fragmentation favorisée est toujours celle de plus forte constante de vitesse  $k$  à cette énergie. Le problème est donc directement lié, d'une part, aux énergies d'activation relatives ( $E_0$ ) pour les basses énergies, et d'autre part, aux vitesses de croissance relative des courbes  $\log k(E) = f(E_{int})$  pour les énergies les plus élevées.

L'exemple de l'ion moléculaire butylbenzène [Vékey, 1996] à  $m/z$  134 obtenu par ionisation par impact électronique couplé à un triple quadripôle représente le cas classique très fréquemment rencontré en spectrométrie de masse de la compétition entre une rupture par réarrangement (RR) et une rupture simple (RS).

La RS (perte du radical propyl) :  $E_0'' = 1,7$  eV,  $\log v = 14$ ,  $m/z$  91

La RR (élimination du propène) :  $E_0' = 1,0$  eV,  $\log v = 11$ ,  $m/z$  92

La réaction de dissociation devient possible lorsque l'énergie interne du système est comparable à la valeur d'énergie d'activation ( $E_0$ ), seuil caractérisant cette dissociation. La constante de vitesse de dissociation ( $k$ ) augmente avec l'augmentation d'énergie interne en excès par rapport à  $E_0$ . Le processus de rupture simple passe par un état de transition "lâche" et une énergie d'activation relativement élevée. Tandis que la réaction de réarrangement implique un état de transition de configuration "tendu", une faible énergie d'activation et une constante de vitesse qui croît lentement dans le cas d'une rupture simple (l'énergie d'activation de RR est plus faible que celle de RS parce que, dans son bilan énergétique, les

formations de liaisons compensent partiellement les ruptures). Ces différentes caractéristiques ont pour conséquence un croisement des courbes (*Figure 6*).

Lors de deux processus compétitifs, le rapport d'ions fragments diffère selon :

- la valeur d'énergie interne fournie
- la fenêtre d'observation imposée par le spectromètre

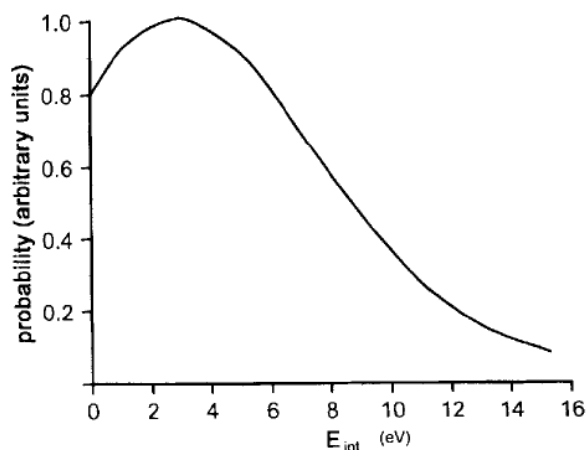
a) La fenêtre d'observation

Dans cet exemple, une source à impact électronique couplée à un triple quadripôle est utilisée ce qui induit un temps de résidence  $\tau$  d'environ  $10^{-4}$  s (source et analyseur) (*figure 6*). La fenêtre de temps d'observation d'un spectromètre de masse joue sur les valeurs déplacements cinétiques (DC) nécessaires pour observer des dissociations compétitives. Avec ce type d'instrument, les réarrangements sont favorisés. A partir de la *figure 6*, il est possible de définir les énergies d'apparition  $E_{app}$  correspondant aux énergies minimales nécessaires pour que l'ion puisse se dissocier dans la fenêtre d'observation considérée. En d'autres termes, il faut que l'ion excité ait suffisamment d'énergie pour avoir le temps de se décomposer. Dans un piège ionique, où le temps de résidence des ions est plus important que celui d'un triple quadripôle, les RR seront encore plus favorisés.

b) L'énergie interne  $E_{int}$  déposée sur l'ion

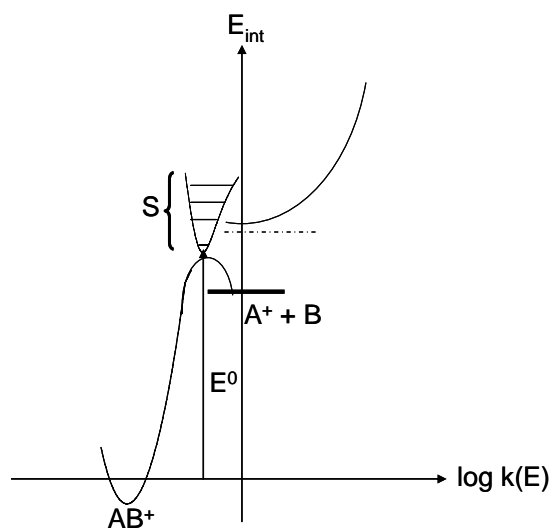
A partir des courbes illustrées dans la *figure 6*, on constate qu'à haute énergie le chemin réactionnel avec une densité d'états élevée et donc un facteur de fréquence  $\nu$  élevée est favorisé. On a donc une orientation cinétique. Tandis qu'à basse énergie, on se rapproche des orientations thermochimiques et le chemin réactionnel avec une énergie d'activation  $E_0$  basse, est favorisé. Les réarrangements dominent donc en basse énergie et les ruptures simples en haute énergie. Pour montrer l'influence de l'énergie interne, des spectres théoriques de l'ion radicalaire du butylbenzène ont été calculés par un logiciel basé sur la théorie RRKM [Drahos, 2001] à différentes valeurs d'énergie interne pour un temps de résidence égal à 1  $\mu$ s. Les spectres de masse sont complètement différents selon l'énergie interne déposée. En effet, selon la valeur de l'énergie interne fournie, le pourcentage de décomposition des ions (l'abondance des ions fragments par rapport à celle de l'ion parent) est différent. L'énergie déposée sur le système n'est pas ponctuelle (pic de Dirac) mais représente une distribution

d'énergie interne  $P(E)$ . La **figure 7** représente schématiquement la distribution d'énergie interne en impact électronique des ions moléculaires produits pour des électrons d'énergie cinétique de 70 eV. La gamme d'énergie interne des ions formés est comprise entre 0 et 15 eV. Il existe donc une distribution « non-thermique » de ces ions moléculaires formés. La distribution d'énergie interne dépend évidemment de l'énergie des électrons.



**Figure 7** : Distribution d'énergie interne théorique des ions moléculaires produits sous IE (70 eV) selon [Vékey, 1996]

Résumé :



**Figure 8** : Chemin réactionnel d'une réaction de fragmentation



Le calcul de la constante de vitesse nécessite donc la connaissance des paramètres suivants (**Figure 8**) :

- les conformations respectives de l'ion moléculaire et de l'état de transition (ET) et les fichiers de fréquence associés. Si un état de transition n'a pas pu être isolé, un facteur de fréquence  $\nu$  sera estimé
- l'énergie d'activation  $E_0$
- la taille de la molécule (degré de liberté DOF)
- la géométrie de l'appareil ( $\tau$  fenêtre d'observation qui définit l'observation du temps de vie des ions)
- la distribution d'énergie interne

## III.2 Energie interne

### III.2.1 L'ion précurseur

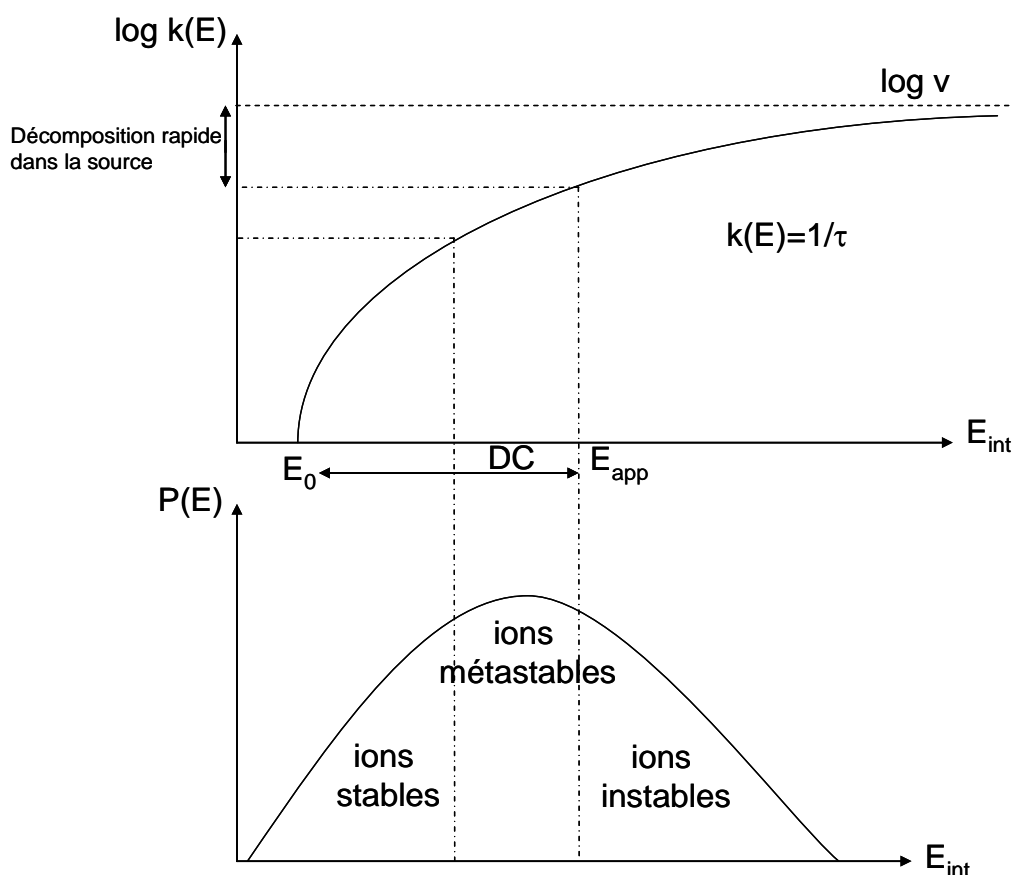
L'énergie interne moyenne d'un ion précurseur provient de deux sources différentes : la quantité d'énergie déposée dans le processus d'ionisation et l'énergie thermique de la molécule. Cette dernière est modélisée par une distribution étroite facile à déterminer à partir des propriétés physiques de la molécule [Derrick, 1995 ; Robinson, 1972] telles que ses degrés de liberté et les fréquences de vibration. Généralement, la contribution de l'énergie thermique en énergie interne de l'ion est négligeable par rapport à l'énergie transférée due à l'ionisation. L'ion précurseur est détecté uniquement si son énergie interne est basse. Les expressions telles que l'ionisation "dure" et "douce" sont liées à l'énergie interne déposée sur l'ion précurseur. L'ionisation "dure" indique que les ions possèdent une énergie interne moyenne élevée. Le spectre de masse comporte donc un ion précurseur avec une faible abondance et des ions fragments abondants. Par contre, l'ionisation "douce" signifie que l'ion précurseur possède une énergie interne moyenne basse. Il en résulte sur le spectre de masse une grande abondance de l'ion précurseur, tandis que les ions fragments sont absents ou peu abondants.

L'énergie interne moyenne dépend de la technique d'ionisation. En impact électronique (IE) pour des électrons d'énergie cinétique de 70 eV, la distribution d'énergie interne des ions moléculaires est décrite par une large distribution (comprise entre 0 et 15 eV) possédant une traînée à haute énergie interne (**Figure 7**). En *electrospray* (ionisation à

pression atmosphérique), le système n'est plus isolé, il y a relaxation. De Pauw et Vékey [Derwa, 1991, Collette, 1998a, Hoxha, 2001] ont montré que les multiples collisions dans la source *electrospray* peuvent amener finalement à une distribution d'énergie interne de type Boltzmann à laquelle est associée une température "caractéristique"  $T_{\text{char}}$  [Drahos, 1999].

L'évolution de la constante de vitesse de dissociation d'un ion polyatomique en fonction de son énergie interne peut être présentée sous la forme d'un diagramme de Wahrhaftig (**Figure 9**) [de Hoffman, 1999]. Cette représentation permet de relier les abondances relatives des ions avec la distribution d'énergie interne (représentée de façon simplifiée), l'énergie d'activation  $E_0$ , le temps de vie des ions précurseurs  $\tau$ , les seuils expérimentaux d'énergie d'apparition  $E_{\text{app}}$  et la conformation du complexe activé.

Si l'on considère un temps de résidence dans la source de  $10^{-6}$  s et un temps de vol de  $10^{-4}$  s (délai variable selon l'instrument utilisé, qui sépare l'ionisation du composé de l'arrivée de l'ion précurseur sur le détecteur), différentes classes de stabilité d'ions moléculaires sont rencontrées dans la source d'ions.



**Figure 9** : Diagramme de Wahrhaftig d'après [Baer, 1997]

Le diagramme supérieur montre l'évolution de  $\log k(E)$  en fonction de l'énergie interne selon la théorie RRKM/QET. Le diagramme inférieur représente la proportion d'ions précurseurs ayant l'énergie interne en abscisse.

Il apparaît trois zones dans le diagramme :

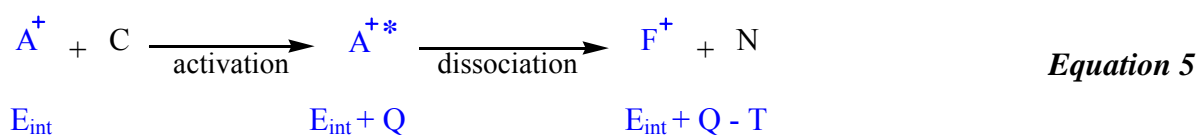
- les ions stables : les ions de durée de vie supérieure à  $10^{-4}$  s arrivent intacts au détecteur, formant le pic moléculaire des spectres de masse
- les ions instables : les ions de durée de vie inférieure à  $10^{-6}$  s se décomposent pour former des ions fragments
- les ions métastables : les ions de durée de vie intermédiaire se décomposent en dehors de la source pendant le trajet entre la source et le détecteur. Les fragments issus de ces ions métastables et ceux formés dans la source d'ions à partir des précurseurs instables empruntent souvent des voies réactionnelles différentes.

### III.2.2 L'excitation secondaire

Il est souvent souhaitable d'augmenter l'énergie interne hors source par excitation secondaire d'un ion sélectionné (pas nécessairement l'ion précurseur) pour le faire fragmenter. Les appareils construits pour réaliser ces expériences ont été appelés « tandem ». Ces instruments permettent de travailler en mode MS (analyse des ions produits dans la source), ou en mode MS/MS (analyse des ions produits d'un ion sélectionné). Le but de la MS/MS est d'augmenter le phénomène de dissociation métastable en excitant des ions stables hors de la source afin d'accroître son énergie interne et le faire fragmenter. Ces excitations secondaires sont réalisées par le biais de collisions ion-molécule (CID) ou ion-surface (SID).

Le mécanisme de dissociation par collision s'opère en deux étapes consécutives. La première, la plus rapide, est l'excitation de l'ion précurseur sélectionné  $A^+$  par collisions inélastiques avec des atomes de gaz cible C (gaz inerte : Ar, He,  $N_2$ ).

Au cours de ce choc, une fraction de l'énergie cinétique (translationnelle) de l'ion  $A^+$  est convertie en énergie interne, celle-ci va donc être augmentée d'une quantité Q. La transformation d'énergie cinétique en énergie vibrationnelle (ou électronique) dépend de la durée de vie du complexe de collision. La seconde étape est la dissociation de l'ion activé  $A^{+*}$  en ions fragments ( $F^+$ ) et en neutres (N) ; l'excès d'énergie interne sera partiellement perdu sous forme d'énergie cinétique T. Ces deux étapes peuvent se résumer en :



Il existe deux sortes de régime d'énergie de collision : soit un régime de collision de haute énergie de un à une dizaine de keV, pouvant s'effectuer avec des instruments à secteurs et TOF/TOF, soit un régime de collision de basse énergie de quelques eV à plusieurs centaines d'eV avec les instruments quadripolaires en tandem, et à piégeage d'ions (la trappe et le FT/ICR). La différence entre les collisions de basse et haute énergie est due essentiellement au temps d'interaction entre un ion et un atome de gaz cible. Le critère adiabatique de Massey [Massey, 1949] permet d'interpréter le rôle de la durée de l'interaction. En effet, il postule que l'efficacité du transfert d'énergie selon un mode d'excitation donnée (électronique ou vibrationnelle) s'effectue selon le temps de la transition énergétique le plus proche du temps d'interaction collisionnelle. Les transitions électroniques sont caractérisées par des temps d'interaction de l'ordre de  $10^{-15}$  à  $10^{-17}$  s alors que les transitions vibrationnelles dans l'état électronique fondamental sont favorisées pour des temps de collision de l'ordre de  $10^{-13}$  à  $10^{-14}$  s.

Les collisions de haute énergie (plusieurs keV) conduisent à une excitation électronique car le temps d'interaction ion-cible dans le complexe de collision est comparable aux périodes de transition électronique. Les collisions de basse énergie ( $< 100$  eV) permettant la formation d'un complexe de plus longue durée de vie entre un ion et le gaz cible, donnent lieu à une excitation uniquement vibrationnelle dans l'état électronique fondamental. De ce fait, les spectres CID à haute énergie sont davantage reproductibles que les spectres CID basse énergie. Lors de la collision, on considère qu'il y a un transfert d'énergie au centre de masse ( $E_{CM}$ ) tel que :

$$E_{CM} = E_{lab} \frac{m}{m + M} \quad \text{Equation 6}$$

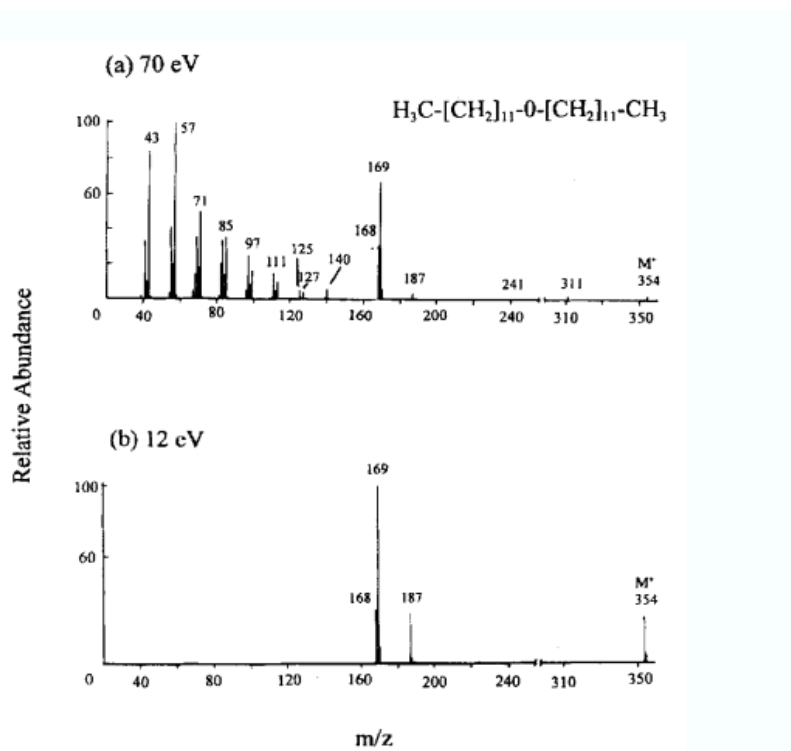
$E_{lab}$  : énergie de collision soit l'énergie cinétique de l'ion dans le référentiel du laboratoire (différence de potentiel entre la source et la cellule de collision et correspond à l'énergie cinétique de l'ion incident),  $m$  : masse de la cible et  $M$  : masse de l'ion incident

Cette énergie au centre de masse représente la quantité d'énergie cinétique maximale au centre de masse d'un complexe ion-molécule lors de la collision entre un ion et un gaz cible. Il est déduit de l'équation 6 que l'énergie transmise est faible dans le cas où l'ion incident possède une masse trop élevée. Ce transfert d'énergie dépend aussi de la durée de vie du complexe activé de collision. Le transfert sera donc plus efficace pour des collisions de basse énergie que pour des collisions de haute énergie. En collision de basse énergie où l'efficacité des fragmentations dépend de la pression du gaz cible, une augmentation de la

pression du gaz conduirait à des collisions multiples. Cette situation est rencontrée en MS/MS dans le piège à ions ou dans la cellule de collision d'un quadripôle. La nature du gaz cible influence aussi l'efficacité des processus CID. L'utilisation de gaz de masse élevée tels que l'argon, le xénon ou le krypton permet d'augmenter l'énergie disponible au centre de masse (*Equation 6*) et donc d'augmenter les constantes de vitesse de dissociation.

### III.2.3 Principe de la mesure d'énergie interne des ions par les thermomètres chimiques

L'énergie interne  $E_{int}$  des ions formés en spectrométrie de masse va influencer directement les profils spectraux. La présence sur un spectre de nombreux signaux intenses d'ions fragments est le signe d'une population d'ions possédant une grande  $E_{int}$ . Au contraire, si une population d'ions a une  $E_{int}$  faible alors peu d'ions fragments seront observés. Ceci est illustré par la *figure 10*, dans le cas de l'impact électronique où l'énergie cinétique des électrons est directement liée à l'énergie interne des ions formés. La connaissance exacte de la quantité d'énergie interne contenue dans les ions formés en source est par conséquent absolument primordiale pour interpréter correctement un spectre de masse.



**Figure 10:** Spectres en impact électronique d'un éther à  $m/z$  354 ( $M^+$ ) enregistrés (a) à 70 eV et (b) 12 eV d'après [Vékey 1996]

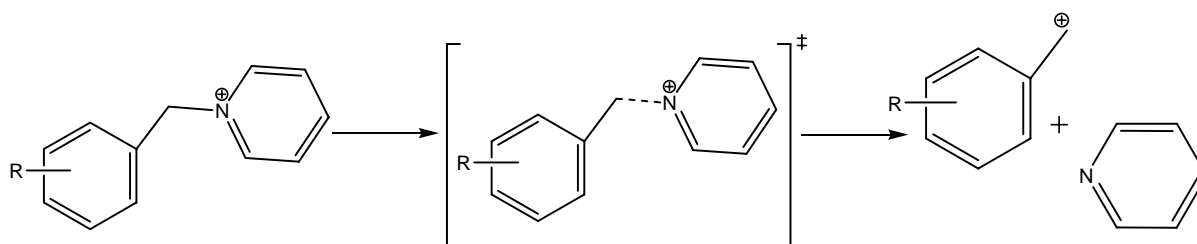
L'énergie interne d'une population d'ions n'est pas caractérisée par une valeur unique mais par une distribution plus ou moins large. La mesure expérimentale où la valeur théorique de la distribution d'énergie interne d'une population d'ions se révèle être particulièrement difficile en spectrométrie de masse. Cependant, différentes méthodes ont été mises au point. Tout d'abord, la méthode des "thermomètres moléculaires" ( $(C_2H_5)_4Si^{+\bullet}$ ,  $Fe(CO)_5^{+\bullet}$ ,  $W(CO)_6^{+\bullet}$ ) a été développée par le groupe de Cooks dans les années 80 pour évaluer l'énergie interne des ions formés en impact électronique après différentes méthodes d'activation collisionnelle [Wysocky 1987]. Quand à la méthode dite de "déconvolution" c'est une technique alternative mise au point par le groupe de Beynon [Vékey 1986]. Pour les techniques d'ionisation douces, la méthode du "taux de survivants" a été développée par l'équipe de De Pauw [Derwa, 1991 ; Collette, 1998a ; Collette 1998b]. C'est cette dernière méthode simple que nous avons utilisée pour mesurer l'énergie interne des ions formés en APPI afin de mieux comprendre les processus de fragmentation observés en source (chapitre 3).

La méthode du «taux de survivants» consiste à calculer le taux de survivant  $SY$  défini par :

$$SY = \frac{I_{P^+}}{I_{P^+} + I_{F^+}}$$

où  $I_{P^+}$  est l'intensité de l'ion précurseur et  $I_{F^+}$  l'intensité de l'ion fragment.  $SY$  correspond à la fraction d'ions qui ne possède pas une énergie interne suffisante pour passer la barrière d'activation  $E_o$  de la réaction de fragmentation.

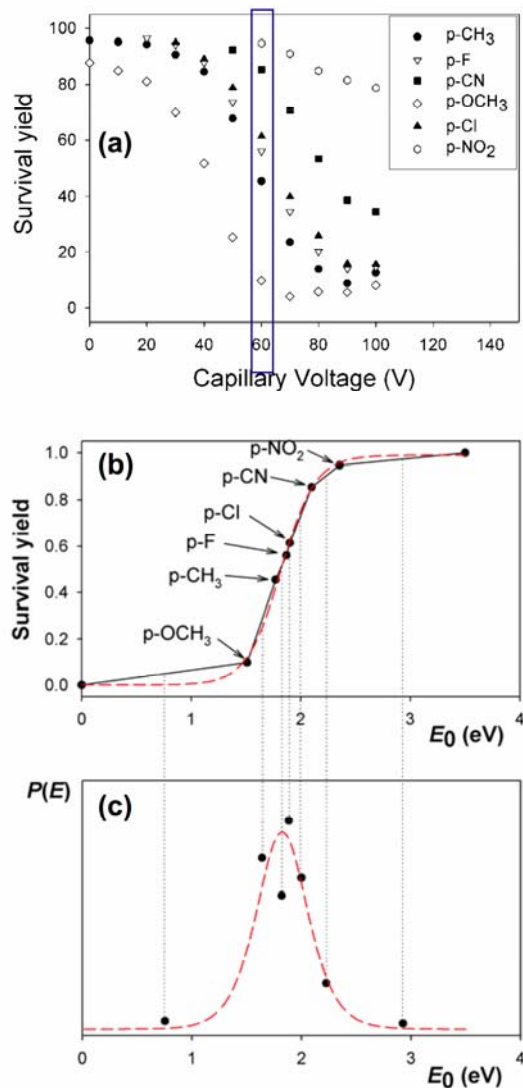
La voie de fragmentation privilégiée est un clivage simple de la liaison C-N, qui conduit à la formation d'un cation benzyle substitué et d'une molécule neutre de pyridine (**figure 11**).



**Figure 11:** Réaction de fragmentation des sels de benzylpyridinium

La dissociation est caractérisée par un état de transition «lâche», sans barrière énergétique d'activation. Ainsi, l'énergie d'activation (ou énergie critique)  $E_0$  peut être définie comme la différence d'enthalpie libre de formation entre les ions précurseurs et les ions fragments. Les valeurs de  $E_0$  pour chaque sel de benzylpyridinium substitué peuvent être obtenues par des méthodes de calculs empirique (AM1) ou *ab initio* (HF/6-31G\* ou B3LYP/6-31G) [Gabelica 2005 ; Naban-Maillet 2005]. La procédure à suivre pour obtenir les distributions d'énergie interne est la suivante :

- les valeurs de  $SY$  sont mesurées pour l'ensemble de sels de benzylpyridinium substitués
- les valeurs de  $SY$  sont reportées sur un graphique en fonction des énergies  $E_0$  (**figure 12a**). Deux points sont ajoutés sur le graphique : un point correspondant à un taux de survivant nul pour une énergie critique nulle et l'autre point correspond à un taux de survivant égal à 1 pour des énergies critiques grandes
- une courbe de tendance sigmoïdale est tracée
- la dérivée de la sigmoïde correspond directement à la distribution d'énergie interne  $P(E)$  des ions formés en source (**figure 12b**)



**Figure 12:** Calcul de l'énergie interne des ions par la méthode du "taux de survivants". Les valeurs de SY sont reportées sur un graphique en fonction des énergies  $E_0$  (a) et la dérivée de la sigmoïde correspond directement à la distribution en énergie interne  $P(E)$  des ions formés en source (b). D'après [Gabelica 2005]

La méthode du "taux de survivants" décrite précédemment ne prend pas en compte le déplacement cinétique et n'est donc pas quantitative. A une énergie critique égale à  $E_0$ , la constante de réaction de dissociation  $k(E)$  est trop faible pour observer la fragmentation des sels de benzylpyridinium durant le temps d'analyse  $\tau$  (quelques centaines de microsecondes dans le cas de notre spectromètre de masse). Des énergies supérieures à  $E_0$  sont nécessaires à la fragmentation et la valeur d'énergie interne moyenne calculée par la méthode du "taux de



survivants” est donc supérieure à la vraie valeur. Un moyen simple de prendre en compte le déplacement cinétique est de remplacer  $E_0$  par une énergie d’apparition  $E_{app}$ , qui correspond à l’énergie à laquelle la constante de vitesse de la réaction est égale à  $1/\tau$  [Collette 1998b]. Cette approche nécessite un logiciel de calcul des constantes de vitesse de réaction selon un modèle RRKM. Le logiciel MassKinetics, développé par l’équipe de Vékey, permet de réaliser l’ensemble de ces opérations [Vékey 1996].

En *electrospray* [Gabelica, 2005] et en MALDI [Gabelica, 2004], la distribution d’énergie interne peut être assimilée à une distribution thermique. Un nouveau paramètre peut être calculé.  $T_{char}$  est la température caractéristique d’une distribution d’énergie interne suivant une loi de Boltzmann, correspondant à des taux de fragmentation équivalents à ceux observés expérimentalement (**figure 12**). Ceci revient à remplacer  $I_{P^+}$  et  $I_{F^+}$  dans l’expression de  $SY$  par les expressions suivantes :

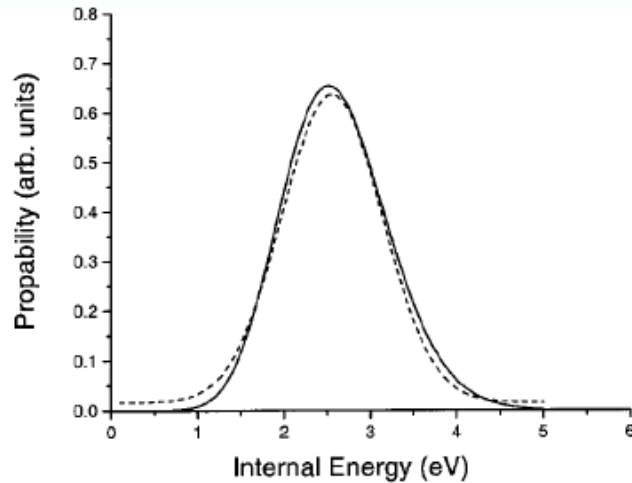
$$\frac{I_{P^+}}{I_{total}} = \int_0^{\infty} P(E).e^{-k(E).\tau} dE \quad \text{et} \quad \frac{I_{F^+}}{I_{total}} = \int_0^{\infty} P(E).(1 - e^{-k(E).\tau}) dE$$

et où

$$P(E;T) = \frac{N(E).e^{\left(\frac{-E}{k_B T}\right)}}{\int_0^{\infty} N(E).e^{\left(\frac{-E}{k_B T}\right)} dE}$$

avec  $N(E)$  la densité d’état de charge à une énergie  $E$ ,  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température de la distribution d’énergie interne selon une loi de Boltzmann.  $T_{char}$  correspond à la température  $T$  pour laquelle le taux de survivant calculé est égal aux taux de survivant observé expérimentalement.

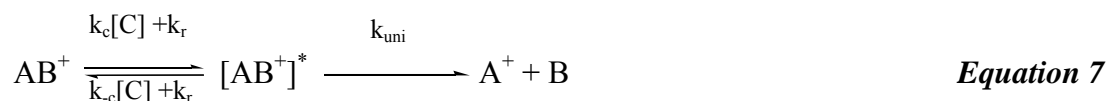
La mesure de  $T_{char}$  ne nécessite pas l’utilisation d’un jeu complet de thermomètre chimique, seule une espèce suffit à la caractériser. En *electrospray*, la mesure de  $T_{char}$  sur chaque benzylpyridinium substitué a permis de confirmer que tous les sels possèdent des distributions en énergie très proches les unes des autres [Drahos 1999, Naban-Maillet 2005].



**Figure 13** : Distribution en énergie interne du sel de p-méthylbenzylpyridinium en *electrospray* (cône à 30V) obtenu par la méthode du “taux de survivants” (ligne pleine) et par la méthode de la température caractéristique (ligne en pointillée,  $T_{char} = 947$  K), d’après [Drahos 1999]

### III.3 Cinétique de dissociation des ions selon une distribution d’énergie interne

Le mécanisme de Lindemann [Lindemann, 1922] qui se déroule en deux étapes est caractérisé par deux cas limites :



où  $AB^+$  est l’ion parent,  $[AB^+]^*$  est l’ion parent activé,  $A^+$  et B l’ion fragment et le neutre libéré, respectivement.

- (i) L’ion incident  $AB^+$  peut être activé/désactivé par collisions inélastiques avec un bain de gaz rare  $C = Ar, He$  (décrit par les vitesses  $k_c, k_{-c}$ ). Dans la théorie de Lindemann [Lindemann, 1922], chaque collision résulte en une désactivation de l’ion.

- (ii) L'ion activé noté  $[AB^{+}]^*$  peut se dissocier par un processus unimoléculaire caractérisé par la constante de vitesse  $k_{uni}$  calculée par la théorie RRKM [Marcus, 1951].

La distribution d'énergie interne  $P(E)$  est déterminée par l'équilibre établi par les processus d'activation/désactivation quand la dissociation est négligeable [Price, 1996 ; McLuckey, 1997 ; Dunbar 1998]. Il est important de noter qu'à basse pression en spectrométrie de masse, l'activation et la désactivation peuvent avoir lieu par des processus radiatifs (gain et perte de photons sont caractérisés par les constantes de vitesse  $k_r$  et  $k_{-r}$ ) [Price, 1996 ; McLuckey, 1997 ; Dunbar 1998].

La vitesse de formation d'ion fragment observée  $d[A^+]dt = k_{diss}[AB^+]$  dépend des vitesses d'activation, de désactivation et de la constante de vitesse de dissociation comme le montre l'équation suivante :

$$k_{diss} = \frac{k_{uni}(k_c[C] + k_r)}{k_{-c}[C] + k_{-r} + k_{uni}} \quad \text{Equation 8}$$

Il est important de considérer les cas limites dans lesquels les vitesses d'activation et de désactivation sont plus importantes que celles de la dissociation et vice-versa (les processus radiatifs n'ont pas été pris en compte).

### III.3.1 A haute pression ou « rapid energy exchange limit »

A haute pression (ou « rapid energy exchange limit » [McLuckey, 1997]), les constantes de vitesse d'activation et de désactivation sont plus grandes que les autres constantes de vitesse, ce qui induit que la distribution d'énergie interne  $P(E)$  est de type Boltzmann (dû à l'équilibre établi par les processus activation/désactivation). Elle n'est pas perturbée par la négligeable contribution de la dissociation. Cette distribution peut être considérée à une température appelée température effective [Wong, 1996 ; Drahos, 1999 et Ervin, 2000]. Le terme « effective » est employé puisqu'on n'est pas strictement en équilibre thermique avec un bain de gaz à une température  $T$ . La constante de vitesse de dissociation observable est la moyenne de la constante de vitesse unimoléculaire  $k(E)$  sur la distribution d'énergie  $P(E)$  :

$$\lim_{[M] \rightarrow \infty} k_{diss} = k_{diss}^{\infty} = \frac{k_{uni}(k_c[M])}{k_{-c}[M]} \quad \text{Equation 9}$$

$$k_{diss}^{\infty} = \int_{E_0}^{\infty} P(E)k(E)dE \quad \text{Equation 10}$$

Si  $k(E)$  est donné par la relation RRKM et  $P(E)$  par la distribution Maxwell-Boltzmann, il peut être démontré que la constante de vitesse dépendant de la température prend la forme de l'équation d'Eyring :

$$k_{diss}^{\infty} = \frac{k_B T}{h} \times \frac{\prod_j Q_j^{\ddagger}}{\prod_j Q_j} e^{-\varepsilon_0 / k_B T} \quad \text{Equation 11}$$

$h$  : constante de Planck

$k_B$  : constante de Boltzmann

$T$  : température effective

$Q_j$  et  $Q_j^{\ddagger}$  : fonctions de partition pour les  $j$  vibrations correspondant respectivement à l'état initial du réactant et à celui de son complexe activé. Les fonctions de partition rotationnelle et translationnelle sont négligées.

Chaque vibration peut être traitée comme un simple oscillateur harmonique avec des fréquences vibrationnelles  $\nu_i$ , la fonction de partition s'écrit donc :

$$Q^{vib} = \prod_i \{1 - \exp(-h\nu_i / kT)\}^{-1} \quad \text{Equation 12}$$

Arrhénius a montré que la constante de vitesse peut se mettre sous la forme suivante :

$$k_{diss}^{\infty} = A \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right) \quad \text{Equation 13}$$

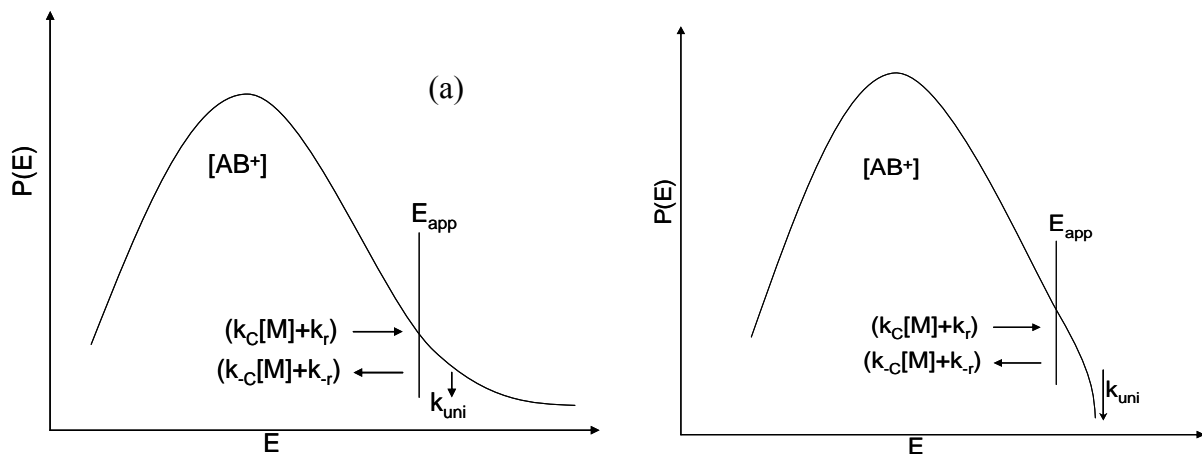
Cette équation est mieux connue sous le nom de loi de Van't Hoff. Graphiquement, au lieu de représenter la variation de  $k_{diss}^{\infty}$  en fonction de la température, on préfère plutôt représenter le logarithme de la constante de vitesse en fonction de  $1/T$ . Cette droite a une pente qui est égale à l'énergie d'activation  $E_a$  et une ordonnée à l'origine égale au facteur pré-exponentiel  $A$ . L'énergie d'activation  $E_a$  est la variation d'enthalpie entre le réactant et l'état de transition. A haute pression,  $E_a \approx E_0$  quand la distribution de Boltzmann n'est pas perturbée par une dissociation [Dunbar, 1998 ; Price, 1996 et Price, 1997].

### III.3.2 A basse pression ou “slow energy exchange limit”

A basse pression (ou “slow energy exchange limit”), la vitesse de dissociation est plus importante que les vitesses d’activation/désactivation [McLucky, 1997]. La situation est plus compliquée car la constante de vitesse de dissociation dépend des paramètres d’activation en plus des caractéristiques de l’état de transition. La détermination de la relation entre  $k_{diss}$  et  $E_0$  nécessite de modéliser les processus d’activation. Dans le cas de décompositions métastables, les ions se dissocient de façon unimoléculaire avec  $k_{uni}$  dépendant de leur énergie interne et les processus d’activation/désactivation ne se produisant plus. Dans ce cas, les ions précurseurs avec une énergie interne supérieure ou égale à l’énergie d’apparition ( $E_{app}$  qui dépend de la fenêtre de temps imposé par l’appareil  $\tau$  et de  $k(E)$ ) seront dissociés. Après un temps  $\tau$ , la distribution d’énergie interne  $P(E)$  de type Boltzmann est tronquée à partir de l’ $E_{app}$ .

$$\lim_{[M] \rightarrow 0} k_{diss} = k_{diss} = k_c [M] \quad \text{Equation 14}$$

Ces deux cas sont illustrés par la **figure 14** qui montre les distributions limites d’énergie interne hypothétique dans le cas où la dissociation est la vitesse limite (“rapid energy exchange”) et dans le cas où l’activation est la vitesse limite (“slow energy exchange”). Ces phénomènes sont caractérisés par le processus d’activation “slow heating” [McLucky, 1997].



**Figure 14** : Distributions d’énergie interne hypothétique de l’état stable des ions parents soumis aux collisions par processus d’activation “slow heating” dans les deux cas limites (a) “rapid exchange” et (b) “slow energy exchange”

## REFERENCES I

### B

[Baer, 1997] T Baer et P.M. Mayer, Statistical Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus quasiequilibrium theory calculations in mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 8, 1997, 103-115

[Berkowitz, 1979] J. Berkowitz, “*Photoabsorption, Photoionization and Photoelectron Spectroscopy*”, Academic Press, New-York, 1979, pp 5-13

### C

[Collette, 1998a] C. Colette et E. De Pauw, Calibration of the internal energy distribution of ions produced by electrospray, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12, 1998, 165-170

[Collette, 1998b] C. Colette, L. Drahos, E. De Pauw et K. Vékey, Comparison of the internal energy distributions of ions produced by different electrospray sources, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12, 1998, 1673-1678

### D

[Derrick, 1995] P.J. Derrick, P.M. Lloyd et J.R. Christie, Physical Chemistry of Ion Reactions, *Adv. Mass Spectrom.*, 13, 1995, 23-52

[Derwa, 1991] F. Derwa, E. De Pauw et P. Natalis, New basis for a method for the estimation of secondary ion internal energy distribution in “soft” ionization techniques, *Org. Mass Spectrom.*, 26, 1991, 117-118

[Drahos, 1999] L. Drahos, R.M. Heeren, C. Collette, E. De Pauw et K. Vékey, Thermal energy distribution observed in electrospray ionization, *J. Mass Spectrom.*, 34, 1999, 1373-1379

[Drahos, 2001] L. Drahos et K. Vékey, Mass kinetics : a theoretical model of mass spectra incorporating physical processes, reaction kinetics and mathematical descriptions, *J. Mass Spectrom.*, 36, 2001, 237-263

[Dunbar, 1996] R.C. Dunbar, *Adv. Gas Phase Ion Chem.*, 2, 1996, 87-124

## *E*

[Ervin, 2000] K.M. Ervin, Microcanonical analysis of the kinetic method : The meaning of the “effective temperature”, *Int. J. Mass Spectrom.*, 195/196, 2000, 271-284

## *G*

[Gabelica, 2004] V. Gabelica, E. Schulz et M. Karas, Internal energy build-up in matrix-assisted laser desorption/ionization, *J. Mass Spectrom.*, 39, 2004, 579-593

[Gabelica, 2005] V. Gabelica et E. De Pauw, Internal energy and fragmentation of ions produced in electrospray sources, *Mass Spectrom. Rev.*, 24, 2005, 566-587

[Gilbert, 1990] R.G. Gilbert et S.C. Smith, Theory of unimolecular and recombination reactions, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1990, 364 pp

## *H*

[Herzberg, 1966] G. Herzberg, “Spectra of diatomic molecules”, vol I, D. Van Nostrand Compagny, Princeton 1966, pp 18-21

[de Hoffmann, 1999] E. de Hoffmann, J. Charrette et V. Stroobant, *Spectrométrie de masse*, 2<sup>ed.</sup>, Dunod, 1999

[Hoxha, 2001] A. Hoxha, C. Collette, E. De Pauw et B. Leyh, Mechanism of collisional heating in electrospray mass spectrometry: ion trajectory calculations, *J. Phys. Chem. A*, 105, 2001, 7326-7333

## $\mathcal{K}$

[Kassel, 1928] L.S. Kassel, Studies in homogeneous gas reaction. I, *J.Phys. Chem.*, 32, 1928, 225

## $\mathcal{L}$

[Lifshitz, 1982] C. Lifshitz, Time-resolved appearance energies, breakdown graphs, and mass spectra : the elusive “kinetic shift”, *Mass Spectrom. Rev.*, 1, 1982, 309-348

[Lindemann, 1922] F.A. Lindemann, S. Arrhenius, I. Langmuir, N.R. Dhar, J. Perrin et W.C. Lewis, Discussion on the radiation theory of chemical action, *Trans. Faraday Soc.*, 17, 1922, 598-606

[Lorquet, 2000] J.C. Lorquet, Unimolecular reaction dynamics from kinetic energy release distributions. 7. Average translational energy release, *J. Phys. Chem. A*, 104, 2000, 5422-5429

## $\mathcal{M}$

[Marcus, 1951] R.A. Marcus et O.K. Rice, The kinetics of the recombination of methyl radicals and iodine atoms, *J. Phys. Colloid Chem.*, 55, 1951, 894-908

[Marcus, 1952] R.A. Marcus, *J. Chem. Phys.*, 87, 1952, 2657

[Massey, 1949] H.S. Massey, *Rep. Prog. Phys.*, 12, 1949, 3279

[McLuckey, 1997] S.A. McLuckey et D.E. Goeringer, Slow heating methods in tandem mass spectrometry *J. Mass Spectrom.*, 32, 1997, 461-474

[Michl, 1990a] J. Michl et V. Bonacic-Koutecky, “*Electronic aspects of organic chemistry*”, John Wiley & Sons, New-York, 1990, pp 8-60

[Michl, 1990b] J. Michl et V. Bonacic-Koutecky, “*Electronic aspects of organic chemistry*”, John Wiley & Sons, New-York, 1990, pp 380



[Michl, 1990c] J. Michl et V. Bonacic-Koutecky, “*Electronic aspects of organic chemistry*”, John Wiley & Sons, New-York, 1990, pp 64-73

## N

[Naban-Maillet, 2005] J. Naban-Maillet, D. Lesage, A. Bosse, Y. Gimbert, J. Sztaray, K. Vékey et J.C. Tabet, Internal energy distribution in electrospray ionization, *J. Mass Spectrom.*, 40, 2005, 1-8

## P

[Price, 1996] W.D. Price, P.D. Schnier, R.A. Jockusch, E.F. Strittmatter et E.R. Williams, Unimolecular reaction kinetics in the high-pressure limit without collisions, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 1996, 10640-10644

[Price, 1997] W.D. Price et E.R. Williams, Activation of peptide ions by blackbody radiation: factors that lead to dissociation kinetics in the rapid energy exchange limit, *J. Phys. Chem. A*, 101, 1997, 8844-8852

## R

[Rabalais, 1977] J.W. Rabalais, “Principles of ultra-violet photoelectron spectroscopy”, John Wiley & Sons, New-York, 1977, pp 99-103

[Rice, 1927] O.K. Rice et H.C. Ramsperger, Theories of unimolecular gas reactions at low pressures, *J. Am. Chem. Soc.*, 49, 1927, 1617-1629

[Rice, 1928] O.K. Rice et H.C. Ramsperger, Theories of unimolecular gas reactions at low pressures II, *J. Am. Chem. Soc.*, 50, 1928, 617-620

[Robinson, 1972] P.J. Robinson et K.A. Holbrook, *Unimolecular reactions*, Wiley, London, 1972

[Rosenstock, 1952] H.M. Rosenstock, M.B. Wallenstein, A.L. Wahrhaftig et H. Eyring, Absolute rate theory for isolated systems and the mass spectra of polyatomic molecules, *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 38, 1952, 667-678

[Rosenstock, 1963] H.M. Rosenstock et M. Krauss, *Mass spectrometry of organic ions*, Academic Press, F.W. McLafferty, Ed New-York, 1963

## S

[Shaw, 1998] D.A. Shaw, D.M.P. Holland, M.A. MacDonald, M.A. Hayes, L.G. Shpinkova, E.E. Rennie, C.A.F. Johnson, J.E. Parker et W. von Niessen, An experimental and theoretical study of the spectroscopic and thermodynamic properties of toluene, *Chem. Phys.*, 230, 1998, 97-116

## V

[Vékey, 1986] K. Vékey, A.G. Brenton and J.H. Beynon, Electron capture induced decomposition of the benzene  $C_6H_6^{2+}$  ion, *J. Phys. Chem.*, 90, 1986, 3569-3577

[Vékey, 1996] K. Vékey, Internal energy effects in mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 31, 1996, 445-463

## W

[Wong, 1996] P.S.H. Wong, S. Ma et R.G. Cooks, Ionization energy determination by the kinetic method, *Anal. Chem.*, 68, 1996, 4254-4256

[Wysocky, 1987] V.H. Wysocky, H.I. Kenttamaa et R.G. Cooks, Internal energy distributions of isolated ions after activation by various methods, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 75, 1987, 181-208

# *Deuxième partie*

## *Procédés expérimentaux*

*Chapitre 2 :*  
*Spectrométrie de masse*

## CHAPITRE 2 : Spectrométrie de masse

### I. LE SPECTROMETRE DE MASSE

#### I.1 Qu'est ce que la spectrométrie de masse

Parmi les différentes méthodes structurales utilisées en chimie organique, la spectrométrie de masse présente l'originalité de s'adresser à des substances analysées en phase gazeuse et non en phase condensée comme la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou la cristallographie par diffraction des rayons X.

Par ailleurs, la spectrométrie de masse fait appel non aux espèces moléculaires en tant que telles mais aux entités ioniques qui en proviennent. Tous les procédés en spectrométrie de masse reposent en effet sur les déplacements de particules chargées dans des champs électromagnétiques. Cela nécessite donc, pour que l'analyse d'une substance organique soit réalisable en spectrométrie de masse, une étape préalable d'ionisation de l'échantillon. La formation de ces espèces chargées en phase gazeuse doit se faire en évitant dans la mesure du possible de les détériorer, ou tout du moins en en connaissant les processus de détérioration possibles.

L'objet analysé en spectrométrie de masse correspond par conséquent à un flux gazeux ionique généré à partir de molécules introduites dans le spectromètre. Il est à noter, comme conséquence de ce qui précède, que la spectrométrie de masse est une méthode destructrice, l'échantillon ne pouvant être recouvert après analyse.

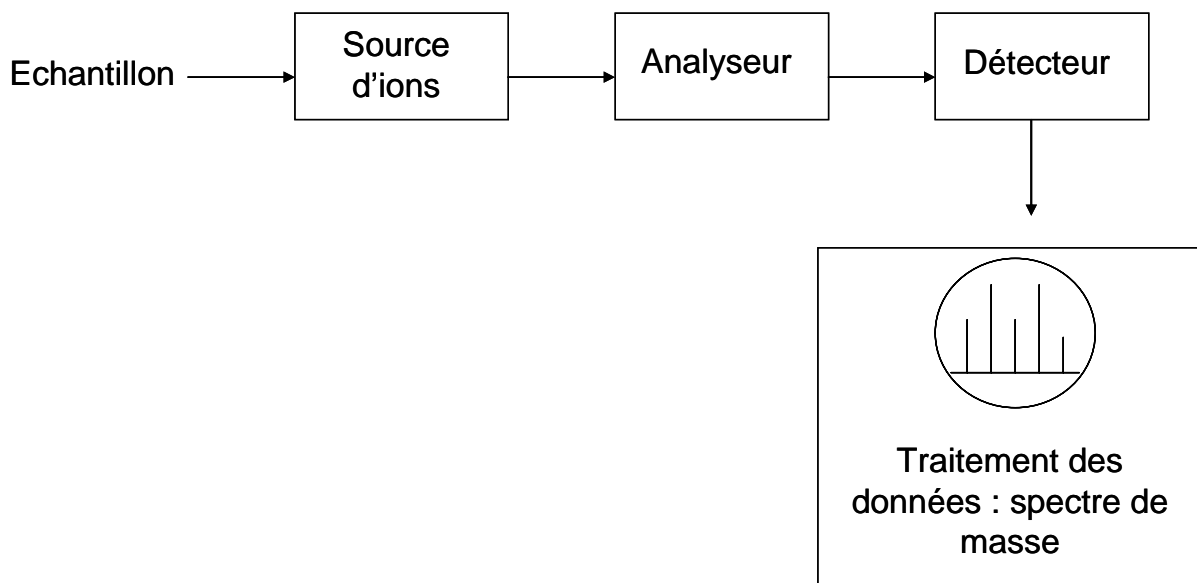
Une fois ces ions formés, le but est de pouvoir les séparer selon leur masse moléculaire  $m$ . En réalité, on ne sépare pas ces espèces selon  $m$  mais selon leur rapport masse-sur-charge ( $m/z$ ) de ces ions. Cette séparation des espèces se fait en utilisant la propriété des particules chargées lorsqu'elles sont placées dans des champs électriques et/ou magnétiques. En effet, un champ magnétique permet de modifier la trajectoire d'un ion sans modifier la norme du vecteur vitesse alors qu'un champ électrique permet de modifier leur vitesse et leur trajectoire. Tous les analyseurs de masse sont basés sur ces propriétés physiques simples.

Enfin, les espèces chargées doivent être détectées. Selon le type de détecteur, les ions seront détectés soit à des positions différentes, soit à des temps différents (détection spatiale

ou temporelle). Le détecteur est généralement associé à un système plus ou moins complexe de retraitement du signal. Ce système informatique permet le traitement des données et génère un spectre de masse qui précise la variation du courant ionique observé en fonction du rapport  $m/z$  et permet de déterminer la masse moléculaire de l'espèce analysée.

## I.2 Qu'est ce qu'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse est composé de trois grandes parties : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur (**Figure 1**). Une molécule subit une ionisation au niveau de la source. Dans l'analyseur, les ions sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Enfin, le détecteur collecte ces ions, quantifie leurs intensités et amplifie le signal. Ces dernières étapes se déroulent dans un vide poussé pour éviter toute collision entre les ions et les molécules de gaz. Après le détecteur, un système informatique permet le traitement des données et génère un spectre de masse qui précise la variation du courant ionique observé en fonction du rapport  $m/z$  et permet de déterminer la masse moléculaire de l'espèce analysée.



**Figure 1** : Représentation schématique d'un spectromètre de masse

Les sources, analyseurs et détecteurs existants peuvent être associés de manière différente et ainsi créer une grande variété d'appareils. Le choix d'un type de source ou d'un

type d'analyseur dépendra de la nature de l'échantillon à analyser et du type de données souhaitées (sensibilité, résolution et précision de la mesure).

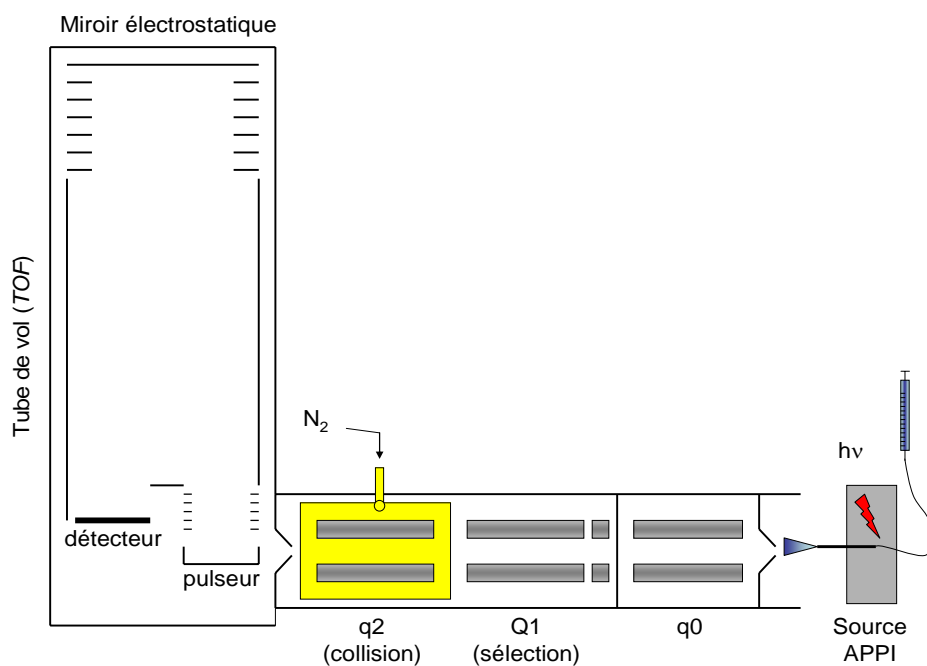
Dans cette étude, nous avons utilisé exclusivement un spectromètre hybride de type triple quadripôle/temps-de-vol (QStar pulsar *i*, Applied Biosystems). Les principales caractéristiques des appareils hybrides de type quadripôle/temps-de-vol commerciaux sont résumés dans le **tableau 1**. Dans la suite de ce chapitre, nous allons détailler les différentes parties de ce spectromètre en commençant à partir du détecteur pour finir par la source APPI dont un chapitre lui sera consacré.

**Tableau 1** : Principales caractéristiques des spectromètres hybrides quadripôle temps de vol commerciaux (en 2006)

	Bruker	Waters: QTOF		Applied Biosystems: QSTAR	
	BioTOF-Q	ultima	global	pulsar i	pulsar XL
gamme de masse Q1	4000	4000	4000	3000	6000
gamme de masse TOF	20000	20000	20000	12000	40000
focalisation collisionnelle	hexapôle	hexapôle		quadripôle	
résolution	~15000	~10000	~17500	~10000	~10000
sources	APCI/ESI/MALDI				

### I.3 Le spectromètre utilisé : le Qstar pulsar *i*

Le Q-Star pulsar *i* est un spectromètre hybride de type quadripôle/temps de vol, commercialisé par la société Applied Biosystems Sciex (Les Ulis, France), dont le schéma de principe est présenté sur la **figure 2**. Il est composé de trois quadripôles, dont un seul (Q<sub>1</sub>) sert d'analyseur de masse, q<sub>0</sub> et q<sub>2</sub> sont respectivement un guide d'ions (interface) et une cellule de collision (linac). Le quadripôle q<sub>2</sub> a aussi pour rôle de refocaliser et de thermaliser les ions avant de les injecter dans le temps de vol.



**Figure 2** : Schéma de principe du spectromètre de masse Qstar pulsar *i*

Ce spectromètre de masse peut travailler dans divers modes :

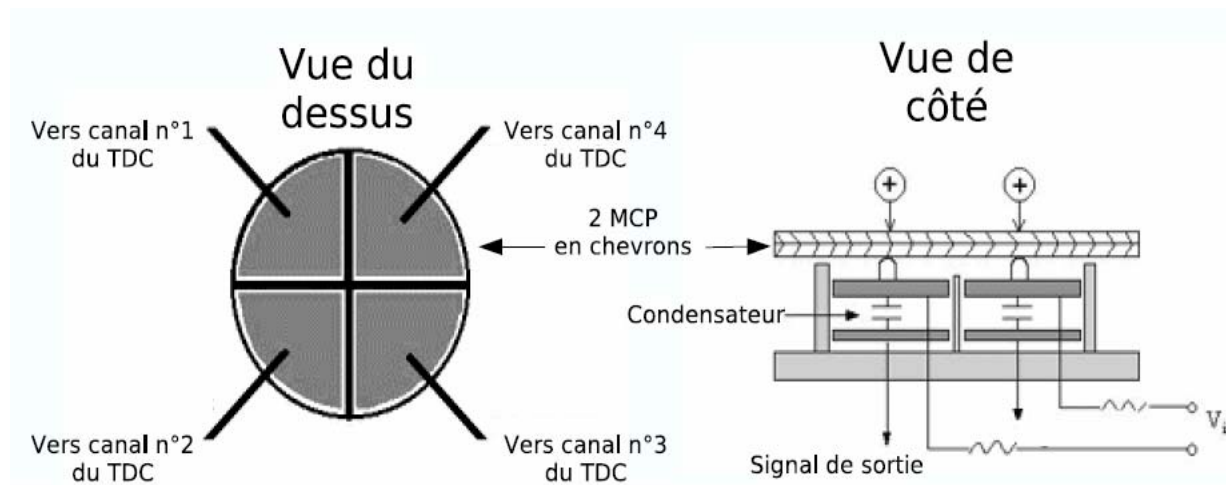
- *Q<sub>1</sub>-scan* : l'analyse en masse se fait par le quadripôle, et le temps de vol n'a alors aucun rôle de séparation des ions ; il guide juste ces derniers vers le détecteur.
- *TOF-MS* : c'est le mode le plus couramment utilisé. Les quadripôles ne servent qu'à focaliser les ions avant l'injection dans le temps de vol, qui sépare alors les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ , selon le temps nécessaire pour qu'ils atteignent le détecteur.
- *Product ion* : c'est le mode MS/MS classique. Le quadripôle  $Q_1$  sélectionne un ion de valeur  $m/z$  fixée par l'utilisateur. La résolution de sélection est variable : *low*, *unit* ou *high*, ces trois options fournissant une fenêtre de sélection d'environ 3 ; 1 et 0,25 u respectivement. Ces valeurs ne sont qu'approximatives, et ont tendance à augmenter avec le rapport  $m/z$  de l'ion parent. L'ion sélectionné est ensuite fragmenté dans  $q_2$ , par collisions avec des molécules d'azote ( $N_2$ ) ou d'Argon (Ar). Les ions fragments alors obtenus sont injectés et analysés dans le tube de vol (TOF).
- *Precursor ion* : dans ce mode, on balaye le quadripôle  $Q_1$ , alors que le TOF fonctionne de manière classique. On repère alors les évènements correspondant à la détection d'un ion de



valeur de  $m/z$  donnée dans le TOF, qui sont liés à une valeur de  $m/z$  donnée au niveau de  $Q_1$ . Il est ainsi possible d'identifier tous les ions fragmentant pour donner un ion fragment de  $m/z$  fixé.

## II. LE DETECTEUR EQUIPANT LE SPECTROMETRE DE MASSE

Le spectromètre de masse est équipé d'un système de deux galettes de microcanaux montées en chevron dont l'anode de collection est séparée en quatre quadrants (*figure 3*). Ces quatre parties peuvent être désactivées, si nécessaire, de manière indépendante les unes des autres. Ce système en quatre parties prend tout son intérêt lorsqu'un convertisseur temps-numérique (*Time to Digital Converter*, TDC) est utilisé pour l'acquisition du signal (*vide infra*). Ce dispositif permet une plus grande dynamique<sup>1</sup> de l'appareil et une meilleure détection des signaux ioniques de très faible amplitude, ce qui est souvent le cas lors d'expériences de spectrométrie de masse tandem où les ions fragments d'intérêt peuvent être minoritaires.



**Figure 3** : Schémas du détecteur à double MCP en chevron avec anode séparée en 4 quadrants

<sup>1</sup> la dynamique d'un appareil correspond au rapport entre les valeurs maximale et minimale que peut prendre un signal, et représente donc la capacité de détecter des signaux de très faible intensité aux côtés de signaux intenses sur un spectre.

### III. L'ANALYSEUR DE MASSE

Les analyseurs ont pour fonction de séparer les ions précédemment créés en fonction de leur rapport  $m/z$ . Il existe une grande variété d'analyseurs. Les plus courants sont des analyseurs dits à balayage qui détectent les ions successivement au cours du temps. De plus en plus d'appareils sont équipés d'analyseurs hybrides, associant plusieurs types d'analyseurs, et combinant ainsi les spécificités intéressantes de chacun. Le choix d'un analyseur va dépendre principalement :

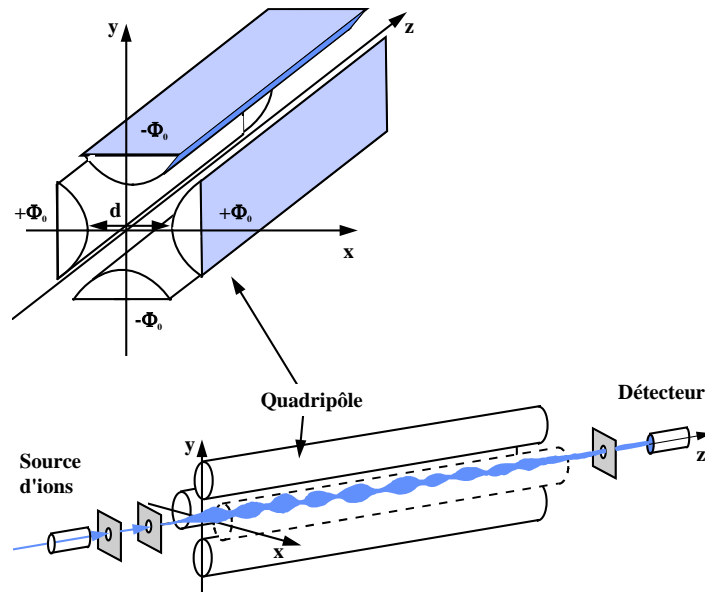
- de sa gamme de masse (la valeur limite du rapport  $m/z$  mesurable)
- de sa précision dans la mesure de la masse
- de sa résolution, c'est la capacité à différencier des ions de rapport  $m/z$  voisins

Dans cette étude, l'analyseur que nous avons utilisé est de type couplage quadripôle/temps de vol.

#### III.1 Les analyseurs de type quadripolaire

Le principe de cet analyseur est d'utiliser la stabilité des trajectoires des ions dans le quadripôle en fonction des tensions qui y sont appliquées pour les séparer selon leur rapport  $m/z$ .

Il est composé de quatre électrodes cylindriques parallèles reliées électriquement deux à deux [Dawson, 1986]. Les deux paires d'électrodes sont de polarité opposée, ce qui forme un champ électrique à deux dimensions (**Figure 4**). L'application simultanée d'une tension continue et d'une tension radiofréquence impose aux ions qui passent entre les cylindres un chemin oscillant. Pour des valeurs précises de tension et de radio fréquence, seuls les ions avec un rapport  $m/z$  donné peuvent atteindre l'extrémité des quadripôles et se diriger vers le détecteur.



**Figure 4** : Schéma d'un analyseur quadripolaire

Lorsque les ions entrent dans le détecteur, ils subissent donc les forces résultantes du champ électrique total composé du champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant selon l'équation :

$$\Phi_0 = \pm(U \pm V \cos \omega t)$$

où  $\Phi_0$  est la tension appliquée aux électrodes,  $\omega$  la fréquence angulaire,  $U$  la tension continue et  $V$  l'amplitude de la tension RF.

Ces forces vont alors définir les zones de stabilité des ions pour qu'ils soient transmis. Leur trajectoire va obéir à l'équation de Mathieu (résolue en 1866).

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cdot \cos 2\xi)u = 0$$

$$u = x \text{ ou } y, \quad \xi = \omega t / 2, \text{ et on a : } a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2 \omega^2}; q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2 \omega^2}$$

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

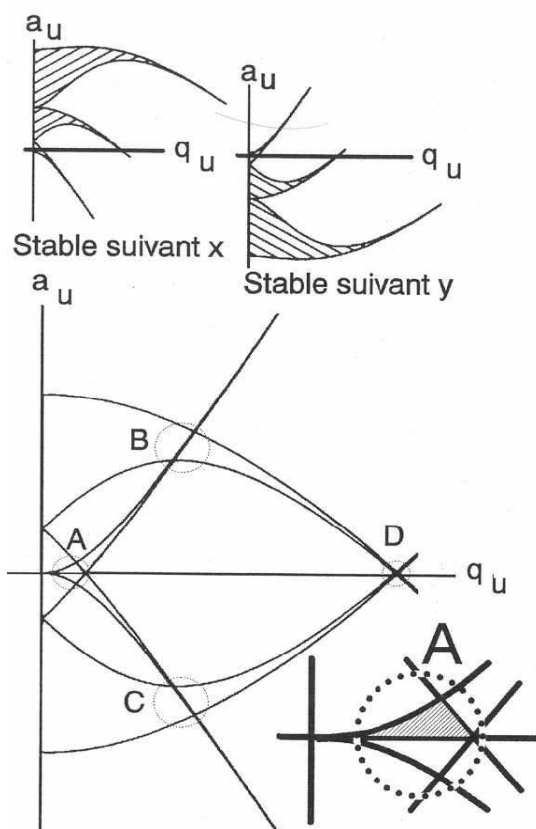
$\omega$  : la fréquence angulaire telle que  $\omega = 2\pi f$  ou  $f$  est la fréquence du champ alternatif

$m$  : la masse de l'ion

$ze$  : la charge de l'ion

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

Les ions vont donc être séparés en fonction de leur rapport  $m/z$ , par la variation de  $U$  et de  $V$ . Le champ électrique qu'elles vont créer va imposer aux ions une trajectoire oscillante selon  $x$  et  $y$ , tout au long de l'axe  $z$ . Pour que l'ion arrive jusqu'au détecteur, il suffira que les oscillations selon  $x$  et  $y$  ne dépassent pas  $r_0$ , le rayon du cercle inscrit entre les 4 électrodes.



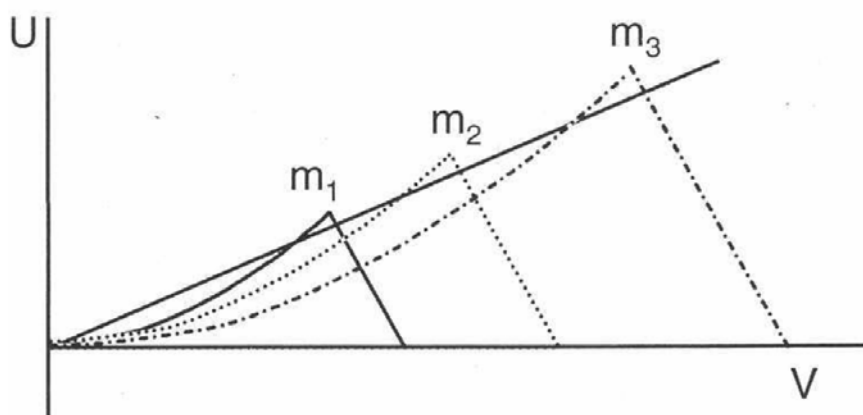
**Figure 5** : Zone de stabilité d'un ion de masse  $m$  donnée selon  $x$  ou  $y$  (en haut) et selon  $x$  et  $y$  (en bas). Les zones de stabilité sont entourées et notées A à D. La zone A (agrandie) est la zone couramment utilisée dans les spectromètres de masse. La partie hachurée correspond à  $U$  positif, d'après [March, 1989].

Dans un diagramme,  $a_u = f(q_u)$ , on peut représenter les zones de stabilité, ou zones de valeurs de  $U$  et  $V$  telles que  $x$  et  $y$  n'atteignent pas au cours du temps des valeurs supérieures ou égales à  $r_0$  (**figure 5**). En superposant les diagrammes de stabilité selon  $x$  et  $y$ , quatre zones de travail possibles, marquées de A à D, sont obtenues. De manière générale, les analyseurs utilisent la zone A où  $U$  est positif.

D'après les équations, le déplacement d'une masse à l'autre se fait en divisant de manière proportionnelle  $a_u$  et  $q_u$ . Ainsi, un balayage de  $U$  et  $V$  avec  $U/V$  constant permet de détecter

les différentes masses (*figure 6*). Plus la pente de la droite sera élevée, meilleure sera la résolution. Par contre, dans ce type d'appareil, on peut noter que la résolution et la sensibilité sont inversement liées.

A pente nulle, la résolution sera nulle, mais tous les ions seront transmis dès lors que la bonne tension  $V$  est appliquée, c'est le mode *RF only* très utilisé notamment dans le cadre du couplage de plusieurs analyseurs.



**Figure 6** : Zone de stabilité représentée dans un diagramme (U, V) pour des valeurs de masse croissante ( $m_1 < m_2 < m_3$ ). La droite correspond à un balayage linéaire de U en fonction de V

Les appareils commerciaux ont une gamme de  $m/z$  comprise entre 0 et 3000-5000 pour des résolutions maximales de 3000. Généralement, les analyses sont effectuées avec une résolution unitaire (séparation uniquement des ions distants d'une unité de masse). Ces analyseurs présentent l'avantage d'être peu encombrants, faciles à utiliser et à entretenir. Ils peuvent être miniaturisés et sont utilisés, par exemple, dans les sondes spatiales pour l'analyse de l'atmosphère des planètes ou de la composition des sols ou dans des analyseurs de gaz mobiles pour la détection de fuite, de polluants environnementaux ou de substances illicites.

## III.2 L'analyseur à temps de vol

### III.2.1 Principe général

L'analyseur à temps de vol ou TOF (pour *Time-of-Flight*) est, par son concept de base, le plus simple des analyseurs.

Si dans la source, les ions sont accélérés par une tension  $V_s$  et parcourent une distance  $d$  pour atteindre le détecteur sans aucune autre accélération, un ion de masse  $m$  et de charge totale  $q=ze$  aura une énergie cinétique  $E_c$  en sortie de source telle que :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = qV_s$$

Si les ions parcourent ensuite une distance  $d$  en un temps  $t$  dans un tube où ne règne aucune différence de potentiel et où le vide permet d'éviter d'éventuelles collisions, on a alors :

$$t = d \cdot \sqrt{\frac{m}{2zeV_s}} \quad \text{avec} \quad t = \frac{d}{v}$$

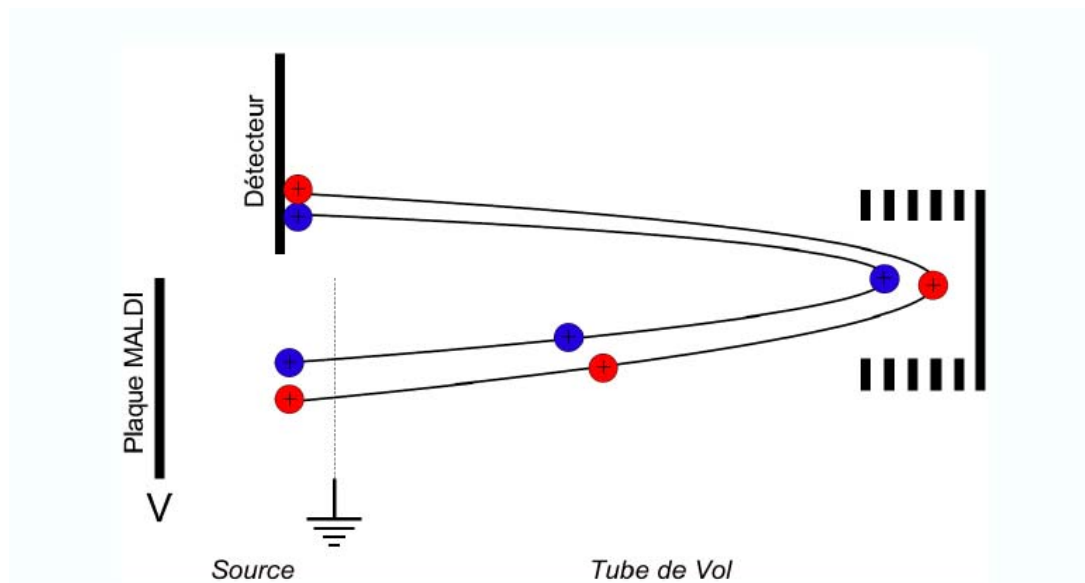
La mesure du temps de vol des ions permettra donc de déterminer leur rapport  $m/z$ . Le facteur de proportionnalité entre  $t$  et  $\sqrt{m/z}$  sera donc fonction de l'appareillage et des conditions expérimentales. Le principal problème de cette technique est le manque de résolution. En effet, la dispersion énergétique des ions à l'entrée de l'analyseur entraîne une grande perte de résolution. Cette dispersion a pu être compensée par l'introduction de systèmes qui permettent la refocalisation des ions à la fois sur le plan énergétique et sur le plan temporel. Ces systèmes sont l'extraction retardée [Vestal, 1995] et le réflectron [Cotter, 1992].

Dans le cas du couplage APPI-Q-TOF, il a été montré que l'énergie cinétique initiale des ions émis est de l'ordre de quelques eV au maximum (*cf.* chapitre 3). Cette énergie cinétique initiale est suffisamment faible pour que les approximations au premier ordre restent valables. Ainsi, l'étalonnage en masse est linéaire sur toute la gamme de masse aussi grande soit elle et seul le mode réflectron suffit pour atteindre des résolutions de l'ordre de 10 000. Ainsi, nous ne développerons ici que le mode réflectron.

### III.2.2 Le réflectron

Afin d'améliorer les performances des analyseurs TOF linéaire, le groupe de Mamyrin a mis au point un miroir électrostatique, ou réflectron, en sortie du tube de vol [Karataev, 1972 ; Mamyrin, 1973]. Ce miroir est composé d'une série d'électrodes annulaires portées à des potentiels croissants et permet de s'affranchir des effets de la distribution d'énergie cinétique initiale. Le champ électrostatique uniforme ainsi généré va permettre de pouvoir réfléchir les ions en fonction de leur énergie cinétique. En effet, les ions vont pénétrer d'autant plus profondément que leur énergie cinétique est grande. Ils vont donc parcourir un

chemin plus grand. Ainsi, deux ions de même  $m/z$  mais de vitesses initiales différentes vont être réfléchis de façon différente afin d'arriver sur le détecteur au même moment. De plus, le mode réflectron permet d'allonger le temps de vol des ions et par conséquent d'augmenter aussi la résolution en masse (*figure 7*).



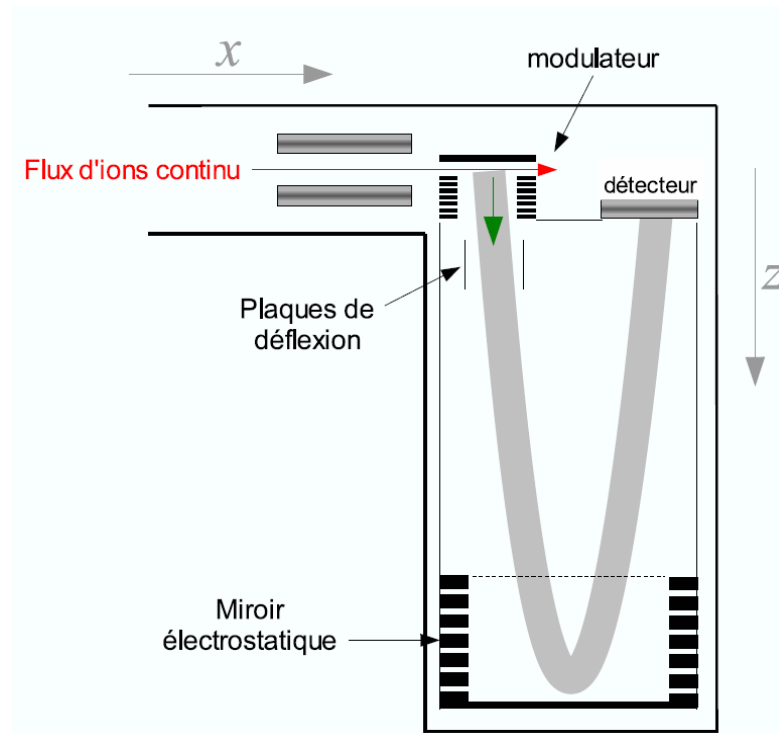
**Figure 7 :** Schéma illustrant le principe du miroir électrostatique. Deux ions de même rapport  $m/z$  mais de vitesse initiale différente, vont être réfléchis de façon différente. L'ion rouge, plus rapide, va pénétrer plus profondément dans le miroir que l'ion bleu. L'ion rouge va donc parcourir un trajet plus long et arrivera ainsi en même temps que l'ion bleu sur le détecteur.

Il existe commercialement trois types de miroirs électrostatiques. Un (réflectron à un étage) ou deux gradients (réflectron à deux étages) peuvent être appliqués aux électrodes annulaires. Un champ parabolique peut aussi être utilisé. Les réflecteurs à un étage sont des systèmes plutôt encombrants mais offrent une bonne transmission tandis que les réflecteurs à deux étages sont plus compacts, plus performants mais présentent une plus faible transmission des ions.

### III.2.3 L'injection orthogonale

Un spectromètre de masse équipé d'un analyseur TOF avec injection orthogonale des ions consiste en une source d'ions continue, un modulateur d'ions, un tube de vol et une

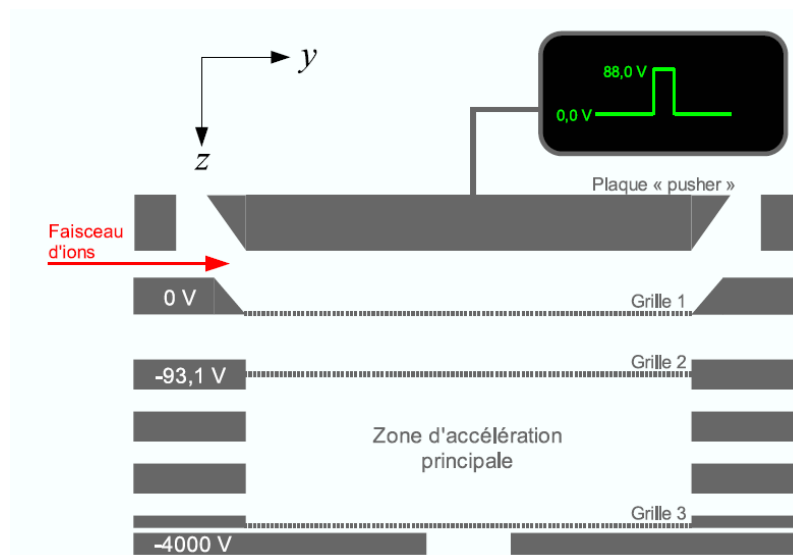
électronique rapide pour l'acquisition des données. La *figure 8* présente l'analyseur qui équipe ces instruments.



**Figure 8** : Schéma de principe d'un analyseur temps de vol à injection orthogonale

La source d'ions produit un faisceau d'ions presque monoénergétique, qui pénètre dans le modulateur (voir *figure 9*), entre une plaque et une grille. Cette région est initialement libre de champ, ce qui fait que les ions continuent leur chemin librement. Quand on applique un potentiel sur la plaque, un paquet d'ions est éjecté vers le tube de vol, presque parallèlement à ce dernier, puis accéléré dans la deuxième partie du modulateur à une énergie de quelques keV par charge, à l'aide d'un champ électrique uniforme. Le potentiel est appliqué sur la plaque à une fréquence de l'ordre du kilohertz. Les ions sont ainsi éjectés dans le tube de vol à cette fréquence, ce qui leur laisse un temps de vol maximal de quelques centaines de microsecondes. Le miroir électrostatique et le détecteur sont similaires à ceux utilisés dans les analyseurs TOF classiques, à ceci près qu'ils sont adaptés à la taille du faisceau d'ions, plus large que dans les analyseurs classiques.





**Figure 9** : Schéma du modulateur d'un analyseur TOF à injection orthogonale et des tensions appliquées

A l'origine, les ions étaient éjectés dans le TOF assez directement, via une interface ayant juste pour rôle d'effectuer un pompage différentiel permettant de passer de la pression atmosphérique de la source au vide du TOF, et de focaliser le faisceau d'ions. Dans ce cas, ce sont les caractéristiques du faisceau d'ions produit par la source qui vont définir les performances de l'appareil.

Puisque le faisceau d'ions en sortie de source est relativement divergent, l'obtention d'un faisceau étroit va s'accompagner de pertes importantes. Un autre inconvénient de cette introduction « directe » est la distribution en vitesse du faisceau d'ions selon l'axe du tube de vol, qui peut induire des discriminations en  $m/z$ .

Il est possible de surmonter ces problèmes en induisant des collisions des ions dans un quadripôle en mode RF à une pression relativement élevée, comme cela a été initialement utilisé dans les analyseurs quadripolaires [Douglas, 1992], et plus récemment pour les instruments à temps de vol [Krutchinsky, 1998]. Le champ radio-fréquence induit une oscillation des ions et leur collision avec les molécules de gaz résiduel, ce qui réduit leur vitesse. On obtient ainsi un faisceau d'ions refocalisé possédant une faible distribution en vitesse, à la fois selon les axes  $y$  et  $z$ , indépendamment des conditions initiales en sortie de

source. Ceci a pour effet de réduire la discrimination en  $m/z$ , et d'améliorer à la fois la sensibilité et la résolution.

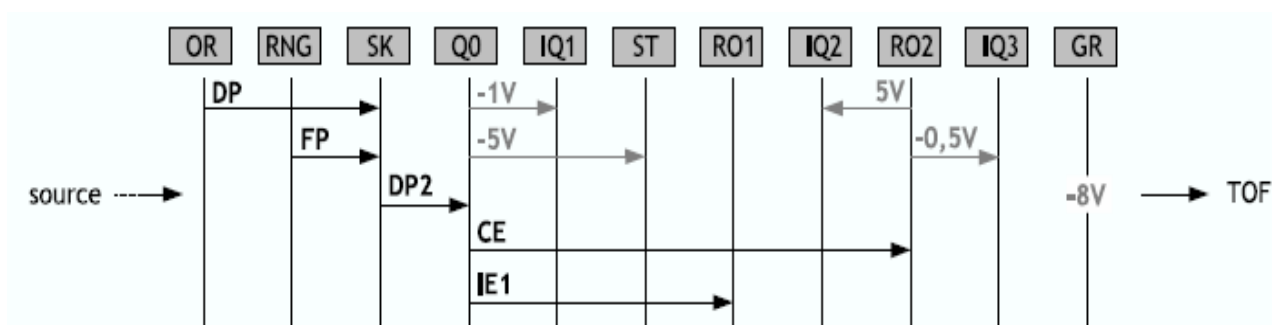
Dans l'instrument représenté à la **figure 8**, le faisceau d'ions doit être dirigé avec un angle convenable (à peine quelques degrés par rapport à l'axe  $z$ ) en sortie du modulateur, afin que les ions réfléchis puissent parvenir au niveau du détecteur. L'angle peut être corrigé, si nécessaire, par une déflexion électrostatique. Néanmoins, cette déflexion peut induire des variations du temps de vol qui vont gêner la mesure. Cette déflexion devient de toute façon inutile si les ions sortent du modulateur avec des rapports corrects des composantes de leur vitesse dans les directions  $y$  et  $z$ . Idéalement, les ions sortant du modulateur ont une composante  $v_z$  inversement proportionnelle à  $\sqrt{m/z}$ . Par contre, la composante  $v_y$  correspond à la vitesse des ions lors de leur entrée dans le modulateur. En *electrospray*, on peut considérer en première approximation que les ions formés ont la même vitesse, indépendamment du rapport  $m/z$ . Ainsi, le vecteur vitesse  $\vec{v} = \vec{v}_y + \vec{v}_z$  va avoir une orientation dépendant du rapport  $m/z$ . Certains ions vont donc avoir un angle de départ qui ne va pas leur permettre d'atteindre au final le détecteur.

Le refroidissement par collision dans le guide d'ion quadripolaire va intervenir pour régler ce problème : les ions refroidis, ainsi ralentis à des vitesses thermiques, peuvent être ensuite réaccélérés par application d'un champ électrique, pour leur donner une composante  $v_y$  inversement proportionnelle à  $\sqrt{m/z}$ . Le vecteur vitesse  $\vec{v}$  résultant a ainsi une orientation indépendante du rapport  $m/z$ , et on évite donc la discrimination selon  $m/z$ .

## IV. L'INTERFACE

### IV.1 Paramètres instrumentaux caractérisant l'interface

Les paramètres instrumentaux que l'utilisateur peut modifier sont présentés dans le **tableau 2**. Ils sont liés, pour certains d'entre eux, à des différences de potentiel entre certaines lentilles. La **figure 10** met en évidence l'interdépendance de certains paramètres.



**Figure 10** : Schéma des différences de potentiel appliquées entre les différentes lentilles du Qstar

En fonction de la gamme de masse choisie, le logiciel adapte automatiquement les paramètres de transmission du quadripôle  $Q_1$ . Cependant, des résultats ont montré que les paramètres fixés par le logiciel pouvaient parfois induire des problèmes de transmission dans certaines gammes de  $m/z$ , et il a parfois été nécessaire de les modifier manuellement.

**Tableau 2** : Signification des principaux paramètres instrumentaux du Qstar modifiables par l'utilisateur

Paramètres	Signification
GS1	Gaz nébuliseur (en psi)
GS2	Gaz nébuliseur 2 (TurboSpray et Photospray uniquement) (psi)
CUR	Gaz rideau (psi)
CAD	Gaz dans le quadripôle $q_2$ (gaz de collision MS/MS ou de focalisation en MS) (unités arbitraires)
ISV	<i>Ion Source Voltage</i> , potentiel appliqué sur le capillaire electrospray (en IonSpray, NanoSpray ou TurboSpray) ou sur le bloc source (en Photospray) (V)
TEM	Température de la source (TurboSpray et Photospray uniquement) ( $^{\circ}\text{C}$ )
DP	<i>Declustering potential</i> (V)
FP	<i>Focusing potential</i> (V)

DP2	<i>Declustering potential 2 (V)</i>
IE1	<i>Ion energy (V)</i>
CE	<i>Collision energy (en MS/Ms uniquement) (V)</i>
MCP	<i>Tension appliquée aux bornes du détecteur (V)</i>
IRD <sup>a</sup>	<i>Ion release width</i>
IRW <sup>b</sup>	<i>Ion release delay</i>

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

En mode MS/MS, les paramètres ont été systématiquement optimisés de manière à obtenir un spectre avec un bon rapport signal/bruit et une intensité raisonnable des ions fragments, tout en conservant un ion parent d'intensité suffisante pour qu'il soit identifiable sans ambiguïté (généralement, de manière à ce qu'elle soit au moins égale à 20 % de celle de l'ion majoritaire).

## REFERENCES II

### C

[Cotter, 1992] R.J Cotter, Time of flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules, *Anal. Chem.*, 64, 1992, 1027A-1039A

### D

[Dawson, 1986] P.H Dawson, Quadrupole mass analysers : performance, design and some recent applications, *Mass Spectrom. Rev.*, 5, 1-37

[Douglas, 1992] D.J. Douglas et J.B. French, Collisional focusing effects in radio frequency quadrupoles, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 3, 1992, 398-408

### K

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

[Krutchinsky, 1998] A.N. Krutchinsky, I.V. Chernushevich, V. Spicer, W. Ens et K.G. Standing, Collisional damping interface for an electrospray ionization time-of-flight mass spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 9, 1998, 569-579

### M

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

[March, 1989] R.E. March et R.I Hughes, *Quadrupole storage mass spectrometry*, Wiley, New-York, 1989

### V

[Vestal, 1995] M.L. Vestal, P. Juhasz et S.A. Martin, Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 9, 1995, 1044-1050

*Chapitre 3 :*  
*La photoionisation à pression*  
*atmosphérique*

## CHAPITRE 3 : La photoionisation à pression atmosphérique (APPI)

### I. INTRODUCTION ET BREF HISTORIQUE

#### I.1 Détection par Photoionisation couplée à la chromatographie en phase gazeuse

La photoionisation a été introduite il y a un peu plus de 30 ans comme une méthode de détection (PID) en chromatographie gazeuse (GC) [Driscoll, 1976 et 1977 et Davenport, 1984]. On utilise dans ce cas une lampe à décharge qui génère des photons dans le domaine des ultraviolets (UV). Si l'un de ces photons est absorbé par une espèce ayant un potentiel de première ionisation (PI) inférieur à l'énergie du photon, une ionisation simple photon peut avoir lieu. Les photoions ainsi générés sont détectés par la mesure du courant électrique au niveau d'une électrode de collecte. La lampe de photoionisation est choisie de telle façon que l'énergie des photons soit comprise entre le potentiel de première ionisation de l'analyte et celui du gaz porteur. En effet, la plupart des molécules organiques ont des potentiels d'ionisation compris entre 7 et 10 eV, tandis que ceux des gaz porteurs courants en GC (*Gas Chromatography*) ont des valeurs plus élevées. On peut alors obtenir une ionisation sélective de l'analyte, tout en limitant le bruit de fond.

#### I.2 Détection par Photoionisation couplée à la chromatographie en phase liquide

Les quelques expériences de photoionisation couplée à la chromatographie liquide (PI/LC) rapportées dans la littérature reposent aussi sur la détection directe du courant des photoions [Schermund, 1975 et Locke, 1982], sans analyse de masse ultérieure. Une ionisation sélective des analytes est possible, car la majorité des solvants utilisés en LC (*Liquid Chromatography*) ont des potentiels d'ionisation relativement élevés (**Tableau 1**). Ainsi, ces expériences de PI/LC, particulièrement celles utilisant une étape de vaporisation à la sortie de la LC, sont basées sur un principe proche de celui de la PID/GC. Seule une de ces études utilisait une photoionisation directement sur l'éluant liquide [Locke, 1982].

**Tableau 1** : Energies d'ionisation de divers composés organiques

Solvant ou gaz	Energie d'ionisation (eV)
Diazote	15,58
Dioxyde de carbone	13,78
Eau	12,62
Acétonitrile	12,20
Dioxygène	12,07
Méthanol	10,80
Isopropanol	10,17
n-hexane	10,13
Ammoniaque	10,07
Heptane	9,93
Hexafluorobenzène	9,90
Acétone	9,70
Benzène	9,24
Toluène	8,83
Anisole	8,20

### I.3 Les prémices de la spectrométrie de masse par photoionisation à pression atmosphérique (APPI)

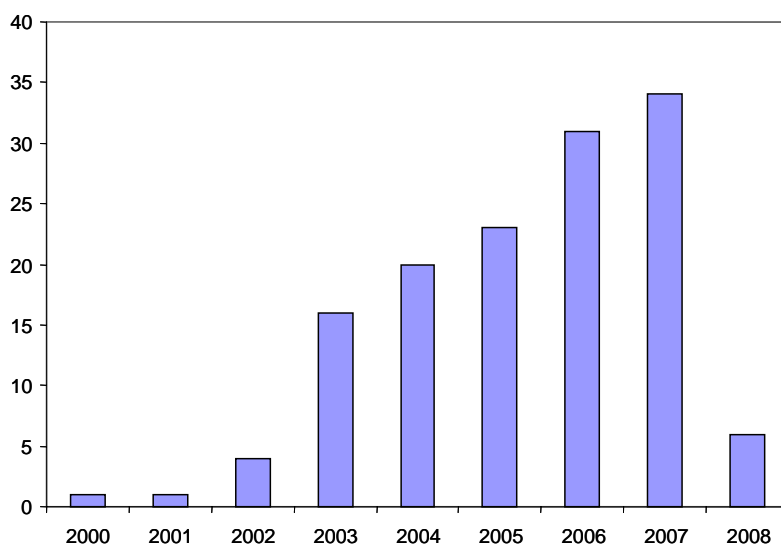
Alors qu'on retrouve dans la littérature plusieurs exemples d'utilisation de l'APPI couplée à la spectrométrie de mobilité ionique (IMS) [Baim, 1983 et Leasure, 1986], seuls Revel'skii et *al.* ont mis au point une véritable analyse de masse (c'est-à-dire en  $m/z$ ) de photoions créés à pression atmosphérique [Revel'skii, 1991]. Ils sont les premiers à avoir couplé l'APPI à la spectrométrie de masse en remplaçant les sources  $^{63}\text{Ni}$  d'un nébuliseur chauffé par une lampe VUV [Revel'skii, 1986 et Revel'skii, 1991]. Ces expériences utilisent un gaz porteur (de l'hélium) pour amener l'échantillon préalablement vaporisé vers la zone d'ionisation. Cette ionisation se fait grâce à une lampe à hydrogène ( $h\nu = 10,2$  eV) et les ions formés sont analysés par un quadripôle. Des diverses expériences décrites par Revel'skii, on peut tirer plusieurs conclusions utiles au vu d'utiliser cette méthode comme source d'ionisation en spectrométrie de masse :



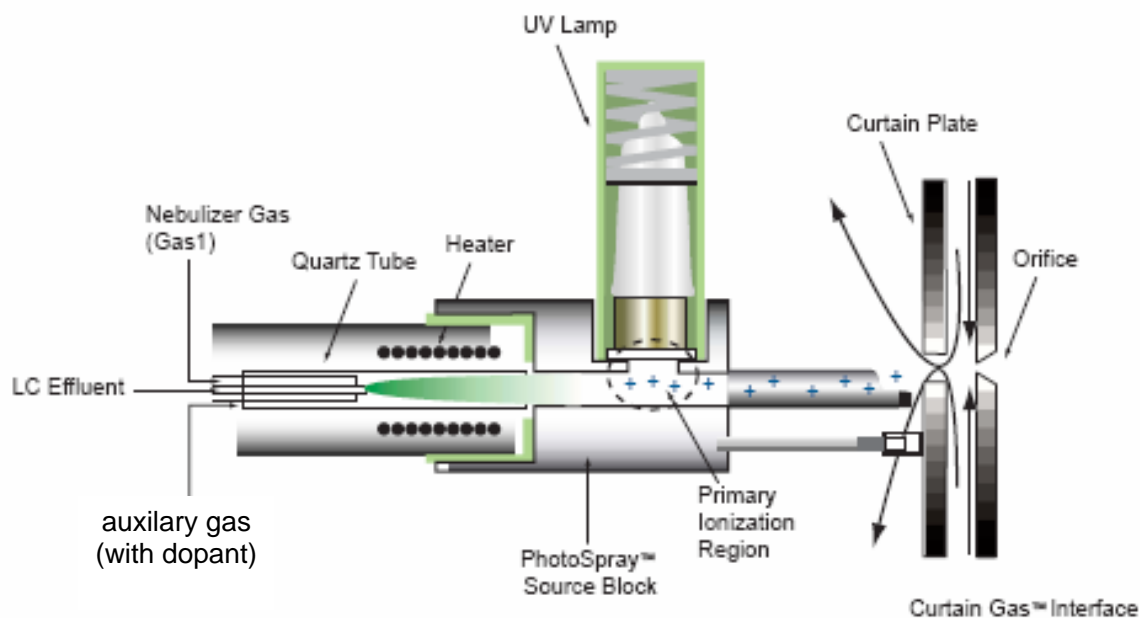
- (i) L'abondance relative des ions sur les spectres obtenus dépend de la concentration de l'échantillon. A haute concentration, les réactions ion-molécule, et en particulier les échanges de charge, induisent des discriminations selon les espèces : la majorité des charges réside sur les espèces de faible potentiel d'ionisation (PI).
- (ii) Par photoionisation à pression atmosphérique, les ions majoritaires sont les ions moléculaires ou pseudo-moléculaires, ce qui indique qu'il y a peu de fragmentations lors de l'étape d'ionisation.
- (iii) Quand on augmente la concentration en vapeur d'eau ou de méthanol dans l'échantillon, on observe une perte de sensibilité.

Quelques années plus tard et à partir de ces résultats, la possibilité d'utiliser une source d'ion APPI comme interface pour la LC/MS a été reconnue par Bruins *et al.* Ces derniers ont développé leur propre source d'ions APPI et l'ont appliquée à l'analyse d'échantillons liquides élués en chromatographie liquide (LC) pour coupler la spectrométrie de masse à des techniques de séparation en phase liquide [Robb, 2000]. L'idée de base était d'étendre le domaine d'application de la chromatographie liquide à des molécules qui ne sont pas - ou difficilement - ionisables par l'*electrospray* (ESI) ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). L'introduction de l'APPI a donc suscité un intérêt croissant parmi la communauté analytique et le nombre d'applications de cette technique a augmenté très rapidement (**Tableau 2**). Néanmoins, sa récente apparition en 2000 [Robb, 2000] implique un nombre peu élevé d'articles dans la littérature mais qui croît régulièrement.

**Tableau 2** : Nombre d'articles publiés dans la littérature dédiés à l'APPI-MS (source : *Web of Science*, keyword : APPI)



Cette nouvelle source d'ionisation développée pour la LC/MS est la source Photospray™ [Robb, 2000]. Le schéma de cette source est donné à la **figure 1**. Elle a été conçue sur la base de la source APCI de chez Applied Biosystems/Sciex ; schématiquement il s'agit d'une source APCI pour laquelle l'aiguille permettant la décharge corona a été remplacée par une lampe UV.

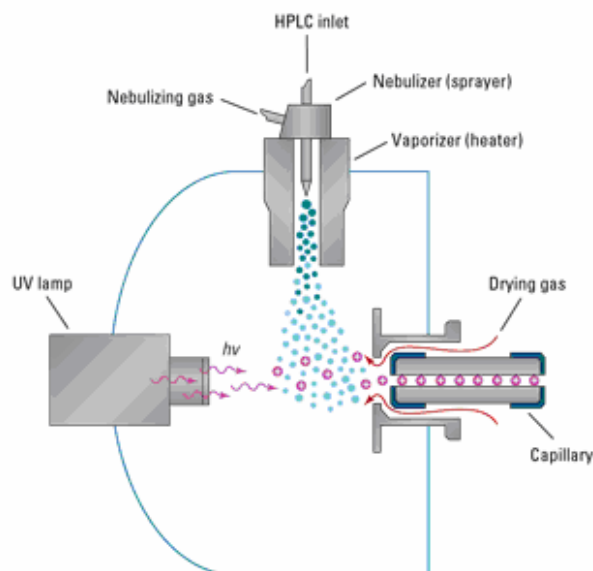


**Figure 1:** Schéma de la source Photospray™

Cette source est composée de deux capillaires d'introduction distincts, l'un pour l'analyte et l'autre pour un éventuel dopant, dont le rôle sera expliqué plus tard. Ces deux capillaires sont associés à deux entrées de gaz nébulisateur qui vont aider à la formation d'un nébulisat. Le nébulisat formé pénètre dans un tube en quartz chauffé à une température comprise entre 250 et 500 °C pour y être vaporisé. La vapeur ainsi formée se retrouve au final exposée aux photons produits par la lampe UV. C'est au niveau de cette région, qui est libre de champ, que va se produire la photoionisation selon un mécanisme présenté dans la partie suivante. Les ions formés sont transférés dans le spectromètre de masse par application d'une différence de potentiel entre le bloc source et la *curtain plate* du spectromètre. Comme dans les autres sources à pression atmosphérique qui peuvent être adaptées sur le spectromètre Q-Star (spectromètre de masse utilisé ici), un gaz rideau (*curtain Gas*) arrivant à contre-courant des ions permet de protéger le spectromètre d'une pollution et aide à la désolvatation.

Dans le même temps, une autre source a été développée par Syagen Technologies Inc., basée sur la source APCI de Agilent (**Figure 2**) [Syage, 2001]. Cette source a été initialement

conçue pour être utilisée sans dopant. Les différentes études montrent d'ailleurs [Hanold, 2004] que l'on obtient beaucoup plus de photoionisation directe des analytes que dans le cas de la source Photospray<sup>TM</sup>. A l'heure actuelle, cette source est disponible chez Agilent Technologies et ThermoFinnigan.



**Figure 2:** Schéma de principe de la source Photomate<sup>TM</sup>, d'après les documents Agilent (<http://www.chem.agilent.com>)

#### I.4 Principe de base de ces sources : le *thermospray*

La première étape de la photoionisation à pression atmosphérique est basée sur la vaporisation des analytes en solution grâce à un *thermospray*. La source Photospray<sup>TM</sup>, développée par Bruins *et al.*, est basée sur ce processus. Au laboratoire, nous disposons d'un prototype de cette source commercialisée par la société Applied Biosystems/Sciex. La première question qu'on s'est posée avant de commencer à travailler avec cette source est de savoir si pour une certaine température une dégradation thermique de l'échantillon est possible.

Afin de mieux rendre compte de ce phénomène, des sels de benzylpyridinium substitués (thermomètres chimiques) ont été utilisés dans cette étude. Pour réaliser cette étude, des sels de benzylpyridinium substitués, synthétisés à l'Université de Liège, ont été utilisés. Pour ce faire, trois mélanges de sels de benzylpyridinium ont été étudiés et sont décrits dans le **tableau 3** ci-dessous :

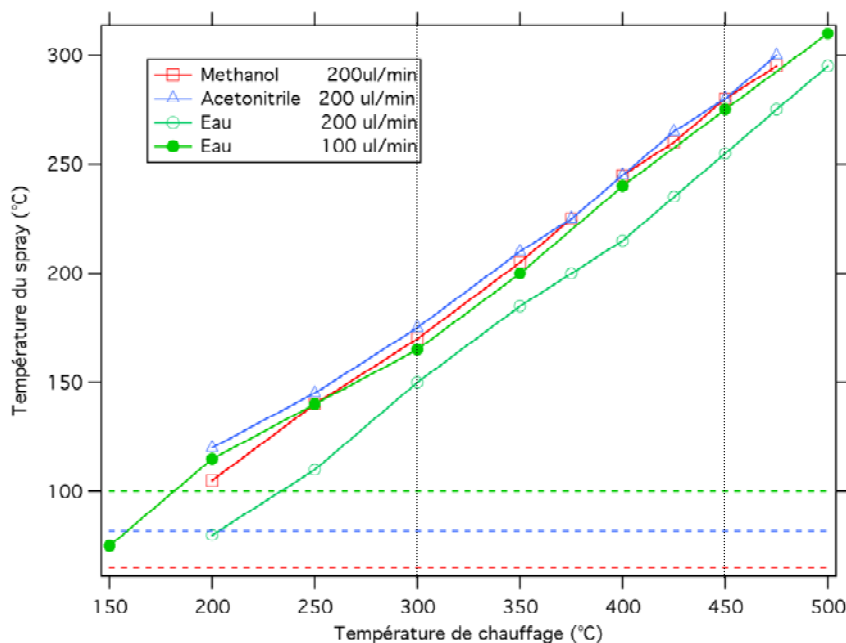
**Tableau 3** : Composition des trois mélanges de sels de benzylpyridinium étudiés avec la lettre *p* correspondant à la position para, *m* pour méta et *o* pour une liaison en ortho.

	CN	tBu	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	F	Cl	NO <sub>2</sub>
<b>Lot 1</b>	<i>p</i>	<i>p</i>		<i>p</i>	<i>o</i>		
<b>Lot 2</b>			<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>		<i>p</i>
<b>Lot 3</b>			<i>o</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	

Les échantillons ont été préparés dans le méthanol puis analysés en *thermospray* par le biais de la source à pression atmosphérique avec la lampe UV éteinte. Nous avons veillé à ce qu'aucun signal ne soit saturé en rinçant entre chaque acquisition à 700 µL/min avec le solvant d'étude pendant 5 minutes.

#### 1.4.1 Relation entre la température de chauffage et la température de spray

Nous avons voulu corréler la température de chauffage du bloc source à la température réelle du spray formé. Pour ce faire, un thermocouple a été installé à la place de la lampe UV de façon à mesurer la température du spray dans la région d'ionisation. Cette étude a été effectuée avec plusieurs systèmes de solvants et à différents débits. La **figure 3** présente les résultats obtenus pour trois solvants testés : l'eau, le méthanol et l'acétonitrile.



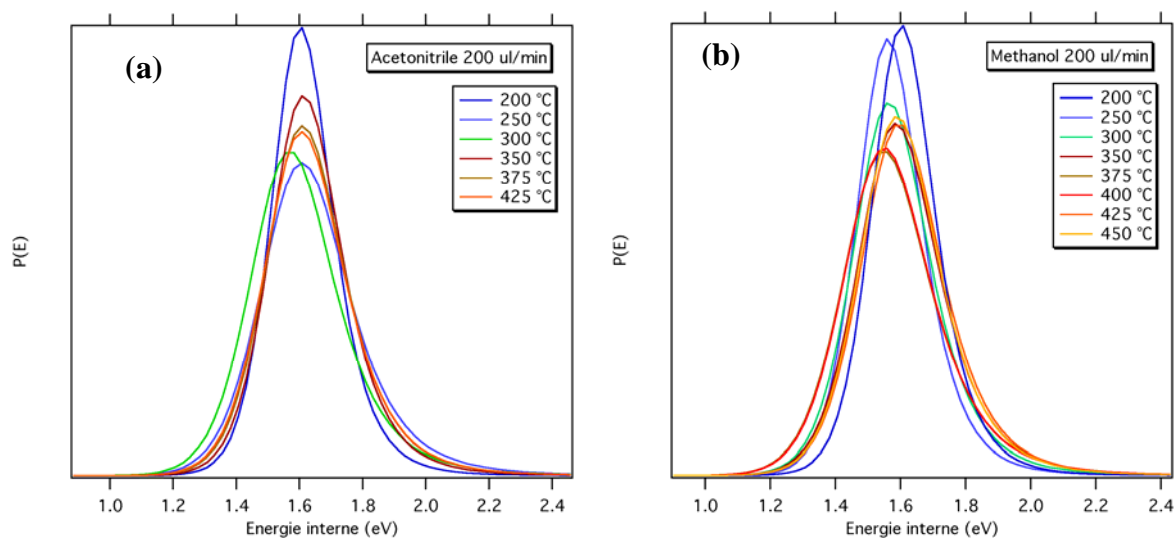
**Figure 3** : Graphe présentant la température du spray en fonction de la température de chauffage pour différents systèmes de solvants avec  $T_{eb}(\text{H}_2\text{O}) = 100^\circ\text{C}$ ,  $T_{eb}(\text{AcN}) = 82^\circ\text{C}$  et  $T_{eb}(\text{MeOH}) = 65^\circ\text{C}$

En général, la température de travail est comprise entre 300 et 450 °C (cf. **figure 3**). D'après ces courbes, on remarque que la température du spray varie linéairement avec la température de chauffage. Dans la zone habituelle de travail (représentée par les 2 droites verticales), les températures de spray sont comprises entre 150 et 275 °C environ. On note que ces températures sont supérieures aux températures d'ébullitions des solvants en question (*rappel* :  $T_{eb}$  (H<sub>2</sub>O) 100°C,  $T_{eb}$  (AcN) = 82°C et  $T_{eb}$  (MeOH) = 65 °C). En définitive, le chauffage de la source n'induit pas d'effet sur la distribution en énergie interne des ions indiquant qu'il n'y a pas de dégradation thermique de l'échantillon au sein de la source Photospray™.

#### 1.4.2 Influence de la température dans deux systèmes de solvants

Tout d'abord, on mesure la distribution d'énergie interne des ions dans l'acétonitrile en fonction de la température de chauffage. D'après la **figure 4a**, la valeur d'énergie interne est centrée sur 1,6 eV. On observe une variation extrêmement faible de l'énergie interne avec la température de chauffage entre 200 °C et 425 °C, soit pour l'acétonitrile à 200 µL.min<sup>-1</sup> une température de spray comprise entre 125 et 275 °C (d'après la **figure 3**).

Ensuite, la même étude réalisée dans le méthanol à 200 µL.min<sup>-1</sup> montre une distribution d'énergie interne similaire, centrée sur 1.6 eV et qui reste insensible à la température (**figure 4b**).



**Figure 4** : Distribution en énergie interne pour différentes températures dans le cas de (a) l'acétonitrile et (b) dans le méthanol

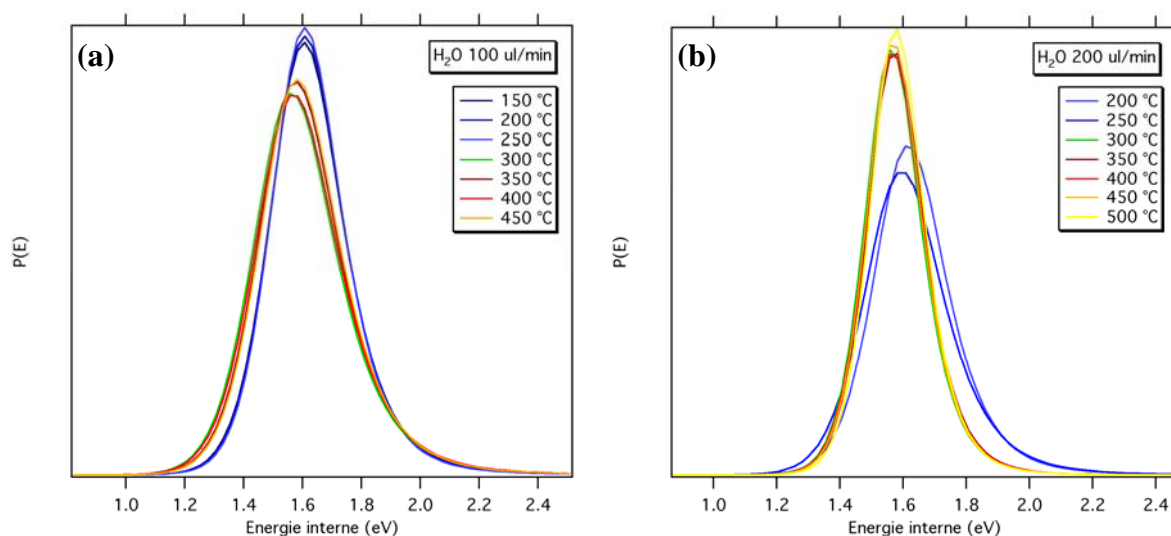
L'absence d'augmentation d'énergie interne avec le chauffage du spray pourrait s'expliquer par une protection du solvant lors de la formation des ions en source. On s'imagine donc que l'échantillon serait solvate par les microgouttelettes du solvant.

#### I.4.3 Influence du débit de solvants : exemple dans l'eau

On mesure la distribution d'énergie interne des ions dans l'eau en fonction de la température de chauffage à deux valeurs de débits de solvant. D'après la **figure 5a**, la valeur d'énergie interne est centrée sur 1,57 eV à 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pour une température supérieure à 300 °C et cette valeur est décalée à 1,63 eV pour des valeurs de températures inférieures à 300 °C. Cette variation d'énergie est très faible et est probablement dans la limite des erreurs de mesures qui sont dans le cas présent difficile à estimer.

Ensuite, la même étude réalisée dans l'eau à 200  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  montre une distribution d'énergie interne inversée, centrée sur 1.6 eV pour des températures supérieures à 300 °C (**figure 5b**). La distribution en énergie interne déposée sur les ions pour des température de chauffage inférieures à 300 °C est centrée cette fois-ci sur 1,65 eV. La différence d'énergie de 50 meV n'est vraisemblablement pas significative d'une augmentation réelle de l'énergie interne des ions.

D'une manière générale, on note que le débit de solvant n'a pas d'effet sur l'énergie interne des ions formés dans la source d'ion.

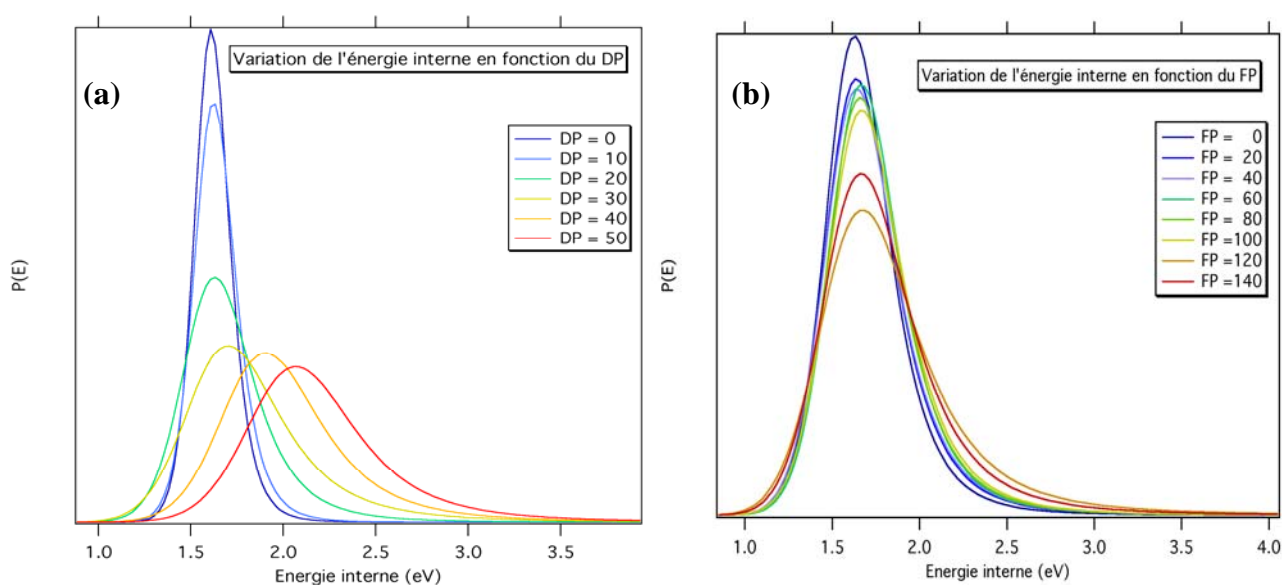


**Figure 5** : Distribution en énergie interne pour différentes températures obtenues dans l'eau  
(a) à 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  et (b) à 200  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

Après avoir validé cette méthode basée sur les thermomètres chimiques, nous l'avons étendu à l'étude de l'influence de la tension de cône et du potentiel d'extraction sur l'énergie interne des ions formés en source.

#### 1.4.4 Influence de la tension de cône

La **figure 5a** présente la variation de distribution en énergie interne en fonction de la tension de cône DP (*Declustering Potential*). La variation de la tension de cône induit un déplacement des distributions d'énergie interne non négligeable. En effet, d'après la **figure 5a**, la distribution d'énergie interne se décale significativement vers la droite quand la tension de cône appliquée augmente. La valeur d'énergie interne varie entre 1,60 et 2,08 eV.



**Figure 5:** Distribution en énergie interne en fonction de (a) la tension de cône (b) de la tension FP (*Focusing Potential*)

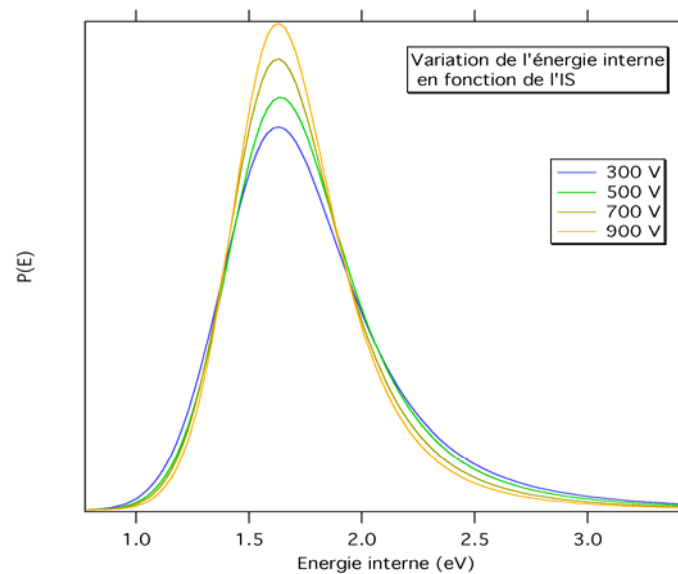
La même étude a été réalisée en fonction d'un autre paramètre du spectromètre de masse : la tension FP appliquée aux ions pour les focaliser (*Focusing Potential*). La figure 5b présente la distribution en énergie interne en fonction de cette tension (entre 0 et 140 V). Contrairement à la tension de cône, on observe que plus la tension appliquée diminue plus les courbes s'affinent. Ces courbes sont toutes centrées sur la même valeur d'énergie qui est d'environ 1,67 eV.

Après avoir étudié l'évolution de l'énergie interne des ions en fonction de la tension de cône (DP) et de la tension de focalisation des ions (FP) appliquées au spectromètre de masse,

on est donc en mesure d'utiliser cette méthode pour caractériser notre source d'ions. Pour ce faire ; nous avons étudié la distribution en énergie interne en fonction d'un autre paramètre : le potentiel d'extraction (IS).

#### *1.4.5 Influence du potentiel d'extraction*

La **figure 6** présente la variation de l'énergie interne des ions en fonction du potentiel d'extraction appliqué à la source d'ions. Ce potentiel est calculé en soustrayant à la valeur de l'IS la tension de la *curtain plate*. Cette dernière est fixe et égale à 1000 V. D'après les courbes obtenues, on remarque que plus l'IS augmente, plus les courbes s'affinent puisqu'elles deviennent plus étroites. En fait, plus le potentiel d'extraction augmente, plus on refroidit les ions. Il se produit donc un phénomène de « *cooling effect* » des ions (refroidissement des ions).



**Figure 6** : Distribution en énergie interne en fonction de la valeur du potentiel d'extraction.

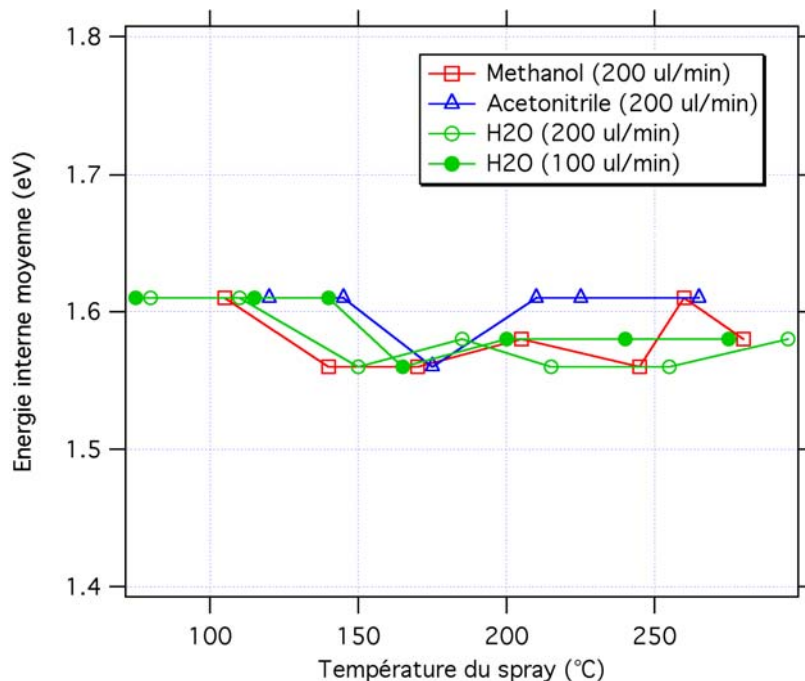
La valeur d'énergie interne moyenne est de 1,64 eV

#### *1.4.6 Conclusions sur les résultats obtenus*

En conclusion, on a pu démontrer que la méthode des thermomètres chimiques pouvait s'appliquer à la caractérisation de la source Photospray™. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence plusieurs phénomènes ayant lieu au sein de la source d'ion utilisée dans ce travail. La **figure 7** résume la distribution en énergie interne moyenne des ions en fonction de



la température du spray dans les trois systèmes de solvants étudiés ici. Ces courbes indiquent que l'énergie interne moyenne est comprise entre 1,55 et 1,6 eV et qu'il n'y a apparemment pas de variation significative en fonction de la température du spray.



**Figure 7** : Energie interne moyenne des ions en fonction de la température du spray dans le méthanol (en rouge) ; l'acétonitrile (en bleu) et l'eau (en vert)

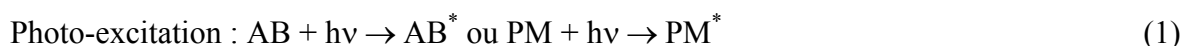
Par ailleurs, des variations très faibles d'énergie interne des sels de benzylpyridinium ont été mises en évidence en fonction du potentiel d'extraction, de la température du spray ou encore du débit de solvant. Ces données ont permis de dégager plusieurs conclusions, parfois inattendues, permettant une meilleure compréhension des phénomènes ayant lieu au sein de la source d'ion :

- Pas de dégradation thermique de l'échantillon : protection par le solvant
- Solvatation de l'échantillon par les microgouttelettes du solvant
- Refroidissement des ions avec l'augmentation du potentiel d'extraction (“ *cooling effect* ”)

## II. PROPRIETES ET MECANISMES DE LA PHOTOIONISATION

### II.1 Principe de base

L'eau ne peut pas être utilisée en détection par photoionisation parce que son seuil énergétique est proche des potentiels d'ionisation de la plupart des composés. A cause de ces limites, la photoionisation en phase gazeuse apparaît être plus attractive bien que l'étape de photoionisation doit être précédée par la vaporisation du solvant utilisée en LC. En effet, en phase vapeur, trois étapes sont responsables de la détection par photoionisation : la vaporisation de l'éluant, la production de photoions par interaction entre les photons émis par la source UV et les analytes, et la détection. Un grand nombre de réactions peut être impliqué dans le processus de photoionisation. Certaines d'entre elles produisent les ions attendus alors que d'autres produisent des espèces non souhaitées comme indiqué ci-après :



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

Suite au phénomène de photoexcitation, plusieurs processus peuvent être observés. De tels processus sont décrits ici pour la molécule d'analyte notée AB, les mêmes réactions pouvant aussi avoir lieu avec la phase mobile PM.



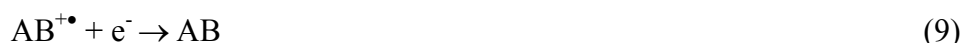
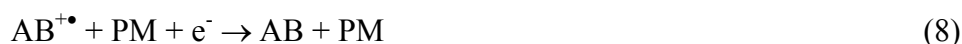
où « gaz » correspond aux molécules de gaz présentes dans la source, qui dans le cas d'une source d'ion APPI peut être de l'air (l'ionisation a lieu à pression atmosphérique) ou de l'azote N<sub>2</sub>.

Lorsque l'énergie des photons hv est supérieure à l'énergie d'ionisation (EI) d'un des composés, on observe une ionisation selon l'équation suivante:

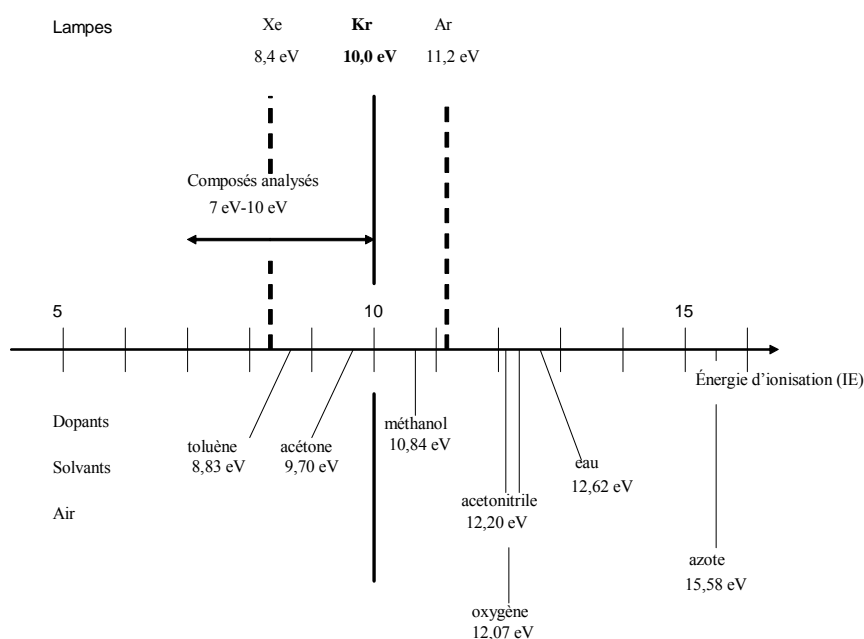


En fait l'absorption d'un photon dont l'énergie est supérieure au seuil d'ionisation peut conduire à l'ionisation ou à la formation d'une espèce neutre excitée. Cette dernière peut alors se relaxer comme on vient de le voir, elle peut aussi s'autoioniser. Les deux processus sont compétitifs. La probabilité de former une espèce neutre décroît avec l'énergie des photons.

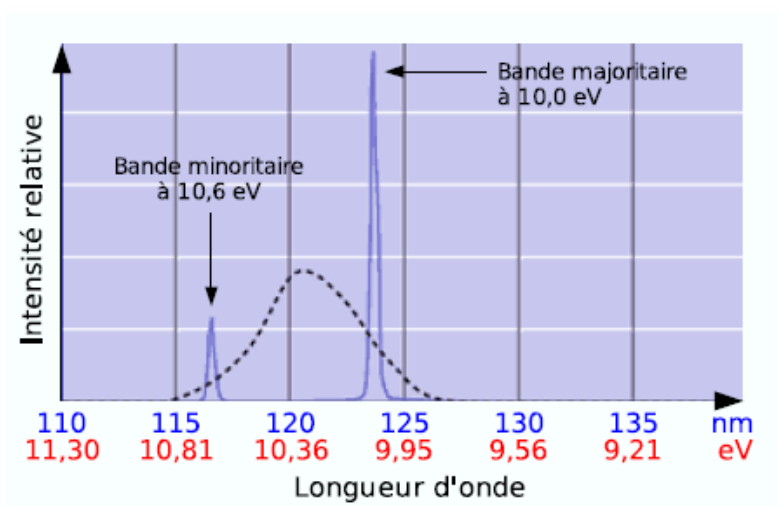
Après cette étape de formation des ions, plusieurs processus peuvent avoir lieu :



En choisissant une source UV dont l'énergie des photons émis est supérieure à l'énergie d'ionisation des analytes et inférieure à celle des constituants de l'air et des solvants utilisés, il est possible de produire sélectivement des ions de l'analyte sans ioniser le solvant, et donc réduire considérablement le bruit de fond. Comme le suggèrent les données présentées sur la **figure 8**, la lampe qui semble la mieux adaptée est une lampe à décharge dans le Krypton qui fournit des photons de 10,0 eV et 10,6 eV (**Figure 9**). En effet, les solvants les plus courants ont des PI supérieurs à 10 eV, alors que beaucoup de molécules organiques ont des PI inférieurs à 10 eV (**Tableau 4**). Les autres lampes rencontrées sont des lampes à Argon (Ar) ou à Xénon (Xe) qui génèrent des photons de 11,2 et 8,4 eV respectivement.



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



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

**Tableau 4 :** Energies d'ionisation de divers composés organiques, présentés par rapport à l'énergie des photons fournis par les lampes à Ar, Kr et Xe (valeurs obtenues sur le NIST Webbook, <http://webbook.nist.gov>)

Lampes	Composés	EI (eV)
Ar : 11,2 eV	diazote	15,58
	eau	12,62
	acetonitrile	12,20
	dioxygène	12,07
	chloroforme	11,37
	dichlorométhane	11,32
Kr : 10,0 eV	méthanol	10,84
	isopropanol	10,17
	hexane	10,13
Xe : 9,8 eV	heptane	9,93
	hexafluorobenzène	9,90
	isooctane	9,80
	acétone	9,70
	pyridine	9,26
	benzène	9,24
	furane	8,88
	toluène	8,83

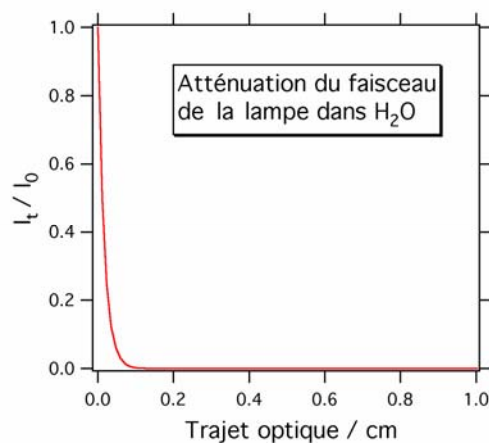
Xe : 8,4 eV	
anisole	8,20
naphtalène	8,14
triéthylamine	7,53

## II.2 Photoionisation « directe »

Le principe de base de la photoionisation à pression atmosphérique est la formation d'un cation radical par absorption d'un photon par une molécule d'analyte suivi de l'éjection d'un électron (6). Cette ionisation ne peut avoir lieu que si et seulement si l'énergie des photons ( $h\nu$ ) est supérieure au potentiel d'ionisation de la molécule.

La photoionisation directe d'une molécule d'analyte est statistiquement peu probable, en partie parce que le solvant peut absorber une partie des photons produits par la lampe. Un calcul de l'absorption UV par un spray à base d' $H_2O$  a été effectué avec la source Photospray<sup>TM</sup> au sein de notre laboratoire. Le calcul a été effectué en tenant compte de la transparence de l'azote pour la lampe UV utilisée ici (10 et 10,6 eV) et de la valeur de la section efficace de l'eau estimée à 10 eV (soit 15 Mbarn) selon Mota *et al.* [Mota, 2005].

Et d'après ce calcul (**Figure 10**), on s'aperçoit immédiatement que la probabilité d'absorption d'un photon par l'analyte est très faible (loi de Beer Lambert).



**Figure 10** : Calcul de l'absorption UV par un spray à base d' $H_2O$

Ce graphe représente le pourcentage de transmission du faisceau de photons UV en fonction du trajet optique. On voit bien qu'à 1 mm, la quasi-totalité du faisceau lumineux a été

absorbée par le solvant. Ceci explique pourquoi l'absorption par l'analyte est peu probable vu la petite quantité d'analyte par rapport au solvant.

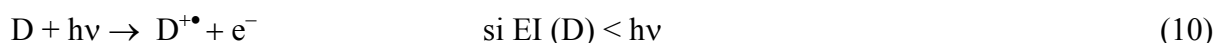
Alors que la photoionisation sans dopant est peu efficace avec la source Photospray™, le groupe de Syage a montré que la géométrie de la source Photomate™ se prêtait mieux à la photoionisation directe [Syage, 2001a et Syage, 2001b].

Il est possible d'augmenter sensiblement le rendement d'ionisation de l'analyte, dans la source Photospray™, en augmentant le nombre de molécules potentiellement ionisables dans l'éluant LC. Ceci est réalisable en ajoutant un composé ionisable à l'éluant LC liquide, ou aux vapeurs créés à partir de cet éluant.

### II.3 Photoionisation « assistée »

Comme cela a été démontré lorsque des sources à photoionisation ont été couplées à des spectromètres de mobilité ionique, un composé judicieusement choisi en quantité relativement importante par rapport à l'analyte peut augmenter significativement le nombre d'ions d'analyte produits [Doering, 2001 et Spangler, 1991]. Ce type de substance est appelée « dopant » et doit être choisie de telle manière que son énergie d'ionisation soit inférieure à l'énergie des photons émis par la lampe UV, et que ses photoions aient une grande énergie de recombinaison et/ou une faible affinité protonique, ce qui permettra ensuite l'ionisation des molécules d'analyte par transfert de charge ou de proton.

L'ionisation du dopant (D) est représentée par l'équation suivante :

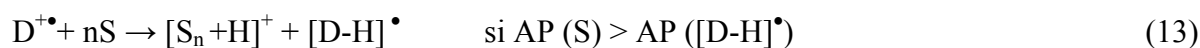


On génère des photoions du dopant qui vont, par la suite, permettre un transfert de charge ou de proton. Et l'analyte est ensuite ionisé selon les processus suivants :



avec AP correspondant à l'affinité protonique et EI est l'énergie d'ionisation

La formation possible de l'espèce  $[AB+H]^{+}$  peut avoir lieu soit directement par le dopant (comme on vient de le montrer) soit par l'intermédiaire du solvant(s) ou d'un (ou plusieurs) cluster(s) de solvant protoné, comme le montrent les réactions suivantes :



Les dopants les plus couramment rencontrés sont le toluène et l'acétone avec une énergie d'ionisation respective de 8,83 et 9,7 eV. Si la lampe utilisée est une lampe à xénon ( $h\nu = 8,20$  eV), l'anisole peut aussi être utilisé [Kauppila, 2004a]. Dans certains cas (notamment lorsqu'on réalise une séparation chromatographique sur phase normale), le solvant utilisé va lui-même avoir une énergie d'ionisation inférieure à l'énergie des photons ; l'exemple le plus courant est l'heptane. Dans ce cas, ce solvant va jouer le rôle de dopant (on parle de *self-doping effect*).

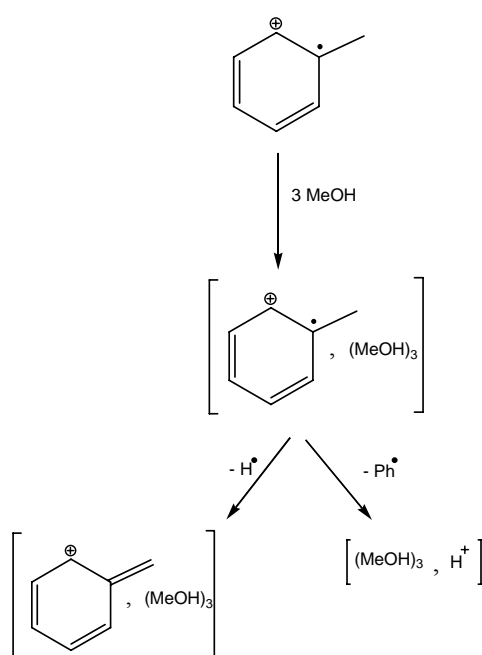
### II.3.1 Transfert de proton

L'équation 12 n'est qu'une représentation simplifiée du mécanisme réellement mis en jeu. Le transfert de proton entre l'ion moléculaire du dopant et le solvant ne peut se faire que si la différence des affinités protoniques est favorable (**Tableau 5**).

**Tableau 5** : Affinités protoniques des différents dopants, de leurs espèces  $[D-H]^{\bullet}$  et de quelques solvants. Valeurs obtenues sur le *NIST Webbook* (<http://webbook.nist.gov>) excepté pour l'AP du radical méthoxyphényl qui a été trouvée d'après [Kauppila, 2004a].

Composés	Affinité Protonique (kJ/mol)	Affinité Protonique (eV)
radical méthoxyphényl	~ 880	9,14
anisole	839.6	8,72
radical benzyl	831.4	8,63
toluène	784.0	8,14
radical 2-oxo propyl	820.0	8,51
acétone	812.0	8,43
isopropanol	793.0	8,23
tétrahydrofurane	822.1	8,53
acétonitrile	779.2	8,09
méthanol	754.3	7,83
eau	691.0	7,17

La formation de clusters de solvant, ayant des affinités protoniques différentes de celle de la molécule de solvant seule [Meot-Ner, 1986 et Grimsrud, 1973] peut parfois permettre ce transfert (équation 14). Bruins *et al.* ont étudié les réactions entre les photoions du toluène ( $C_7H_8^{+\bullet}$ ) et le méthanol ou l'acétonitrile [Koster, 2001]. Ils ont montré que le méthanol pouvait interagir avec l'ion moléculaire du toluène pour former un cluster contenant trois molécules de méthanol. Ce cluster peut alors perdre un atome d'hydrogène ou un radical benzyle  $C_7H_7^\bullet$  (voir **figure 11**). Cette dernière perte aboutit à un cluster de méthanol protoné qui peut à son tour protoner l'analyte. Dans le cas de l'acétonitrile, le mécanisme est globalement le même mais le cluster ne contient que deux molécules d'acétonitrile.



**Figure 11** : Mécanisme de formation de clusters de méthanol protonés à partir de méthanol et de photoions du toluène selon [Koster, 2001]

La formation de monomère, dimère ou trimère de méthanol dépend de la température du nébuliseur. L'abondance relative du monomère augmente alors que celle des dimères et trimères diminue lorsque la température passe de 200 à 500 °C. La température est donc aussi un paramètre qui affecte le processus d'ionisation [Kauppila, 2002].



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



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

Syage a mis en place un modèle thermodynamique simple permettant d'estimer l'enthalpie de réaction de ce transfert d'hydrogène  $\Delta H$  (réaction 15). Cette réaction peut être exprimée par le cycle thermochimique ci-après :



L'enthalpie de cette réaction peut donc être exprimée comme suit :

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

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

Bien que thermodynamiquement défavorisée, cette réaction est possible grâce à un déplacement cinétique dû à l'excès de solvant présent dans la source d'ion. Cependant, ce modèle est sommaire puisqu'il n'explique ni l'importance de l'affinité protonique comparée à l'enthalpie de réaction sur le rendement de formation de l'espèce protonée  $[M+H]^+$  ni l'efficacité de formation de cette espèce en présence d'eau. En effet, l'eau possède une énergie de dissociation  $D_H$  très élevée [ $D_H$  (H<sub>2</sub>O) = 5,16 eV] indiquant l'importance de la cinétique pour la réaction d'arrachement d'hydrogène.

Des résultats surprenants ont été obtenus avec l'acétonitrile, par le groupe de Traldi, permettant d'expliquer la formation d'espèces protonées  $[M+H]^+$  de l'analyte bien que l'EI de l'acétonitrile soit supérieure à 10 eV (**Tableau 4**). En effet, l'irradiation de l'acétonitrile par les photons UV va induire une excitation des molécules (eq 1) qui peut aboutir à des isomérisations [Marotta, 2003a]. Certains produits d'isomérisation pourraient alors être photoionisés, leur PI étant inférieur à 10 eV. Des réactions avec des molécules neutres d'acétonitrile pourraient alors permettre la formation d'agents protonants. Ces résultats ont été confirmés par des calculs semi-empiriques [Marotta, 2003b].

Ce groupe a aussi étudié le mécanisme de photoionisation avec l'acétonitrile, le toluène et le benzène. Leurs résultats ont permis de montrer que les radicaux initialement formés ( $C_7H_8^{+}$  dans le cas du toluène) peuvent réagir avec du dioxygène pour créer des radicaux cations contenant des fonctions phénol, ces espèces pouvant réagir de nouveau avec des molécules neutres de dopant [Tubaro, 2003]. Plusieurs espèces pourraient jouer le rôle d'agents protonants. Dans la suite de ce travail, nous allons montrer que ces réactions avec l'oxygène sont probablement fortement minoritaires.

### *II.3.2 Transfert de charge*

Si on choisit le dopant de telle façon que ses photoions aient une grande énergie de recombinaison, ou une faible affinité protonique, alors les photoions vont réagir par transfert de charge avec les autres molécules présentes dans la zone d'ionisation. Comme cette zone est à pression atmosphérique, le nombre élevé de collision va permettre un transfert de la charge du photoion vers l'analyte (si toutefois la réaction est thermodynamiquement favorisée) (équation 11). En général, le toluène et le benzène réagissent par des réactions de transfert de charge [Bos, 2006].

## II.4 Photoionisation en mode négatif : implication des photoélectrons

Heureusement, la photoionisation à pression atmosphérique n'est pas limitée au simple mode positif. En effet, le mode négatif a aussi été étudié de manière exhaustive principalement par les groupes de Bruins, Kostianen et notre groupe. L'ensemble des réactions observées en mode négatif est présenté dans le **Tableau 6**. Le processus d'ionisation en mode négatif est initié par les électrons de faible énergie libérés lors de la photoionisation

du dopant comme indiquée par l'équation 1 du tableau 5. Ensuite, les électrons de faible énergie peuvent être capturés par des espèces telles que des molécules d'analyte, de solvants ou de gaz c'est-à-dire des composés possédant des affinités électroniques (AE) positives. Des réactions avec des molécules de solvants ou d'oxygène (équations 2 et 3) peuvent avoir lieu soit (i) par transfert de proton (équations 4, 5 et 6) soit (ii) par transfert de charge (équation 8) ou (iii) via une capture d'électrons (équation 7) et des réactions de substitution (équation 9) [Kauppila, 2004b].

**Tableau 6** : Réactions observées en photoionisation à pression atmosphérique en mode d'ionisation négatif d'après [Kauppila, 2004b]

$D + h\nu$	$\rightarrow D^{\bullet+} + e^-$		(1)
$S + e^-$	$\rightarrow S^{\bullet-}$		(2)
$O_2 + e^-$	$\rightarrow O_2^{\bullet-}$		(3)
$M + O_2^{\bullet-}$	$\rightarrow [M-H]^- + HO_2^{\bullet}$	if $\Delta_{acid}G (M) < \Delta_{acid}G (HO_2^{\bullet})$	(4)
$S + O_2^{\bullet-}$	$\rightarrow [S-H]^- + HO_2^{\bullet}$	if $\Delta_{acid}G (S) < \Delta_{acid}G (HO_2^{\bullet})$	(5)
$M + [S-H]^-$	$\rightarrow [M-H]^- + S$	if $\Delta_{acid}G (M) < \Delta_{acid}G (S)$	(6)
$M + e^-$	$\rightarrow M^{\bullet-}$	if $AE (M) > 0 \text{ eV}$	(7)
$M + O_2^{\bullet-}$	$\rightarrow M^{\bullet-} + O_2$	if $AE (M) > AE (O_2) = 0.451 \text{ eV}$	(8)
$M + O_2^{\bullet-}$	$\rightarrow [M-X+O]^- + OX^{\bullet}$ , X = H, Cl, NO <sub>2</sub>		(9)

D, S et M correspondent respectivement au dopant, solvant et à l'analyte ;  $\Delta_{acid}G$  et AE représentent respectivement l'acidité en phase gazeuse et l'affinité électronique des espèces considérées.

L'oxygène, qui possède une affinité électronique (AE) positive, peut ainsi capturer des électrons pour former un ion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ . La valeur de la basicité en phase gazeuse (GB) de ce dernier est relativement élevée ( $GB (HO_2^{\bullet}) = 1451 \text{ kJ/mol}$ ) permettant ainsi une facile déprotonation des molécules de solvants et d'analytes. En règle générale, les composés ayant une forte acidité en phase gazeuse sont, dans la plupart des cas, ionisés par transfert de proton (équations 4, 5 et 6). Alors que les composés ayant des affinités électroniques positives

forment plutôt des espèces  $M^\bullet$  ou des produits de substitution (équations 7, 8 et 9). La formation de ces derniers n'implique pas forcément la substitution de H, Cl ou  $\text{NO}_2$ , comme indiqué par l'équation 9 du tableau 4, mais aussi avec d'autres halogènes tels que Br.

D'une part, les espèces  $[M-H]^-$  sont formées par déprotonation par une espèce de plus forte affinité protonique présente dans le milieu. Ces espèces peuvent venir du solvant, ou être formées dans la source comme par exemple l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Là encore, la présence de solvants halogénés empêche l'ionisation. Récemment, Song *et al.* [Song, 2007b] ont montré la possibilité d'un mécanisme impliquant un transfert d'électron suivi d'un transfert d'atome d'hydrogène comme indiqué ci-après. Un tel transfert d'électron (SET) est connu mais pas commun en solution [Wilson, 1993].



Ils ont montré qu'il existe quatre mécanismes d'ionisation en mode négatif : la capture d'électron, la capture d'électron dissociative, le transfert de proton et l'attachement d'anions [Song, 2007b]. Ces mécanismes peuvent parfois être compétitifs, ce qui conduit à la formation de multiples produits d'ionisation pour une même molécule. Par ailleurs, leurs résultats ont permis de mettre en évidence que l'introduction d'anions dans la source, autres que l'anion superoxyde, tels que l'anion  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2^-$  (via l'addition de peroxyde de di-*tert*-butyl dans le solvant et/ou le dopant), augmente le processus de déprotonation en photoionisation en mode négatif.

Avec ces quatre mécanismes d'ionisation, il est évident que la photoionisation en mode négatif est capable d'ioniser une plus large gamme de composés qu'en ionisation chimique négative (NICI), ionisation chimique négative à pression atmosphérique (négative APCI) ou en *electrospray* négatif [Song, 2007b].

D'autre part, les espèces radicalaires  $M^\bullet$  sont formées principalement par capture d'électron, ou par échange de charge avec l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  formé en source. En présence de solvants halogénés (chloroforme, par exemple), l'ionisation ne se fait pas, sans doute en raison de la capture préférentielle des électrons par le chloroforme et l'inhibition de la formation de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ; le chloroforme ayant une affinité électronique supérieure à celle du dioxygène.

De récents travaux ont démontré que l'APPI en mode négatif est une méthode d'ionisation sensible pour la détection de composés possédant des AE positives et une faible polarité c'est-à-dire des électrophores naturels tels que les fullerènes et les composés perfluorés [Song, 2007a]. Contrairement à l'ionisation chimique négative, la première génération de produits issus de la capture électronique, c'est-à-dire les ions  $M^{\bullet-}$ , sont capables de se décomposer à pression atmosphérique et ensuite donner lieu à des réactions telles que la formation d'adduits.

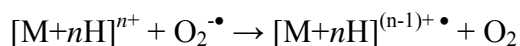
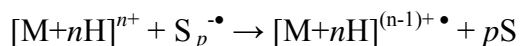
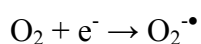
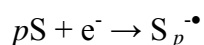
Le groupe de Traldi s'est aussi intéressé à ce sujet avec une source Photomate™ sans utiliser de dopant [Basso, 2003]. Ils ont expliqué la formation des ions négatifs par trois mécanismes différents :

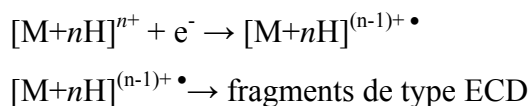
- (i) attachement électronique avec formation d'un anion stable:  $AB + e^- \rightarrow AB^{\bullet-}$
- (ii) attachement électronique dissociatif :  $AB + e^- \rightarrow A^- + B^{\bullet}$
- (iii) production de paires d'ions :  $AB + e^- \rightarrow A^+ + B^- + e^-$

Traldi aboutit aux mêmes conclusions, à ceci près qu'il montre que les électrons utilisés pour la formation de  $M^{\bullet-}$  seraient en fait les photoélectrons émis par la surface métallique située en face de la lampe sous l'effet des photons UV (**Figure 2**). Ce qui est une particularité de la source Syagen™.

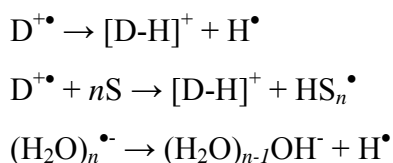
#### *II.4.1 Recombinaisons dissociatives et mécanismes apparentés*

Debois *et al.* ont étudié les fragmentations de peptides observées sous photoionisation en mode positif [Debois, 2006]. Ils ont montré que celles-ci proviennent de réactions entre le peptide protoné et les photoélectrons, libérés lors de la photoionisation du dopant, selon un mécanisme de type capture/transfert d'électron dissociatif (ECD/ETD). Le mécanisme suggéré pour la formation des ions  $c$  et  $z$  observés en APPI est expliqué selon les auteurs comme suit :

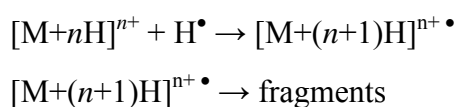




Par ailleurs, ils ont aussi mis en évidence la présence de réactions de transfert d'atomes d'hydrogène dans le mécanisme de fragmentation des peptides. Ces atomes d'hydrogène proviennent probablement des ions du dopant ou de molécules de solvant chargées négativement. Ils expliquent la libération d'atome d'hydrogène en APPI comme indiqué ci-dessous :



Après le phénomène de capture d'hydrogène, les fragments pourraient être formés comme suit :



Par ces réactions, on observe que les ions fragments observés ont pour origine une espèce multiprotonée et des photoélectrons solvatés ou libres dans le milieu au cours de la photoionisation du dopant. Enfin, notons que les ions majoritaires obtenus sont de type c et b/y et que très peu d'ions a sont observés. Ce résultat diffère de ceux reportés dans la littérature en ECD.

Ce travail relate pour la première fois un mécanisme de type ECD/ETD en milieu dense et à pression atmosphérique.

## II.5 Effet de la nature du solvant et du dopant

Comme nous venons de le voir, les mécanismes d'ionisation en APPI peuvent être liés à divers facteurs. Le rôle du dopant, qui subit une photoionisation par les photons UV et induit la formation d'électrons et d'atomes d'hydrogène  $H^\bullet$ , est primordial. Afin de mieux

comprendre l'origine de ces processus, et essayer de les contrôler par la suite, l'influence du dopant et du solvant sur les mécanismes observés en APPI ont été étudiés. En effet, le choix du solvant et du dopant affecte énormément l'efficacité d'ionisation [Hanold, 2004]. Par ailleurs, le solvant utilisé en APPI doit être choisi soigneusement puisqu'il peut profondément affecter les limites de détection des composés étudiés [Raffaelli, 2003].

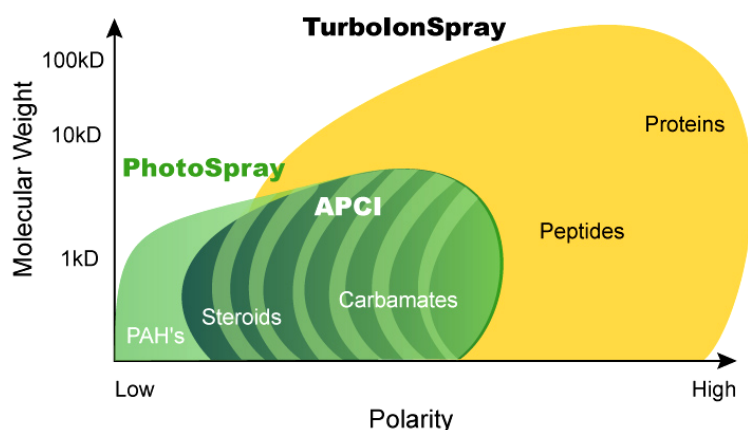
Le toluène a été largement utilisé comme dopant, notamment avec la source Photospray™ mais il ne convient pas pour l'ionisation de composés possédant de faibles affinités protoniques et de faibles énergies d'ionisation. Dans la plupart du temps, le cation radical du toluène réagit par transfert de proton avec des molécules de solvant possédant des AP élevées, ce qui est le cas des solvants de phase inverse tels que l'acétonitrile ou encore le méthanol [Kauppila, 2002].

Bruins *et al.* ont introduit l'utilisation de l'anisole comme un meilleur choix pour la photoionisation de composés possédant de faibles EI et AP [Kauppila, 2004a]. En employant l'anisole comme dopant, la formation de l'ion moléculaire  $D^{+\bullet}$  est possible même en présence de solvants utilisés en chromatographie de phase inverse, ce qui n'est pas le cas avec le toluène. Ainsi, les molécules possédant une énergie d'ionisation basse et une faible affinité protonique peuvent être ionisées efficacement par transfert de charge avec le cation radical de l'anisole. A l'opposé, l'acétone agit comme un dopant seulement pour des molécules ayant des AP élevées.

Les spectres APPI en mode d'ionisation négatif dépendent énormément de la composition en solvants. En effet, les solvants possédant des acidités en phase gazeuse élevées ainsi que ceux possédant des affinités électroniques (AE) positives vont avoir tendance à détériorer l'efficacité d'ionisation des analytes. Cela s'explique par la formation d'anions de faible AP tels que  $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  et  $\text{CF}_3\text{COO}^-$  empêchant la déprotonation des analytes. Ces espèces capturent les électrons et forment ces espèces déprotonées qui sont stables. Ce sont donc des « poisons » à électrons. Ils peuvent aussi protoner et neutraliser l'ion superoxyde (équation 5 du **tableau 6**), qui ne pourra alors pas réagir par transfert de charge avec les analytes possédant des AE élevées (équation 8 du **tableau 6**). Comme l'anion superoxyde ne pourra être formé, les transferts de charge et de proton (équation 4 du **tableau 6**) sont donc inhibés induisant une perte de sensibilité.

### III CHAMP D'APPLICATION DE L'APPI

Les sources de photoionisation à pression atmosphérique ont été conçues à l'origine pour l'ionisation de petits composés peu polaires, ce qui est illustré par la **figure 12** issue de la documentation Agilent. Applied Biosystems commercialise sa source Photospray™ pour le même type d'applications.



**Figure 12** : Champ d'application initial de la photoionisation à pression atmosphérique d'après Applied Biosystem / Sciex

Ce schéma laisse supposer que la source n'est pas adaptée pour l'analyse de composés très polaires et/ou pour les composés de masse moléculaire importante.

*Or, nous allons démontrer tout au long de ce travail que ce n'est pas le cas. En effet, cette méthode d'ionisation s'est montrée particulièrement adaptée à l'analyse de composés plus polaires et de plus haut poids moléculaire.*

#### III.1 Analyses de composés pharmaceutiques

##### III.1.1 Les stéroïdes

Dans le domaine des analyses pharmaceutiques et cliniques, la majorité des applications publiées sont focalisées sur la détermination de stéroïdes dans des matrices biologiques complexes.

Des analyses en LC/APPI-MS ont permis de déterminer la présence simultanée de neuf stéroïdes dans des échantillons de sérum avec une limite de détection suffisante pour des



études cliniques et une sélectivité qui ne pouvait pas être obtenue avec une technique d'immunoessai [Guo, 2004]. C'est pour cette dernière raison que Kushnir *et al.* ont développé une méthode LC/APPI-MS pour la détermination du cortisol et de la cortisone dans le sérum et le plasma [Kushnir, 2004]. Outre sa sélectivité importante comparée aux méthodes basées sur l'immunoessai, la photoionisation à pression atmosphérique est une technique qui offre de meilleures limites de détection et une manipulation de l'échantillon plus simple que l'ESI ou l'APCI. Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres corticostéroïdes [Greig, 2003]. En fait, l'APPI exige moins de chaleur pour la désolvatation donnant lieu ainsi à moins de dégradation thermique des molécules et une meilleure sensibilité de détection qu'en APCI (rapport S/N plus élevé que l'APCI) [Greig, 2003]. Les résultats obtenus en LC/APPI-MS/MS pour l'analyse de phytostérols libres et estérifiés se sont révélés plus pertinents qu'en GC/MS. En effet, on observe une diminution de la limite de détection (~ 150 fois) et une réduction du temps d'analyse puisqu'on passe de 3 heures en GC-MS à 15 minutes en APPI [Lembcke, 2005].

### III.1.2 Métabolites

Le groupe de Syage a étudié récemment cinq composés pharmaceutiques par une analyse chirale en LC/APPI-MS comparée à une étude en APCI [Cai, 2007a]. Ils ont mis en évidence que l'APPI était une méthode sensible, notamment à des faibles valeurs de débit de phase mobile. L'APPI est donc plus adaptée à l'analyse quantitative de traces. Elle apparaît être aussi plus spécifique et offre moins d'effet de suppression de signal en comparaison avec l'APCI tout en produisant des signaux plus reproductibles. Par ailleurs, en photoionisation, on ne se confronte pas au problème d'une éventuelle explosion relative à l'aiguille corona ou à une tension élevée en ESI notamment lorsque des solvants inflammables sont utilisés (ex : hexane). Enfin, un dépôt de carbone est susceptible de se former à l'extrémité de l'aiguille corona, ce qui provoquerait une instabilité du signal, réduisant ainsi la sensibilité de la technique APCI [Cai, 2007a].

L'oméprazole, puissant inhibiteur de la sécrétion d'acide gastrique, est une substance test pour le phénotypage des activités enzymatiques du cytochrome CYP3A4 et CYP2C19. C'est pourquoi, il est nécessaire de le quantifier ainsi que deux de ses métabolites dans le plasma humain : le 5-hydroxyoméprazole et l'oméprazole sulfone [Martens-Lobenhoffer, 2007]. Le travail de Martens-Lobenhoffer *et al.* présente pour la première fois une méthode permettant d'effectuer une quantification énantiosélective simultanée de l'oméprazole et de

ses métabolites dans le sérum humain. La préparation de l'échantillon se fait par extraction en phase solide, ce qui permet d'obtenir un excellent recouvrement et des échantillons purs. En ce qui concerne l'analyse chromatographique, elle permet d'obtenir des pics intenses et symétriques et de séparer les énantiomères avec une bonne résolution. Quand à l'ionisation par photoionisation à pression atmosphérique, elle permet un couplage efficace avec la chromatographie liquide en phase normale et une détection par spectrométrie de masse tandem sélective et sensible.

### III.2 Analyse environnementale et polluants

La photoionisation à pression atmosphérique a été appliquée à l'étude de composés d'intérêt environnemental, tels que les pesticides, les composés organiques dans l'air, les contaminants dans l'eau, les explosifs...

Une méthode basée sur l'HPLC-MS pour l'analyse de phénylurées (une classe d'herbicides) et de carbamates (une classe très efficace d'insecticides), présents dans des eaux souterraines et de surface, a été développée par Meng [Meng, 2002]. Dans cette étude, l'auteur compare la sensibilité de l'APPI à celle de l'ESI et de l'APCI et démontre qu'en général, les carbamates donnent une meilleure réponse en ESI qu'en APPI alors que les phénylurées donnent le résultat inverse. Par ailleurs, l'APPI permet de fournir un rapport signal/bruit plus important que dans le cas de l'APCI. La photoionisation se révèle donc être une méthode d'ionisation attractive pour des mesures de masse «en ligne» de composés organiques en phase gazeuse.

L'analyse simultanée de huit mutagènes de type phénylbenzotriazole (PBTA), extraits d'une eau de rivière, a été réalisée par une approche LC/APPI-MS/MS en présence de toluène comme dopant. L'APPI fournit des intensités de signaux supérieures à celles mesurées en ESI. Ainsi, l'analyse de composés à l'état d'ultratrace dans une eau de rivière peut donc être possible en photoionisation à pression atmosphérique [Moriwaki, 2004a]. Le sulfonate de perfluorooctane (PFOS) est un autre contaminant important dans l'eau de rivière. Ce composé peut être déterminé par APPI par une extraction «en ligne» automatisée utilisant la chromatographie en écoulement turbulent (TFC pour *Turbulent Flow Chromatography*). Cette méthode est rapide, sensible et simple permettant d'obtenir une extraction, une séparation et une détection sélective satisfaisante avec une durée d'analyse courte. Ce groupe a démontré que l'APCI n'est pas la méthode adéquate pour la détermination des PFOS alors qu'en ESI, on observe des effets de matrice importants [Takino, 2003a].

Pour des raisons sanitaires, l'utilisation du chloramphénicol (CAP), utilisé dans la production alimentaire, est interdite aussi bien aux Etats Unis qu'en Union Européenne. La détermination du taux de CAP dans le poisson a été réalisée par une analyse LC/APPI-MS et LC/APCI-MS. Les résultats obtenus mettent en évidence une limite de détection similaire pour les deux techniques mais avec un effet de matrice négligeable dans le cas de la photoionisation [Takino, 2003b]. Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser des standards de matrice en APPI et, par ailleurs, toutes les mesures effectuées en APPI montrent un excellent recouvrement et une très bonne répétabilité. Enfin, notons qu'en APPI une contamination de la source n'affecte en aucun cas l'ionisation ; ce qui n'est pas le cas en APCI où on observe une diminution de l'efficacité de l'ionisation.

La photoionisation à pression atmosphérique a aussi été appliquée avec succès à l'analyse de composés hydrocarbonés aromatiques polycycliques (PAHs) grâce à sa capacité à ioniser les molécules non polaires [Moriwaki, 2004b et Straube, 2004]. Les PAHs correspondent à une grande classe de composés chimiques qui sont généralement formés par une combustion incomplète et sont présents dans un grand nombre de matrices environnementales. La plupart des PAHs sont connus pour être cancérigènes, ce qui rend leur analyse importante d'un point de vue sanitaire et environnemental. Ces molécules sont apolaires rendant alors difficile leurs ionisations par les techniques classiques telles que l'ESI ou l'APCI. Récemment, le groupe de Syage [Short, 2007] a étudié l'effet de la phase mobile et la nature de la lampe UV sur la détection des PAHs, démontrant ainsi que ce type de molécules reste encore les composés de choix pour des études en APPI.

### III.3 Analyse de biomolécules

#### *III.3.1 Les peptides*

Une étude sur des peptides hydrophobes a été menée en APPI au sein de notre laboratoire [Delobel, 2003]. La photoionisation à pression atmosphérique s'est révélée être une méthode alternative intéressante pour l'étude de peptides hydrophobes qui sont généralement difficilement ionisables par les autres techniques classiques d'ionisation. En effet, les peptides hydrophobes nécessitent l'utilisation de surfactants et/ou de solvants organiques pour leur extraction. Ces conditions peuvent être incompatibles avec l'ESI. Il est intéressant aussi de souligner la particularité des fragmentations observées avec cette

technique. Quelques fragments inhabituels ont été rapportés, tels que les fragmentations du squelette peptidique de type *c* et *z*. Ce travail a permis de mettre en évidence que les fragmentations du peptide observées proviennent de réactions entre l'espèce protonée du peptide avec les photoélectrons libérés lors de la photoionisation du dopant. Ces réactions ont été expliquées par un mécanisme de type capture d'électron dissociative/transfert d'électron dissociatif (« ECD/ETD type mechanism »). Par ailleurs, il a été montré que les réactions de transfert d'hydrogène sont aussi impliquées dans les fragmentations observées. Cette étude a été confirmée par un autre peptide : le peptide E1-Nter qui a été étudié sous photoionisation par Debois *et al.* [Debois, 2006]. Il s'agit de la première mise en évidence d'un tel mécanisme en milieu dense et à pression atmosphérique.

### III.3.2 Les lipides

Un autre exemple, aussi réalisé dans notre laboratoire, permet de souligner l'importance des fragmentations en source pour l'analyse structurale de lipides complexes. Delobel *et al.* ont caractérisé la structure de quelques phosphatidylcholines par APPI-MS [Delobel, 2005]. Ces résultats ont mis en évidence des chemins réactionnels inhabituels permettant une détermination aisée de la nature et de la position sur le squelette glycérol des chaînes d'acide gras. Ces résultats confirment le fait que le mécanisme d'ionisation en APPI est relativement complexe mettant en jeu des espèces réactives telles que les électrons ou les radicaux libérés dans le milieu. Ces fragmentations intensives observées en source ont permis une caractérisation structurale assez aisée de ce type de biomolécules.

La photoionisation à pression atmosphérique a permis d'augmenter les possibilités d'analyse par spectrométrie de masse des glycosphingolipides [Delobel, 2006]. La combinaison des modes d'ionisation positif et négatif permet l'obtention d'informations sur les espèces présentes et leur structure. La possibilité d'utiliser des solvants organiques tels que le chloroforme a permis le couplage de la spectrométrie de masse à une séparation chromatographique sur phase carbone graphite poreux, ce qui aurait été impossible avec les méthodes d'ionisation classiques. De plus, le chloroforme permet une ionisation d'un nouveau genre, consistant en une anionisation dans la source des composés d'intérêt grâce à des ions chlorure formés *in situ* à partir du chloroforme et des électrons émis lors de la photoionisation du dopant.

De récents travaux sur des acides gras et des standards de lipides ont montré que l'APPI pouvait offrir une très bonne sensibilité en phase normale et en phase inverse non aqueuse

[Cai, 2006a et 2006b]. L'APPI deviendra une technique de choix pour l'analyse de lipides dans le futur.

### *III.3.3 Les acides nucléiques*

Une méthodologie a été développée et validée pour la quantification de la 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) dans de l'ADN commercial et dans de l'ADN isolé d'un foie de rat par photoionisation à pression atmosphérique [Zhang, 2007]. Une nouvelle méthode analytique pour l'analyse quantitative de la 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) et la 2'-déoxyguanosine (dG) a été établie et basée sur la LC/UV/APPI-MS/MS. Cette technique permet d'obtenir une stabilité suffisante ainsi qu'une bonne sensibilité et précision. Comparée aux autres méthodes d'ionisation, l'APPI se révèle être une méthode alternative fiable et plus sensible permettant d'explorer le rapport entre la dégradation oxydative et la présence de 8-OHdG dans les tissus.

*Les résultats obtenus sur les peptides ainsi que sur les composés lipidiques mettent en évidence l'intérêt de la photoionisation à pression atmosphérique comme source d'ions alternative pour l'analyse de biomolécules.*

## III.4 Autres applications

La photoionisation à pression atmosphérique a permis d'augmenter les possibilités d'analyse par spectrométrie de masse dans le domaine pharmaceutique, clinique et environnemental. En outre, cette technique est aussi performante pour la caractérisation de produits naturels, tels que les flavonoïdes ou encore pour l'analyse de composés organométalliques ou encore les fullerènes.

### *III.4.1 Produits naturels : les flavonoïdes*

Les applications de l'APPI répertoriées dans la littérature touchent plusieurs domaines par exemple, l'analyse de flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des produits naturels polyphénoliques qui se retrouvent dans les plantes supérieures et réputés pour avoir de nombreux effets sur la santé. Ils possèdent de bas potentiel d'ionisation et peuvent former, de

ce fait, des ions moléculaires par échange de charge. Par ailleurs, ces composés ont des affinités protoniques et des acidités en phase gazeuse qui leur permettent d'être ionisés par transfert de proton. Rauha *et al.* ont comparé l'ESI, l'APCI et l'APPI pour l'analyse de flavonoïdes [Rauha, 2001]. L'effet du solvant sur les différentes techniques d'ionisation a été étudié et il s'avère que l'APPI est plus sensible à la composition du solvant. Néanmoins, les différences d'efficacité d'ionisation de ces trois techniques ne sont pas significatives bien que l'ESI en mode négatif fournisse les meilleures conditions pour la détection de ce type de composés.

#### *III.4.2 Composés dans les matrices alimentaires*

Gómez-Ariza *et al.* ont effectué d'autres expériences, notamment l'analyse de composés dans des matrices alimentaires par APPI [Gómez-Ariza, 2006a, 2006b et 2006c]. Ils ont développé des méthodes pour la détermination d'antioxydants phénoliques dans le vin (catéchine, quercétine et resveratrol), de composés issus d'huile d'olive ( $\alpha$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérols) et quelques espèces issues d'huiles essentielles d'agrumes telles que les coumarines, psoralènes et les polyméthoxyflavones. Ces composés ont été choisis en particulier car ils ne sont pas ionisables en ESI ni en APCI. Les résultats ont démontré que l'APPI détecte une partie de ces molécules dans des échantillons réels.

La photoionisation à pression atmosphérique a aussi été évaluée pour l'analyse quantitative de sulfonamides dans le miel. Mohamed *et al.* ont mis au point une stratégie par LC-APPI-MS/MS développée pour l'analyse de 18 sulfonamides dans le miel. La photoionisation s'est avérée être très performante et une bonne répétabilité a été obtenue pour ces composés [Mohamed, 2007].

#### *III.4.3 Composés organiques synthétiques*

Les composés organométalliques et de coordination, incluant les catalyseurs métallocènes, composés phosphane, composés métallo-carbonylés et les complexes bi- et tripyridiniques ont été caractérisée par PAESI (*Photoionization Assisted ElectroSpray Ionization*) [Dorcier, 2003]. Dans certains cas, notamment dans le cas des composés chargés positivement et négativement, les courants ioniques et les rapports S/N (sensibilité) sont largement supérieurs à ceux observés en utilisant une source classique ESI.

La photoionisation en mode négatif se révèle comme une méthode d'ionisation sensible pour la détection par spectrométrie de masse de composés possédant des affinités électroniques (AE) positives et une polarité limitée, c'est-à-dire des électrophores naturels tels que les fullerènes et les composés perfluorés [Song, 2007]. La première génération des produits issus de la capture électronique, c'est-à-dire les ions  $M^+$ , sont capables de se fragmenter à pression atmosphérique et ensuite de former des adduits. Ce résultat diffère de ceux obtenus en ionisation chimique négative.

#### *III.4.4 Analyse géologique*

Une classification de huit échantillons d'ambre de différents âges géologiques (du Miocène au Triassique) et origines géographiques a été proposée par le groupe de Traldi [Tonidandel, 2008]. Ils ont comparé différentes techniques telles que l'ionisation par désorption laser (LDI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI) dans le but d'obtenir une empreinte spectrale reliée à l'origine de l'ambre. Des différences et des similitudes ont été détectées avec ces différentes méthodes d'ionisation. Tout d'abord, l'analyse de clusters ou l'analyse par composante principale (PCA) ne met pas en évidence de différenciation claire selon l'âge des échantillons, excepté pour l'APPI où l'on observe de manière satisfaisante la formation de « clusters ». Ensuite, lorsqu'on compare les courants ioniques totaux (TIC) obtenus par ces différentes approches analytiques, sur des quantités équivalentes des différents échantillons d'ambre, en fonction de l'âge on s'aperçoit rapidement que l'unique corrélation significative est obtenue pour l'APPI. Tonidandel *et al.* ont validé cette méthode en étudiant quatre autres échantillons provenant d'une autre période géologique (le Crétacé). Et ils retrouvent aussi les mêmes observations dans ce cas, en l'occurrence que la photoionisation fournit la corrélation la plus significative.

Les analyses par spectrométrie de masse d'extraits ou de solides d'ambre brut, suivies par une évaluation statistique appropriée, peut fournir des informations utiles sur l'âge de l'ambre étudié. Les meilleurs résultats ont été obtenus en APPI, indiquant ainsi que la quantité de molécules solubles et photoionisables diminue avec l'âge de l'ambre. Ce résultat est en accord avec la formation de polymères insolubles et très stables.

### III.4.5 Les polymères

Kéki *et al.* ont reporté une étude détaillée de dérivés polyisobutylène en APPI-MS puisque ces composés sont difficilement ionisables en MALDI et en ESI. Cette technique permet donc l'analyse de polymères possédant une telle polarité [Kéki, 2008].

Les différents dérivés polyisobutylène ont été étudiés en mode d'ionisation positif et négatif sous photoionisation. En mode positif, chacun des trois composés étudiés forme l'espèce protonée  $[M+H]^+$  avec d'abondants fragments. Par ailleurs, ils ont mis en évidence la formation d'une espèce cationisée par le chlore  $[M+Cl]^+$  générée en mode d'ionisation négatif en présence des solvants chlorés ( $CCl_4$ ,  $CHCl_3$  et  $CH_2Cl_2$ ) et de toluène (sous conditions assistées).

De récentes études de chromatographie en phase gazeuse couplées à la micro photoionisation à pression atmosphérique ont été réalisées en mode d'ionisation négatif sur des composés biphényles chlorés (PCB) [Luosujärvi, 2008]. Cette méthode s'est avérée particulièrement efficace pour les composés fortement chlorés ou les PCB non chlorés en position ortho c'est-à-dire les molécules de hautes affinités électroniques. Ce qui fait de la photoionisation une méthode de choix pour l'analyse de composés environnementaux qui sont généralement fortement chlorés ou non-ortho-chloré ou encore mono-ortho-chloré. La  $\mu$ APPI s'est avérée être une méthode d'ionisation beaucoup plus répétable et permet d'obtenir une large gamme de linéarité par rapport la  $\mu$ APCI pour l'analyse de PCB en mode d'ionisation négatif. Cependant, la  $\mu$ APCI est légèrement plus sensible.

Le **tableau 7** ci-après présente les différentes classes de molécules étudiées en APPI depuis 2001 et jusqu'à aujourd'hui.



Tableau 7 : Champ d'application de l'APPI

Pharmaceutiques	Composés dans les matrices alimentaires
cyclodextrine et pharmaceutiques [Short, 2008]	sulfonamide dans le miel [Mohamed, 2007]
substances dopantes [Schappler, 2008]	acrylamide dans le café et le chocolat [Pardo, 2007a]
drogues illicites [Kauppila, 2008]	acide domoïque dans les fruits de mer [Pardo, 2007b]
Oméprazole [Martens-Lobenhoffer, 2007]	mycotoxines dans les matrices alimentaires [Zöllner, 2006]
composés pharmaceutiques basiques [Schappler, 2007]	huile d'olive [Gomez-Ariza, 2006a et 2006c]
composés pharmaceutiques [Himmelsbach, 2007]	anthocyanines dans le vin [Gomez-Ariza, 2006b]
composés pharmaceutiques [Cai, 2007a]	l'ergostérol dans le blé infecté [Varga, 2006]
médicaments [Hommerson, 2007a]	aflatoxines dans le lait de vache [Cavaliere, 2006]
cladribine et clofarabine [Hsieh, 2007]	avermectine et moxidectine dans le lait [Turnipseed, 2005]
venlafaxine [Theron, 2007]	carbammates dans les fruits et légumes [Takino, 2004a]
mélatonine, sérotonine et auxine [Cao, 2006]	aflatoxines dans l'alimentation [Takino, 2004b]
neurotransmetteurs [Kauppila, 2006]	fongicides dans les agrumes [Yoshioka, 2004]
salsolinol et catécholamines [Starkey, 2006]	"cocktail dosed caco-2 smples" [Hakala, 2003]
médicaments [Cai, 2005]	patuline dans le jus de pomme [Takino, 2003a]
composés pharmaceutiques [Chen, 2005]	chloramphénicol dans le poisson [Takino, 2003b]
cyclosporine A dans le plasma de rat [Wang, 2005]	<b>Stéroïdes</b>
lévonorgestrel dans le plasma humain [Theron, 2004]	stéroïdes [Hommerson, 2007b]
ménaquinones et ubiquinones [Geyer, 2004]	testostérone [Streit, 2007]
molécules à visée pharmaceutiques [Hsieh, 2003]	hormones [Yamamoto, 2006]
métabolites dans l'urine de rat [Keski-Hynnily, 2002]	phytostérol [Lembcke, 2005]
naphtalènes [Kauppila, 2002]	lanostérol [Trosken, 2004]
<b>Environnement &amp; Polluants</b>	cortisone [Kushnir, 2004]
PCB [Luosujärvi, 2008]	stéroïdes [Guo, 2004]
composés perfluorés [Song, 2007a]	corticostéroïdes [Greig, 2003]
huile pétrolière [Purcell, 2007c]	stéroïdes [Zavitsanos, 2003]
pétrole [Purcell, 2007a]	idoxifène [Yang, 2002]
HAP cancérigènes [Ding, 2007]	<b>Biomolécules</b>
composés nitroaromatiques [Purcell, 2007b]	sphingolipides [Muñoz-Garcia, 2008]
explosifs [Crescenzi, 2007]	8-hydroxydeoxyguanosine [Zhang, 2007]
benzidine et chloroaniline [Bacaloni, 2007]	lipides triacylglycérol [Cai, 2007b]
composés nitroaromatiques [Song, 2007b]	peptides [Delobel, 2003 et Debois, 2006]
HAP [Short, 2007]	sphingolipides [Munoz-Garcia, 2006]
HAP oxydés [Grosse, 2007]	acide linoléique [Muller, 2006]
HAP [Itoh, 2006]	glycosphingolipides [Roy, 2006]
benzopyrène [Zheng, 2006]	acides gras [Cai, 2006a]
mélange pétrochimiques [Purcell, 2006]	lipides [Cai, 2006b]
retardateurs de flamme bromés [Riu, 2006]	globotriaosylcéramides [Delobel, 2006]
HAP [Borsdorf, 2006]	phosphatidylcholines [Delobel, 2005]
stilbènes dans les feuilles de vigne [Jean-Denis, 2006]	<b>Autres applications</b>
retardateurs de flamme bromés [Debrauwer, 2005]	Ambre [Tonidandel, 2008]
dinitropyrrène et aminonitropyrrène [Straube, 2004]	Sels ammonium bisquaternaires [Giuliani, 2006]
mutagènes dans eau de rivière [Moriwaki, 2004a]	aldéhydes et cétones [van Leeuwen, 2004]
HAP dans les sédiments [Moriwaki, 2004b]	composés organométalliques [Dorcier, 2003]
sulfonates dans l'eau de rivière [Takino, 2003a]	<b>Polymères</b>
urée et pesticides [Meng, 2002]	PIB [Kéki, 2008]
flavonoïdes [Rauha, 2001]	polymères [Banoub, 2007]

## IV RECENTS DEVELOPPEMENTS DE LA SOURCE ET SES DIFFERENTS COUPLAGES

Récemment, de nombreux travaux, réalisés par différents groupes, ont permis de développer, modifier et coupler les sources APPI à différents systèmes de séparation et de spectrométrie de masse. En se basant sur les concepts fondamentaux de l'APPI (décrits plus haut), des idées novatrices ont permis de développer des instruments, des techniques et ainsi d'étendre le domaine d'application de cette technique.

### IV.1 Couplage de l'APPI aux spectromètres de type FTICR

Sachant qu'il n'existait pas de source d'ions à photoionisation permettant un couplage avec des spectromètres de masse de type FTICR (Résonance Cyclotronique Ionique à Transformée de Fourier), ce n'est qu'en 2003 que Greig *et al.* ont construit leur propre interface de photoionisation en montant une lampe UV (Cathodeon PKS100) sur une source d'ions APCI à la place de l'aiguille corona [Greig, 2003].

Récemment, le groupe de Marshall a mis en évidence la formation simultanée d'espèces protonées, déprotonées et radicalaires dans la source d'ion APPI. Le très haut pouvoir résolutif et la précision en masse de la FTICR permettent des attributions précises des compositions élémentaires des composés étudiés [Purcell, 2006 et Purcell, 2007a]. Ce groupe a montré que seule une étude en APPI/FT-ICR est adaptée pour l'analyse de mélange complexe pétrochimiques, contenant naturellement une large proportion de composés aromatiques hydrocarbonés faiblement polaires ou apolaires, et l'analyse de mélanges de fullerènes [Purcell, 2006 et Talyzin, 2006].

Par ailleurs, ce même groupe a comparé l'ESI et l'APPI pour l'analyse de pétroles bruts (choisi puisqu'il représente le mélange organique le plus complexe dans une gamme de masse de 1000 à 10000). L'atome d'azote dans ces espèces peut résider dans un cycle à 5 (pyrrolique) ou à 6 (pyridinique) et peut donc être facilement protoné (pyridinique) ou déprotoné (pyrrolique) en *electrospray* positif et négatif respectivement. Purcell *et al* ont étudié ce genre de composés azotés issus de coupes pétrolières par photoionisation à pression atmosphérique avec un spectromètre à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier de 9,4 Tesla [Purcell, 2007b]. Les résultats obtenus montrent qu'une seule acquisition en photoionisation en mode d'ionisation positif est suffisante pour arriver aux mêmes

informations structurales que la combinaison des deux modes en *electrospray*. Bien que l'efficacité d'ionisation des espèces pyrroliques et pyridiniques dépende de la méthode d'ionisation, l'APPI peut générer des ions positifs de ces deux espèces. Dans ce travail, il a été montré que les fragmentations de ces espèces aromatiques pouvaient être contrôlées voire supprimées en ajustant convenablement les paramètres instrumentaux de la source d'ion APPI.

#### IV.2 Combinaison des sources à photoionisation : émergence des sources « duales »

Dans le but d'étendre la gamme des composés pouvant être simultanément ionisés, différentes sources d'ions peuvent être couplées.

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

D'autres aspects des sources d'ionisation « duales » ont été explorés par le groupe de Syage [Syage, 2004b]. Ils ont couplé une source de photoionisation à pression atmosphérique (APPI) à une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et une source à électronébulisation (ESI). Le but de cette combinaison multiple est d'étendre la gamme de composés qui peuvent être analysés simultanément. Il s'agit donc d'une approche plus complète que dans le cas précédent. Trois modes d'opérations ont été proposés pour cette source: l'utilisation d'une seule source, l'utilisation simultanée de deux systèmes d'ionisation et enfin, un passage rapide entre les deux sources pendant la même acquisition chromatographique. Ces différents modes d'opération peuvent être utilisés aussi bien en mode positif qu'en mode négatif. Bien que cette configuration duale n'affecte que de manière minimale les performances de chaque mode relativement aux sources d'ionisation standards, le couplage ne fournit pas totalement la somme des signaux des deux sources individuelles et

peut fournir des interférences et des résultats inattendus. Tout d'abord, pour le couplage ESI/APPI, on observe un large effet de suppression de signal des protéines multichargées lorsque la source de photoionisation est allumée. Ce phénomène est attribué à l'interaction des ions initialement formés par les deux sources, indiquant ainsi l'importance des réactions ion-molécule pouvant avoir lieu durant et après le processus d'ionisation primaire [Syage, 2004b]. Quand à la source duale APCI/APPI, des signaux de divers composés sont observés, allant de moins de signal que chaque source utilisée seule à la somme des deux sources individuelles. Un simple modèle thermodynamique ne peut pas prédire ces effets d'ionisation et une compréhension beaucoup plus approfondie des mécanismes sous-jacents serait nécessaire afin que d'autres méthodes beaucoup plus performantes soient développées.

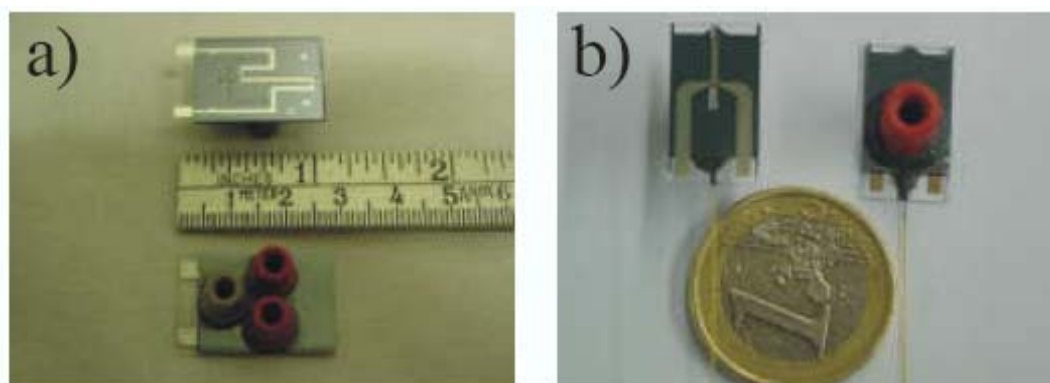
De récents travaux du même groupe ont permis de démontrer la faisabilité des sources ESPI (diminutif de ESI/APPI) se révélant être un outil supplémentaire pour l'étude de système à polarité mixte puisque ce type de source fournit des résultats spécifiques aussi bien pour les composés polaires qu'apolaires. Les mesures simultanées de composés au sein d'une solution à polarité variée contenant des composés pharmaceutiques (non polaires), un substrat (polaire) et un substrat lié (polaire) en ESPI-LC/MS ont été démontrées [Short, 2008].

#### IV.3 La miniaturisation des sources APPI

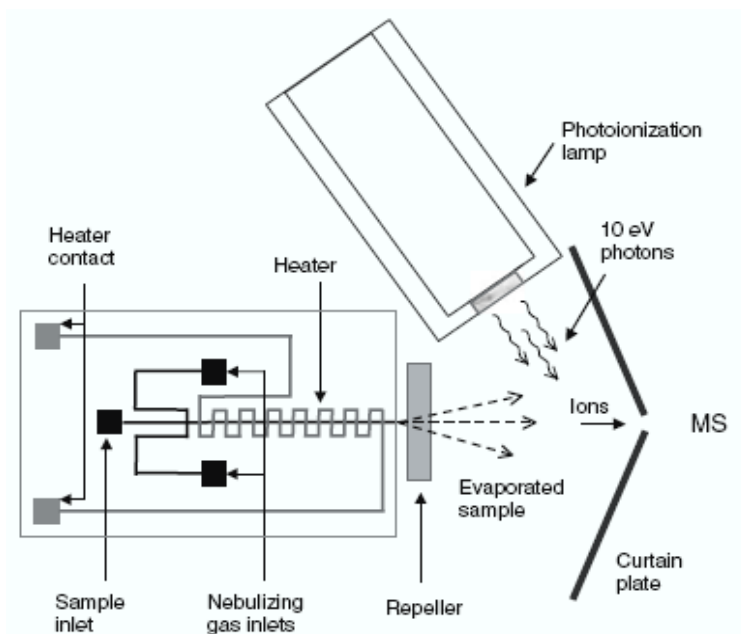
La nouvelle tendance dans le monde de la chimie analytique est la miniaturisation des techniques d'analyses conventionnelles [Huikko, 2003]. Le but de cette miniaturisation est de réaliser des analyses rapides avec une consommation très faible en solvant et la capacité d'analyser de très petite quantité d'échantillon sans perte de sensibilité. En outre, la possibilité d'automatiser les analyses, avec toutes les étapes nécessaires (préparation de l'échantillon, séparation et la détection) intégrées sur la même puce électronique, fascinent les scientifiques à l'heure actuelle.

De nombreux développements de la source APPI ont été présentés par le groupe de Kostianen en Finlande. Kauppila *et al.* ont fabriqué une puce pour l'analyse APPI-MS [Kauppila, 2004c]. Le système est composé d'un nébuliseur miniaturisé, contenant les entrées de fluides, pour l'échantillon liquide et le gaz nébuliseur, une chambre de mélange, un microchauffage intégré et une buse de sortie sur un disque de silicium qui est lié à l'anode par un disque de verre (**Figure 13**). Ce système est positionné à proximité d'une lampe à

décharge dans le Krypton qui est le plus près possible de l'entrée du spectromètre de masse (**Figure 14**). Les positions respectives de ces différents composants sont très critiques pour obtenir une ionisation efficace. La présence d'un “*repeller*” est nécessaire pour diriger efficacement les ions formés à travers le spectromètre de masse. Le dopant est délivré en solution avec l'échantillon et les mécanismes d'ionisation ayant lieu en mode d'ionisation positif et négatif sont les mêmes que ceux observés avec une source d'ion APPI classique. Les débits conventionnels utilisés avec la source APPI classique sont de l'ordre de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  alors que ce système de puce permet de travailler à des débits plus faibles allant de 0,05 à 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Ce système est donc compatible avec des séparations microfluidiques (micro et nano-LC), ce qui n'est pas possible avec les sources commerciales standard à photoionisation. La stabilité du signal a été démontrée par une mesure de 5 heures, prouvant ainsi l'excellente stabilité de la micro APPI. La même puce peut être utilisée pendant des semaines [Kauppila, 2004c].



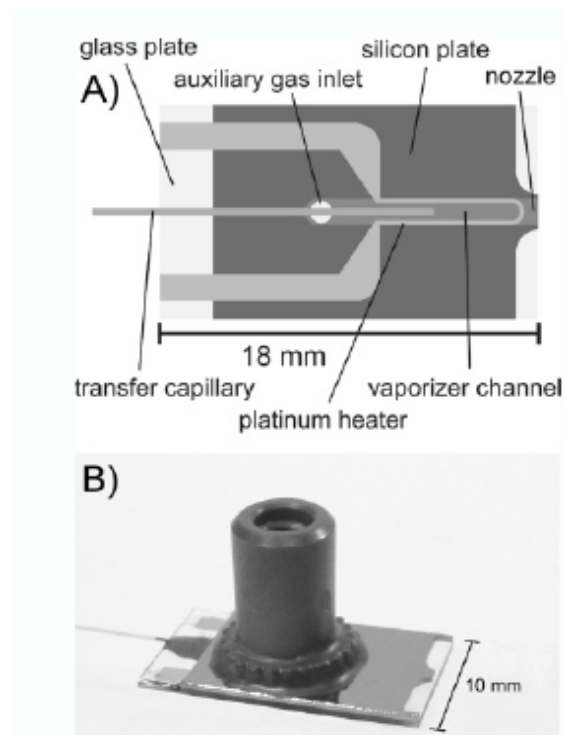
**Figure 13** : (a) Photographie du prototype de la micropuce APPI : la taille de la puce est de 18 x 29 mm principalement déterminée par la taille des connecteurs fluidiques (b) La micropuce APPI finale avec l'entrée du gaz nébuliseur et le capillaire d'introduction de l'échantillon. Sa taille est de 18 x 10 mm.



**Figure 14** : Représentation schématique de la microAPPI

Dans le futur, la performance de la  $\mu$ APPI peut être améliorée en optimisant, par exemple, les tensions appliquées, la position et la forme du “repeller”. Par ailleurs, une lampe plus petite pourrait permettre une meilleure proximité entre la puce et l’orifice du spectromètre de masse, ce qui permettrait d’augmenter l’efficacité d’ionisation.

Récemment, ce même groupe a fabriqué une micropuce pour coupler la photoionisation à pression atmosphérique (APPI) avec la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie liquide capillaire (capLC) [Haapala, 2007a]. La puce est composée d’une plaque de silicium et une (ou deux) plaque(s) en verre. Elle comprend un capillaire d’introduction pour l’échantillon, un gaz auxiliaire, une entrée de dopant, une zone de vaporisation, une buse et un tube de platine chauffé (**Figure 15a**). L’échantillon qui est élué de la capLC ou de la GC est mélangé au gaz auxiliaire et au dopant au sein de la phase vapeur chauffée. La puce forme un jet confiné de phase vapeur contenant l’analyte qui est photoionisée en sortie de la puce.



**Figure 15** : (a) Vue schématique de la micropuce, (b) photographie de la micropuce équipée du connecteur Nanoport et du capillaire de transfert

Ces travaux ont permis d'évaluer les performances analytiques de la GC et de la capLC couplées à une micropuce à photoionisation pour des composés hydrocarbonés polyaromatiques (PAH), des amphétamines et des stéroïdes [Haapala, 2007a]. Les résultats obtenus sont fournis dans le **tableau 8**.

**Tableau 8** : Limites de détection, répétabilités et linéarités des composés étudiés par GC et capLC- $\mu$ APPI-MS par Haapala *et al.* [Haapala, 2007a]

	GC- $\mu$ APPI-MS	capLC- $\mu$ APPI-MS
Sensibilité ( <i>fmol</i> )	< 0.8	< 1
Répétabilité ( <i>RSD en %</i> )	7.5-14	3.6-8.1
Linéarité ( <i>R</i> )	0.9952-0.9987	0.9989-0.9992

Ils ont démontré la pertinence de la micropuce pour le couplage GC ou capLC avec l'APPI. Leurs résultats ont permis de montrer que ces deux méthodes sont appropriées aussi bien pour l'analyse qualitative et quantitative de composés apolaires et polaires. D'autre part,

les micropuces peuvent être utilisées avec n'importe quel spectromètre de masse équipé de sources d'ions à pression atmosphérique.

Récemment, Luosujärvi *et al.* ont combiné la chromatographie en phase gazeuse et la trappe ionique avec les sources  $\mu$ APCI et  $\mu$ APPI. Ce groupe a analysé une série de composés biphényles polychlorés (PCB) par GC/ $\mu$ APCI-MS et GC/ $\mu$ APPI-MS afin de démontrer que les sources d'ions miniaturisées pouvaient être employées pour des analyses en mode négatif [Luosujärvi, 2008]. Avec ces deux méthodes, le meilleur résultat a été obtenu pour les PCB totalement chlorés ou non chlorés en position ortho, c'est-à-dire ceux possédant une très forte affinité électronique. Enfin, Luosujärvi *et al.* ont mis en évidence la pertinence de la méthode ( $\mu$ APPI-MS) pour l'analyse de PCB dans des matrices environnementales en étudiant des extraits de sol et en comparant les résultats avec ceux obtenus par chromatographie gazeuse couplée à une détection par capture d'électron (GC/ECD). Ces résultats ont permis de montrer que la  $\mu$ APPI est une méthode d'ionisation plus répétable pour l'analyse de PCB en mode négatif que la  $\mu$ APCI et, par ailleurs, qu'elle possède une plus large gamme de linéarité. Cependant, la  $\mu$ APCI est légèrement plus sensible pour l'étude de tels composés.

#### IV.4 Couplage de l'APPI avec d'autres méthodes séparatives

L'application de l'APPI-MS n'est pas seulement limitée à la chromatographie liquide conventionnelle. En effet, le développement de la  $\mu$ APPI, par exemple, permet le couplage de l'APPI-MS à la micro, la nano-LC et à certains dispositifs microfluidiques. La flexibilité des systèmes SFC/MS a aussi été étendue avec l'intégration de la photoionisation à pression atmosphérique pour l'analyse de composés non polaires et le rapport S/N a ainsi été augmenté [Bolaños, 2004].

L'application de l'APPI en électrophorèse capillaire (CE/MS) est une autre option [Nilsson, 2003]. En effet, l'avantage de l'APPI ici réside dans le fait qu'il s'agit d'une technique qui est très peu sensible aux sels non volatils tels que les tampons phosphate qui sont généralement utilisés pour des séparations en électrophorèse capillaire. Ainsi, les résultats obtenus en APPI sont meilleurs que ceux obtenus en ESI résultant en une diminution du bruit de fond et une meilleure sensibilité de détection (rapports S/N plus importants qu'en ESI). En 2005, la CE/APPI-MS a été étudiée plus en détail par le groupe de Somsen [Mol, 2005] qui a couplé avec succès la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) à la



photoionisation à pression atmosphérique. Contrairement à l'electrospray, l'APPI permet l'utilisation de surfactants non volatils et de tampons sans pour autant observer d'effet de suppression de signal. Par ailleurs, l'étude par MEKC-APPI-MS fournit une séparation et une ionisation de molécules polaires/chargées et de molécules neutres/apolaires. Ce système possède donc un domaine d'application assez large, ce qui peut être vraiment utile d'un point de vue analytique dans le cas notamment de l'analyse de composés inconnus. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives pour le couplage de la photoionisation à pression atmosphérique avec l'électrophorèse capillaire (CE) et la chromatographie électrocinétique micellaire (MECK).

Récemment, lors d'une étude en électrophorèse capillaire couplée à la photoionisation à pression atmosphérique (CE-APPI-MS), il a été observé que la formation des ions en phase gazeuse ne s'explique pas nécessairement par des mécanismes photo-induits [Hommerson, 2007a] mais pourraient aussi provenir de mécanismes indépendants de l'excitation VUV [Hommerson, 2007b]. Ce mécanisme a lieu seulement lorsque la tension du capillaire est portée à 600V alors que ce paramètre est négligeable en photoionisation directe ou en photoionisation assistée. Bien que le mécanisme de «l'ionisation photon indépendante» (PII) ne soit pas très bien compris, Hommerson *et al.* ont montré que plusieurs paramètres tels que le bruit de fond de l'électrolyte («BGE» pour Background Electrolyte) et la température présentent des similitudes avec les techniques d'ionisation classiques en phase liquide. Le mécanisme PII est initié par la formation de gouttelettes chargées, puis rétrécissement et évaporation de l'ion. Ce qui implique donc que la formation des ions en phase gazeuse par PII a déjà lieu en phase vapeur et pas à proximité du faisceau VUV.

En définitive, avec la capacité à ioniser des molécules apolaires, une efficacité d'ionisation peu sensible à la présence de tampons non volatils et une augmentation de la sensibilité en présence de dopants, l'APPI s'est avérée être, bien que moins sensible que l'*electrospray*, une méthode d'ionisation plus adaptée à la CE/MS. En outre, il faut souligner que le dodécyl sulfate de sodium (SDS) n'a pas d'effet négatif sur l'efficacité de photoionisation, l'APPI peut donc être une méthode de choix pour améliorer les compatibilités de la spectrométrie de masse avec la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC/MS).

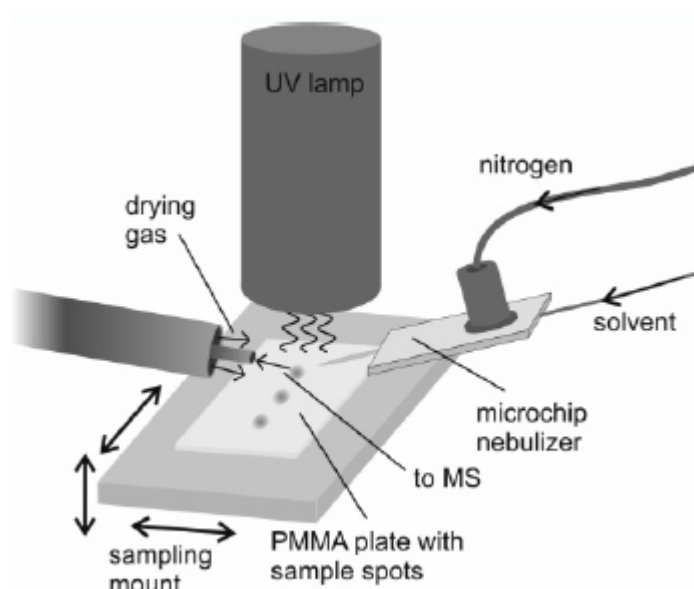
#### IV.5 Une technique très proche de la photoionisation : l'ionisation laser à pression atmosphérique

L'ionisation laser à pression atmosphérique (APLI), technique proche de la photoionisation à pression atmosphérique (APPI), a été récemment développée pour le couplage en chromatographie liquide par le groupe de Benter [Constapel, 2005]. Contrairement à l'APPI où une approche monophotonique est employée, l'APLI est basée, quand à elle, sur une ionisation multiphotonique (2 photons). Cette ionisation multiphotonique résonante (REMPI), similaire à un mécanisme de formation d'ions primaires, permet d'augmenter de manière significative la sélectivité du processus d'ionisation. De plus, le flux de photons délivré par le laser est beaucoup plus important que celui actuellement délivré par une lampe à photoionisation, entraînant des limites de détection de l'ordre de la femtomole [Constapel, 2005]. En APLI, on peut obtenir une ionisation efficace de composés apolaires. Cette technique s'est montrée particulièrement adéquate à l'analyse de composés hydrocarbonés polyaromatiques. De plus, les sources APLI peuvent être facilement montées sur des spectromètres de masse à pression atmosphérique. Les mécanismes et les processus décrits dans la littérature pour la photoionisation assistée par dopant peuvent aussi être appliqués pour expliquer les réactions observées en ionisation laser assistée (DA-APLI). Les perspectives de cette technique incluent (i) l'excitation multicolore. Cette approche est utile pour provoquer une excitation sélective et efficace des molécules (ii) L'ionisation laser assistée par dopant (DA-APLI). Les composés hydrocarbonés aromatiques étant ionisés efficacement, l'addition d'une molécule de dopant aromatique à l'éluent LC élargit de manière significative la gamme d'applicabilité de cette technique. Les mécanismes et les processus d'ionisation décrits dans la littérature pour la photoionisation assistée (DA-APPI) sont aussi adaptés à l'ionisation laser assistée (DA-APLI). (iii) L'attachement d'électron à pression atmosphérique. Les électrons thermiques sont générés par interaction entre le faisceau laser et les surfaces métalliques. La capture d'électron résonnante et/ou dissociative conduit alors à l'ionisation de l'analyte. Ce travail a été décrit par le groupe de Benter et est toujours en progression [Constapel, 2005].

## IV.6 Le DAPPI

La désorption par photoionisation à pression atmosphérique (DAPPI) est une nouvelle technique qui a rejoint récemment la famille des techniques d'ionisation directe incluant la désorption par électrobulbion (DESI) [Takáts, 2004], la désorption par ionisation chimique à pression atmosphérique (DAPCI) [Takáts, 2005], l'analyse directe en temps réel (DART), les sondes d'analyse de solides à pression atmosphérique (ASAP) [Haddad, 2006], la désorption par *sonic spray* (DeSSI) [Haddad, 2006] et l'ionisation/désorption laser assistée par électrobulbion (ELDI) [Shiea, 2005].

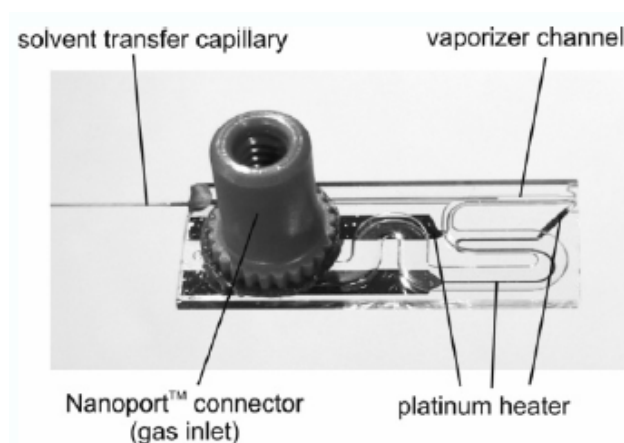
Les techniques d'ionisation à pression atmosphérique introduites jusqu'ici fonctionnent efficacement lorsque les composés à analyser sont polaires et facilement protonables ou déprotonables alors que les composés neutres et apolaires sont habituellement difficilement ionisables ou pas. C'est pourquoi le groupe de Kostianen [Haapala, 2007b] a mis au point une nouvelle technique d'ionisation à pression atmosphérique : la désorption par photoionisation à pression atmosphérique (DAPPI) qui permet l'ionisation de composés neutres et apolaires sur des surfaces. En DAPPI, il s'agit de l'analyse de surfaces et combinée à la photoionisation à pression atmosphérique : la **figure 16** présente une vue schématique du montage DAPPI.



**Figure 16** : Vue schématique de la source DAPPI

Cette technique offre de nouvelles possibilités pour l'ionisation de surface à pression atmosphérique et élargit ainsi la gamme des composés qui peuvent être analysés par des techniques directes d'ionisation par spectrométrie de masse à des composés apolaires. Cette méthode s'appuie sur un micro-nébuliseur polyvalent qui fournit un jet de vapeur confiné produisant un réchauffement très localisé de la surface. Les photons sont émis par une lampe à décharge dans le Krypton et en direction de l'échantillon qui se trouve sur la plaque (**Figure 16**). Le jet de vapeur et les photons désorbent et ionisent les analytes à la surface : les ions ainsi formés sont transférés à travers le spectromètre de masse par le biais d'une différence de potentiel (**figure 17**). Les mécanismes d'ionisation en DAPPI sont initiés par une désorption thermique de l'analyte à la surface et l'ionisation se produit par photoionisation. Il faut souligner que les réactions en phase gazeuse se produisant ici sont similaires à celles observées en APPI conventionnel.

L'efficacité d'ionisation du DAPPI a été testée en analysant des spots d'échantillon séchés de composés de polarités variables sur une surface de polymère. De plus, Haapala *et al.* ont analysé des échantillons réels par DAPPI, notamment l'étude de molécules pharmaceutiques directement sur une gélule [Haapala, 2007b]. Les principes physiques et chimiques du DAPPI sont encore en cours d'investigation par le groupe de Kostianen.



**Figure 17** : Puce du nébuliseur. Le chauffage s'effectue par le bas de la puce.

Récemment, Kauppila *et al.* ont étudié la faisabilité de cette technique pour l'analyse directe de drogues illicites. En effet, ils ont analysé des échantillons de drogues sur différentes surfaces telles que des gélules, papier buvard, résines et plantes [Kauppila, 2008]. Ce groupe a démontré l'utilité du DAPPI pour les différentes formes des drogues illicites : MDMA (3,4-

methylenedioxyamphétamine), amphétamine, phénazépame et buprénorphine ont été identifiés sur des gélules avec succès, le LSD et l'ABDF (bromobenzodifuranylisopropylamine) sur du papier buvard et le THC (tétrahydrocannabinol) sur des fleurs et de la résine. Les composés sont détectés, soit sous leur forme protonée soit sous forme d'ions moléculaires, dépendant de la structure du composé et du solvant utilisé. Le toluène favorise l'ionisation par transfert de charge donc la formation de l'espèce moléculaire alors que l'acétone conduit plutôt à la formation d'espèces protonées par transfert de proton.

En conclusion, cette technique est rapide, sensible et stable sans préparation ni purification préalable de l'échantillon. On observe un phénomène de désorption/ionisation efficace quelque soit la polarité de l'échantillon à analyser. La sélectivité de l'ionisation s'effectue par le choix du solvant. Enfin, des analyses quantitatives par DAPPI sont envisageables.

## V. LES LIMITATIONS DE CETTE TECHNIQUE

Comme on vient de le voir, de nombreux groupes ont rapporté des travaux en APPI permettant déjà de mettre en évidence certains phénomènes intéressants. Nous verrons, par la suite que certaines limitations peuvent être observé en raison notamment de la source de lumière utilisée, qui dans le cas de l'APPI, est une source de raies.

Le groupe de Traldi a étudié le mécanisme de photoionisation avec l'acétonitrile, le toluène et le benzène [Marotta, 2003]. Les résultats obtenus avec l'acétonitrile sont assez surprenants. En effet, ils permettent d'expliquer la formation d'espèces protonées  $[M+H]^+$  de l'analyte bien que le PI de l'acétonitrile soit supérieur à 10 eV (énergie des photons délivrés par la lampe). En effet, l'irradiation de l'acétonitrile par les photons UV va induire une excitation des molécules qui peut aboutir à des isomérisations. Certains produits d'isomérisation pourraient alors être photoionisés, leur PI étant inférieur à 10 eV. Des réactions avec des molécules d'acétonitrile pourraient alors permettre la formation d'agents protonants. La question ici qui se pose est de voir si cette isomérisation de l'acétonitrile a aussi lieu à une autre énergie de photons. L'apport d'une source accordable en longueur d'onde est alors primordial pour ce genre d'étude.

En outre, on observe parfois la formation d'espèces protonées  $[M+H]^+$ , qui ne peuvent pas se former par photoionisation directe. Des études ont montré que ces espèces avaient pour origine un cation radical  $M^{+\bullet}$  qui pourrait arracher un atome d'hydrogène à des molécules de solvants protiques présentes dans le milieu [Syage, 2004]. Une des questions qui se pose est de savoir si cette réaction de transfert d'hydrogène possède un seuil énergétique. Pour cela, des expériences utilisant une source accordable en longueur d'onde est nécessaire pour répondre à ces questions.

D'autres limitations surviennent notamment lors de l'étude des réactions de fragmentations ayant lieu dans la source d'ion APPI. Il est important de savoir si ces décompositions, qui ont lieu en source, sont dépendantes de la longueur d'onde. En effet, on peut ioniser sélectivement les molécules d'analytes en choisissant judicieusement l'énergie des photons produits par la lampe. A l'heure actuelle, il n'existe que trois lampes qui sont : la lampe à décharge dans le Krypton (la plus utilisée) qui fournit des photons de 10 eV. Les autres lampes rencontrées sont des lampes à décharge dans l'Argon (Ar) ou à Xénon (Xe) générant des photons de 11,2 et 8,4 eV respectivement. L'utilisation d'une source accordable serait une alternative judicieuse pour l'étude de mécanisme d'ionisation et de réaction en fonction de la longueur d'onde. Cela permet entre autres d'étudier la photochimie des solvants et des gaz utilisés. Par ailleurs, on pourra alors étudier les phénomènes d'absorptions de la lumière par les solvants et plus particulièrement l'eau qui possède un PI de 12,62 eV et donc qui ne peuvent pas être photoionisés par les lampes dont nous disposons actuellement.

## REFERENCES III

### B

[Bacaloni, 2007] A. Bacaloni, C. Cavaliere, A. Faberi, P. Foglia, A. Marino, R. Samperi et A. Laganà, Evaluation of the atmospheric pressure photoionization source for the determination of benzidines and chloroanilines in water and industrial effluents by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta*, 72, 2007, 419-426

[Baim, 1983] M.A. Baim, R.L. Eatherton et H.H. Hill, Ion mobility detector for gas chromatography with a direct photoionization source, *Anal. Chem.*, 55, 1983, 1761-1766

[Banoub, 2007] J.H. Banoub, B. Benjelloun-Mlayah, F. Ziarelli, N. Joly et M. Delmas, Elucidation of the complex molecular structure of wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure Photoionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2007, 2867-2888

[Bolaños, 2004] B. Bolaños, M. Greig, M. Ventura, W. Farrell, C.M. Aurigemma, H. Li, T.L. Quenzer, K. Tivel, J.M.R. Bylund, P. Tran, C. Pham et D. Phillipson, SFC/MS in drug discovery at Pfizer, LA Jolla, *Int. J. Mass Spectrom.*, 238, 2004, 85-97

[Borsdorf, 2006] H Borsdorf, E.G. Nazarov et R.A Miller, Atmospheric pressure ionization studies and field dependence of ion mobilities of isomeric hydrocarbons using a miniature differential mobility spectrometer, *Anal. Chim. Acta*, 575, 2006, 76-88

[Bos, 2006] S.J. Bos, S.M. van Leeuwen and U. Karst, From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 2006, 85-99

### C

[Cai, 2007a] S-S. Cai, K.A. Hanold et J.A. Syage, Comparison of atmospheric pressure photoionization and atmospheric pressure chemical ionization for normal-phase LC/MS chiral analysis of pharmaceuticals, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 2491-2498

[Cai, 2007b] S-S. Cai, L.C. Short, J.A. Syage, M. Potvin et J.M. Curtis, Liquid chromatography atmospheric pressure Photoionization mass spectrometry analysis of triacylglycerol lipids. Effects of mobile phases on sensitivity, *J. Chrom. A*, 1173, 2007, 88-97

[Cai, 2006a] S-S. Cai et J.A. Syage, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for analysis of fatty acid and acylglycerol lipids, *J. Chrom. A*, 1110, 2006, 15-26

[Cai, 2006b] S-S. Cai et J.A. Syage, Comparison of atmospheric pressure photoionization, atmospheric pressure chemical ionization and électrospray ionization mass spectrometry for analysis of lipids, *Anal. Chem.*, 78, 2006, 1191-1199

[Cai, 2005] Y.X Cai, D. Kingery, O. McConnell et A.C. Bach II, Advantages of atmospheric pressure photoionization mass spectrometry in support of drug discovery, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 2005, 1717-1724

[Cao, 2006] J. Cao, S.J. Murch, R. O'Brien et P.K. Saxena, Rapid method for accurate analysis of melatonin, serotonin and auxin by liquid chromatography atmospheric pressure ionisation mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1134, 2006, 333-337

[Cavaliere, 2006] C. Cavaliere, P. Foglia, E. Pastorini, R. Samperi et A. Laganà, Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk. Comparison between électrospray and atmospheric pressure photoioniaztion sources, *J. Chrom. A*, 1101, 2006, 69-78

[Chen, 2005] J.W. Chen, W.A. Korfmacher et Y. Hsieh, Chiral liquid chromatography tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations, *J. Chrom. A*, 820, 2005, 1-8

[Constapel, 2005] M. Constapel, M. Schellenträger, O.J. Schmitz, S. Gäb, K.J. Brockmann, R. Giese et Th. Benter, Atmospheric pressure laser ionization : a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 2005, 326-336



[Crescenzi, 2007] C. Crescenzi, J. Albinana, H. Carlsson, E. Holmgren et R. Battle, On-line strategies for determining trace levels of nitroaromatic explosives and related compounds in water, *J. Chrom. A*, 1153, 2007, 186-193

## D

[Davenport, 1984] J. N. Davenport et E. R. Adlard, Photoionization detectors for gas chromatography, *J. Chrom. A*, 290, 1984, 13-32

[Debois, 2006] D. Debois, A. Giuliani et O. Lapr evote, Fragmentation induced in atmospheric pressure photoionization of peptides, *J. Mass Spectrom.*, 41, 2006, 1554-1560

[Debrauwer, 2005] L. Debrauwer, A. Riu, M. Jouahri, E. Rathahao, I. Jouanin, J-P. Antignac, R. Cariou, B. Le Bizec et D. Zalco, Probing new approaches using atmospheric pressure photoionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1082, 2005, 98-109

[Delobel, 2003] A. Delobel, F. Halgand, B. Laffranchisse-Gosse, H. Snijders et O. Lapr evote, Characterization of hydrophobic peptides by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 75, 2003, 5961-5968

[Delobel, 2005] A. Delobel, D. Touboul et O. Lapr evote, Structural characterization of phosphatidylcholines by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 11, 2005, 409-417

[Delobel, 2006] A. Delobel, S. Roy, D. Touboul, K. Gaudin, D. P. Germain, A. Baillet, F. Brion, P. Prognon P. Chaminade et O. Lapr evote, Atmospheric pressure photoionization coupled to porous graphitic carbon liquid chromatography for the analysis of globotriaosylceramides. Application to Fabry disease, *J. Mass Spectrom.*, 41, 2006, 50-58

[Ding, 2007] Y.S. Ding, D.L. Ashley et C.H. Watson, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 2007, 5966-5973

[Doering, 2001] H.R. Doering, J. Riemenschneider, J. Adler, G. Arnold et T. Roebel, Photoionization ion mobility spectrometer, Patent No. US5968837, 2001

[Dorcier, 2003] A. Dorcier, P.J. Dyson et J.S McIndoe, Analysis of coordination and organometallic compounds using photoionisation mass spectrometric techniques, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 24, 2003, 4294-4297

[Driscoll, 1976] (a) J.N. Driscoll, Application of a photoionization detector in gas chromatography, *Am. Lab.*, 8, 1976, 71-75 ; (b) J.N. Driscoll et J. B. Clarici, A new photoionization detector for gas chromatography, *Chromatographia*, 9, 1976, 567-570 ; (c) J.N. Driscoll et F. F. Spaziani, PID development gives new performance levels, *Res. Dev.*, 27, 1976, 50-54

[Driscoll, 1977] J.N. Driscoll, Evaluation of a new photoionization detector for organic compounds, *J. Chrom.*, 134, 1977, 49-55

## G

[Geyer, 2004] R. Geyer, A.D. Peacock, D.C. White, C. Lytle et C.J. Van Berkel, Atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for simultaneous mass spectrometric analysis of microbial respiratory ubiquinones and menaquinones, *J. Mass Spectrom.*, 39, 2004, 922-929

[Giuliani, 2006] A. Giuliani, D. Debois et O. Laprévotte, Study of a bisquaternary ammonium salt by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 12, 2006, 189-197

[Gómez-Ariza, 2006a] J.L. Gomez-Ariza, A. Arias-Borrego, T. Garcia-Barrera et R. Beltran, Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication, *Talanta*, 70, 2006, 859-869

[Gómez-Ariza, 2006b] J.L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera et F. Lorenzo, Anthocyanins profile as fingerprint of wines using atmospheric pressure photoionization coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 570, 2006, 101-108

[Gómez-Ariza, 2006c] J.L. Gomez-Ariza, A. Arias-Borrego et T. Garcia-Barrera, Use of flow injection atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for fast olive oil fingerprinting, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 2006, 1181-1186

[Greig, 2003] M.J. Greig, B. Bolaños, T. Quenzer et J.M.R. Bylund, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization for high-resolution analyses of corticosteroids, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, 2763-2768

[Grosse, 2007] S. Grosse et T. Letzel, Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry with post-column liquid mixing for the efficient determination of partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Chrom. A*, 1139, 2007, 75-83

[Guo, 2004] T. Guo, M. Chan et S.J Soldin, Steroid profiles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure photoionization source, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 128, 2004, 469-475

## *H*

[Haapala, 2007a] M. Haapala, L. Luosujärvi, V. Saarela, T. Kotiaho, R.A. Ketola, S. Franssila et R. Kostianen, Microchip for combining gas chromatography or capillary liquid chromatography with atmospheric pressure Photoionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 4994-4999

[Haapala, 2007b] M. Haapala, J. Pól, V. Saarela, V. Arvola, T. Kotiaho, R.A. Ketola, S. Franssila, T.J. Kauppila et R. Kostianen, Desorption Atmospheric Pressure Photoionization, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 7867-7872

[Haddad, 2006] R. Haddad, R. Sparrapan et M.N. Eberlin, Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 2006, 2901-2905

[Hakala, 2003] K.S. Hakala, L. Laitinen, A.M. Kaukonen, J Hirvonen, R. Kostianen et T. Kotiaho, Development of LC/MS/MS methods for cocktail dosed Caco-2-samples using

atmospheric pressure Photoionization and electrospray ionization, *Anal. Chem.*, 75, 2003, 5969-5977

[Hanold, 2004] K.A. Hanold, S.M. Fisher, P.H. Cormia, C.E. Miller et J.A. Syage, Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS. *Anal. Chem.*, 76, 2004, 2842-2851

[Himmelsbach, 2007] M. Himmelsbach, M. Haunschmidt, W. Burchberger et C.W. Klampfl, Microemulsion electrokinetic chromatography with on-line atmospheric pressure Photoionization mass spectrometric detection of medium polarity compounds, *J. Chrom. A*, 1159, 2007, 58-62

[Hommerson, 2007a] P. Hommerson, A.M. Khan, G.J. De Jong et G.W. Somsen, Comparison of atmospheric pressure photoionization and ESI for CZE-MS of drugs, *Electrophoresis*, 28, 2007, 1444-1453

[Hommerson, 2007b] P. Hommerson, A.M. Khan, T. Bristow, W. Niessen, G.J. De Jong et G.W. Somsen, Photon independent gas phase ion formation in capillary electrophoresis mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization, *Anal. Chem.*, 79, 2007, 5351-5357

[Hsieh, 2003] Y.S. Hsieh, K. Merkle et G.F. Wang, Zirconia-based column high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure Photoionization tandem mass spectrometric analyses of drug molecules in rat plasma, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, 1775-1780

[Hsieh, 2007] Y.S. Hsieh, C.J.G. Duncan, S.N. Lee et M. Liu, Comparison of fast liquid chromatography tandem mass spectrometric methods for simultaneous determination of cladribine et clofarabine in mouse plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 2007, 492-497

[Huikko, 2003] K. Huikko, R. Kostianen et R. Kotiaho, Introduction to micro-analytical systems: bioanalytical and pharmaceutical applications, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 20, 2003, 149-171

## I

[Itoh, 2006] N. Itoh, Y. Aoyagi et T. YArita, Optimization of the dopant for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography/dopant assisted atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1131, 2006, 285-288

## J

[Jean-Denis, 2006] J.B. Jean-Denis, R. Pezet et R. Tabacchi, Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1112, 2006, 263-268

## K

[Kauppila, 2002] T.J. Kauppila, T. Kuuranne, E.C. Meurer, M.N. Eberlin, T. Kotiaho et R. Kostianen, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes, *Anal. Chem.*, 74, 2002, 5470-5479

[Kauppila, 2004a] T.J. Kauppila, R. Kostianen et A.P. Bruins, Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 2004, 808-815

[Kauppila, 2004b] T.J. Kauppila, T. Kotiaho, R. Kostianen et A.P. Bruins, Negative ion-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 2004, 203-211

[Kauppila, 2004c] T.J. Kauppila, P. Östman, S. Marttila, A. Ketola, R.T. Kotiaho, S. Franssila et R. Kostianen, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry with a microchip heated nebulizer, *Anal. Chem.*, 76, 2004, 6797-6801

[Kauppila, 2006] T.J. Kauppila, T. Nikkola, R.A. Ketola et R. Kostianen, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of neurotransmitters, *J. Mass Spectrom.*, 41, 2006, 781-789

[Kauppila, 2008] T.J. Kauppila, V. Arvola, M. Haapala, J. Pól, L. Aalberg, V. Saarela, S. Franssila, T. Kotiaho et R. Kostianen, Direct analysis of illicit drugs by desorption atmospheric pressure Photoionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 2008, 979-985

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

[Keski-Hynnila, 2002] H. Keski-Hynnila, M. Kurkela, E. Elovaara, J Antonio, J.Magdalou, L. Luukkanen, J Taskinen et R. Kostianen, Comparison of électrospray, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure Photoionization in the identification of apomorphine, dobutamine and entacapone phase II metabolites in biological samples, *Anal. Chem.*, 74, 2002, 3449-3457

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

[Kushnir, 2004] M.M. Kushnir, R. Neilson, W.L. Roberts et A.L. Rockwood, Cortisol and cortisone analysis in serum and plasma by atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.*, 37, 2004, 357-362

## *L*

[Leasure, 1986] C.S. Leasure, M.E. Fleischer, G.K. Anderson et G.A. Eiceman, Photoionization in air with ion mobility spectrometry using a hydrogen discharge lamp, *Anal. Chem.*, 58, 1986, 2142-2147

[Lembeck, 2005] J. Lembeck, U. Ceglarek, G.M. Fiedler, S. Baumann, A. Leichtle et J. Thierry, Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS, *J. Lipid Res.*, 46, 2005, 21-26

[Locke, 1982] D.C. Locke, B.S. Dhingra et A.D. Baker, Liquid-phase photoionization detetor for liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 54, 1982, 447-450

[Luosujärvi, 2008] L. Luosujärvi, M-M. Karikko, M. Haapala, V. Saarela, S. Huhtala, S. Franssila, R. Kostiainen, T. Kotiaho and T. Kauppila, Gas chromatography/mass spectrometry of polychlorinated biphenyls using atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photonization microchips, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 2008, 425-431

## *M*

[Marotta, 2003a] E. Marotta, R. Seraglia, F. Fabris et P. Traldi, Atmospheric pressure photoionization mechanisms. 1. The case of acetonitrile, *Int. J. Mass Spectrom.*, 228, 2003, 841-849

[Marotta, 2003b] E. Marotta et P. Traldi, On the photo-initiated isomerization of acetonitrile, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, 2846-2848

[Martens-Lobenhoffer, 2007] J. Martens-Lobenhoffer, I. Reiche, U. Tröger, K. Mönkemüller, P. Malfertheiner et S.M. Bode-Böger, Enantioselective quantification of omeprazole and its main metabolites in human serum by chiral HPLC-atmospheric pressure Photoionization tandem mass spectrometry, *J. Chrom. B*, 857, 2007, 301-307

[Meng, 2002] C.K. Meng, Analyzing phenyl ureas and carbamate pesticides using ESI-, APPI- and APCI-LC/MSD. Agilent Technologies publication 5988-6635

[Mohamed, 2007] R. Mohamed, Y.A. Hammel, M.H. LeBreton, J.C. Tabet, L. Jullien, et P.A. Guy, Evaluation of atmospheric pressure interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques, *J. Chrom. A*, 1160, 2007, 194-205

[Mol, 2005] R. Mol, G.J. de Jong et G.W. Somsen, Atmospheric pressure photoionization for enhanced compatibility in on-line micellar electrokinetic chromatography mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 77, 2005, 5277-5282

[Moriwaki, 2004a] H. Moriwaki, H. Harino, T. Yoshikura, T. Ohe, H. Nukaya, Y. Tereao, H. Swanishi, K. Wakabayashi, H. Miyakoda et J.F. Alary, Simultaneous determination of 2-

phenylbenzotriazole-type mutagens, PBTA-1 through -8, in river water by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Environ. Monit.*, 6, 2004, 897-902

[Moriwaki, 2004b] H. Moriwaki, M. Ishitake, S. Yoshikawa, H. Miyakoda et J.F. Alary, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Anal. Sci.*, 20, 2004, 375-377

[Mota, 2005] R. Mota, R. Parafita, A. Giuliani, M-J. Hubin-Franskin, J.M.C. Lourenço, G. Garcia, S.V. Hoffmann, N.J. Mason, P.A. Ribeiro, M. Raposo et P. Limão-Vieira, Water VUV electronic state spectroscopy by synchrotron radiation, *Chem. Phys. Lett.*, 416, 2006, 152-159

[Müller, 2006] A. Müller, M.B. Markus, R. Geyer, R. Ringseis, K. Eder et H. Steinhart, Identification of conjugated linoleic acid elongation and beta-oxidation products by coupled silver-ion HPLC APPI-MS, *J. Chrom. B*, 837, 2006, 147-152

[Muñoz-Garcia, 2008] A. Muñoz-Garcia, J. Ro, J.C. Brown et J.B. Williams, Cutaneous water loss and sphingolipids in the stratum corneum of house sparrows, *Passer domesticus* L., from desert and mesic environments as determined by reversed phase high pressure Photospray ionization mass spectrometry, *J. Exp. Biol.*, 211, 2008, 447-458

## *N*

[Nilsson, 2003] S.L. Nilsson, C. Andersson, P.J.R. Sjöberg, D. Bylund, P. Petersson, M. Jörntén-Karlsson et K.E. Markides, Phosphate buffers in capillary electrophoresis/mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, 2267-2272

## *P*

[Pardo, 2007a] O. Pardo, V. Yusa, C. Coscolla, V. León et A. Pastor, Determination of acrylamide in coffee and chocolate by pressurised fluid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Addit. Contam.*, 24, 2007, 663-672



[Pardo, 2007b] O. Pardo, V. Yusa, V. León et A. Pastor, Development of a pressurised liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry method for the determination of domoic acid in shellfish, *J. Chrom. A*, 1154, 2007, 287-294

[Purcell, 2006] J.M. Purcell, C.L. Hendrickson, R.P. Rodgers et A.G Marshall, Atmospheric pressure photoionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for complex mixture analysis, *Anal. Chem.*, 78, 2006, 5906-5912

[Purcell, 2007a] J.M. Purcell, C.L. Hendrickson, R.P. Rodgers et A.G Marshall, Atmospheric pressure photoionization proton transfer for complex organic mixtures by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 1682-1689

[Purcell, 2007b] J.M. Purcell, R.P. Rodgers, C.L. Hendrickson et A.G Marshall, Speciation of nitrogen containing aromatics by atmospheric pressure Photoionization or Electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 1265-1273

[Purcell, 2007c] J.M. Purcell, P. Juyal, D-G Kim, R.P. Rodgers, C.L. Hendrickson et A.G Marshall, Sulfur speciation in petroleum : atmospheric pressure Photoionization or chemical dérivatisation and électrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Energy & Fuels*, 21, 2007, 2569-2874

## $\mathcal{R}$

[Raffaelli, 2003] A. Raffaelli et A. Saba, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, 22, 2003, 318-331

[Rauha, 2001] J.P. Rauha, H. Vuorela et R. Kostianen, Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoïdes by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 36, 2001, 1269-1280

[Revel'skii, 1991] (a) I.A. Revel'skii, Y.S Yashin, V.K. Kurochkin et R.G. Kostyanovskii, Mass spectrometry with photoionization at atmospheric pressure and the analysis of

multicomponent mixtures without separation, *Chem. Physiochem. Methods Anal.*, 1991, 243-248 (b) I.A. Revel'skii, Y.S. Yashin, V.K. Kurochkin et R.G. Kostyanovskii, *Zavodskaya Laboratoriya*, 57, 1991, 1-4

[Revel'skii, 1986] I.A. Revel'skii, Y.S. Yashin, V.K. Kurochkin et R.G. Kostyanovskii, *Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim.*, 9, 1986, 1987-1992

[Riu, 2006] A. Riu, D. Zaliko et L. Debrauwer, Study of polybrominated diphenyl ethers using both positive and negative atmospheric pressure photoionization and tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 2006, 2133-2142

[Robb, 2000] D.B. Robb, T.R. Covey and A.P. Bruins, Atmospheric Pressure Photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 72, 2000, 3653-3659

[Roy, 2006] S. Roy, A. Delobel, K. Gaudin, D. Touboul, D.P. Germain, A. Baillet, P. Prognon, O. Lapr evote et P. Chaminade, Liquid chromatography on porous graphitic carbon with atmospheric pressure Photoionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry for the analysis of glycosphingolipides, *J. Chrom. A*, 1117, 2006, 154-162

## S

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

[Schappler, 2008] J. Schappler, D. Guillaume, S. Rudaz et J-L. Veutey, Microemulsion electrokinetic chromatography hyphenated to atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Electrophoresis*, 29, 2008, 11-19

[Schermund, 1975] J.T. Schermund et D.C. Loke, *Anal. Lett.*, 8, 1975, 611-625

[Shiea, 2005] J. Shiea, M-Z. Huang, H-J. Hsu, C-Y. Lee, C-H. Yuan, I. Beech et J. Sunner, Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for direct ambient analysis of solids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 2005, 3701-3704

[Short, 2007] L.C. Short, S.S. Cai et J.A. Syage, APPI-MS : effects of mobile phase and VUV lamps on the detection of PAH compounds, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 589-599

[Short, 2008] L.C. Short et J.A. Syage, Electrospray photoionization (ESPI) liquid chromatography/mass spectrometry for the simultaneous analysis of cyclodextrin and pharmaceuticals and their binding interactions, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 2008, 541-548

[Song, 2007a] L. Song, A.D. Wellman, H. Yao et J. Adcock, Electron capture atmospheric pressure Photoionization mass spectrometry: analysis of fullerenes, perfluorinated compounds, and pentafluorobenzyl derivatives, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2007, 1343-1351

[Song, 2007b] L. Song, A.D. Wellman, H. Yao et J.E. Bartmess, Negative ion atmospheric pressure photoionization : electron capture, dissociative electron capture, proton transfer and anion attachment, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 1789-1798

[Spangler, 1991] G.E Spangler, J.E. Rohel, G.B. Patel et A. Dorman, Photoionization ion mobility spectrometer, Patent No. US5338931, 1991

[Starkey, 2006] J.A. Starkey, Y. Mechref, J. Muzikar, W.J. McBride et M.V. Novotny, Determination of salicylic acid and related catecholamines through on-line preconcentration and liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 78, 2006, 3342-3347

[Straube, 2004] E.A. Staube, W. Dekant et W. Völkel, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for the analysis of dinitropyrene and aminonitropyrene by LC-MS/MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 2004, 1853-1862

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

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

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

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

[Syage, 2004b] J.A. Syage, K.A. Hanold, T.C. Lynn, J.A. Horner and R.A. Takhur, Atmospheric pressure photoionization II. Dual source ionization, *J. Chrom. A*, 1050, 2004, 137-149

## $\mathcal{T}$

[Takáts, 2004] Z. Takáts, J.M. Wiseman, B. Gologan et R.G. Cooks, Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization, *Science*, 306, 2004, 471-473

[Takáts, 2005] Z. Takáts, I. Cotte-Rodriguez, N. Talaty, H. Chen et R.G. Cooks, Direct trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Chem. Commun.*, 2005, 1950-1952

[Takino, 2004a] M. Takino, K. Yamaguchi et T. Nakahara, Determination of carbamate pesticide in vegetables and fruits by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2004, 727-735

[Takino, 2004b] M. Takino, T. Tanaka, K. Yamaguchi, et T. Nakahara, Atmospheric pressure photo-ionization liquid chromatography/mass spectrometric determination of aflatoxins in food, *Food Addit. Contam.*, 21, 2004, 76-84

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

spectrometry by automated on-line extraction using turbulent flow chromatography, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17, 2003, 383-390

[Takino, 2003b] M. Takino, S. Daishima et T. Nakahara, Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1011, 2003, 67-75

[Talyzin, 2006] A.V. Talyzin, Y.O. Tsybin, J.M. Purcell, T.M. Schaub, Y.M. Shulga, D. Noreus, T. Sato, A. Dzwilewski, B. Sundqvist et A.G. Marshall, Reaction of Hydrogen Gas with C60 at Elevated Pressure and Temperature: Hydrogenation and Cage Fragmentation, *J. Phys. Chem. A*, 110, 2006, 8528-8534

[Theron, 2007] H.B. Theron, van der Merwe, K.J Swart et J.H. van der Westhuizen, Employing atmospheric pressure photoionization in liquid chromatography/tandem mass spectrometry to minimize ion suppression and matrix effects for the quantification of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2007, 1680-1686

[Theron, 2004] H.B. Theron, C. Coetzee, F.C.W. Sutherland, J.L. Wiesner et K.J. Swart, Selective and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of levonorgestrel in human plasma, *J. Chrom. B*, 813, 2004, 331-336

[Tonidandel, 2008] L. Tonidandel, E. Ragazzi, G. Roghi et P. Traldi, Mass spectrometry in the characterization of ambers. I. Studies of amber samples of different origin and ages by laser desorption ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 2008, 630-638

[Trösken, 2004] E.R. Trösken, E. Straube, W.K. Lutz, W. Völkel et C. Pattern, Quantitation of lanosterol and its major metabolite FF-MAS in an inhibition assay of CYP51 by azoles with atmospheric pressure photoionization based LC-MS/MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 2004, 1216-1221

[Tubaro, 2003] M. Tubaro, E. Marotta, R. Seraglia et P. Traldi, Atmospheric pressure photoionization mechanisms. 2. The case of benzene and toluene, *Rapid Commun. MassSpectrom.*, 17, 2003, 2423-2429

[Turnipseed, 2005] S.B. Turnipseed, J.E. Roybal, W.C. Andersen, L.R. Kuck, Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source, *Anal. Chim. Acta*, 529, 2005, 159-165

### V

[van Leeuwen, 2004] S.M. van Leeuwen, L. Hendriksen et U. Karst, Determination of aldehydes and ketones using derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine and liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1058, 2004, 107-112

[Varga, 2006] M. Varga, T. Bartok et A. Mesterhazy, Determination of ergosterol in Fusarium-infected wheat by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1103, 2006, 278-283

### W

[Wang, 2005] G.F. Wang, Y. Hsieh et W.A. Korfmacher, Comparison of atmospheric pressure chemical ionization, electrospray ionization and atmospheric pressure Photoionization for the determination of cyclosporine A in rat plasma, *Anal. Chem.*, 77, 2005, 541-548

### Y

[Yamamoto, 2006] A. Yamamoto, N. Kakutani, K. Yamamoto, T. Kamiura et H. Miyakoda, Steroid hormone profiles of urban and tidal rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization sources, *Environ. Sci. Technol.*, 40, 2006, 4132-4137

[Yang, 2002] C.M. Yang et J. Henion, Atmospheric pressure photoionization liquid chromatographic mass spectrometric determination of idoxifene and its metabolites in human plasma, *J. Chrom. A*, 970, 2002, 155-165

[Yoshioka, 2004] N. Yoshioka, Y. Akiyama et K. Teranishi, Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography mass spectrometry using atmospheric pressure Photoionization, *J. Chrom. A*, 1022, 2004, 145-150

## Z

[Zavitsanos, 2003] P. Zavitsanos, Using the LC-atmospheric pressure ionization ion trap for the analysis of steroids in water, *Liquid Chromatography/mass spectrometry, MS/MS and time of flight MS*, 850, 2003, 207-236

[Zheng, 2006] J. Zheng et S.A. Shamsi, Capillary electrochromatography coupled to atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for methylated benzo [a]pyrene isomers, *Anal. Chem.*, 78, 2006, 6921-6927

[Zhang, 2007] F. Zhang, W.T. Stott, A.J. Clark, M.R. Schisler, J.J. Grundy, B. Bhaskar Gollapudi et M.J. Bartels, Quantitation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by liquid chromatography/positive atmospheric pressure Photoionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 2007, 3949-3955

[Zöllner, 2006] P. Zöllner et B. Mayer-Helm, Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1136, 2006, 123-169

***Chapitre 4 :***  
***Les sources de lumière***



## CHAPITRE 4 : Les sources de lumière

### I. SOURCES DE RAIES : LES LAMPES A DECHARGES

#### I.1 Historique

Francis Hauksbee a, le premier, décrit une lampe à décharge en 1705. Il montra qu'un globe de verre, dans lequel on a réalisé un vide partiel ou complet, chargé d'électricité statique, peut produire une lumière suffisante pour permettre de lire. Cet effet est la base de la lampe néon et de la lampe à vapeur de mercure. Sir Humphry Davy décrivit en 1802 le premier arc électrique. Depuis, de nombreuses recherches ont été réalisées sur les sources de lumière à décharge, car elles produisent de la lumière à partir de l'électricité de façon considérablement plus efficace que les ampoules à incandescence. Plus tard, on a découvert que l'arc de décharge peut être optimisé en utilisant un gaz inerte au lieu de l'air en tant que milieu. C'est pour cette raison que, dans le passé, des gaz nobles tel que le néon, l'argon, le krypton ou le xénon furent employés tout comme le dioxyde de carbone. L'introduction de la lampe à vapeur de métal, incluant divers métaux à l'intérieur du tube de décharge, fut une avancée postérieure. La température du gaz de décharge vaporise un peu de métal et la décharge est alors produite presque exclusivement par la vapeur de métal. Habituellement, on utilise du sodium et du mercure en raison de leur haute pression de vapeur qui augmente l'efficacité de l'émission électromagnétique dans le spectre visible.

#### I.2 Principe de fonctionnement

Les molécules du gaz métallique utilisé ont la faculté de pouvoir s'ioniser lorsqu'elles sont soumises à la différence de potentiel créée entre les électrodes situées de chaque côté de la lampe. Les électrons libérés sont attirés par une des électrodes et les ions positifs par l'autre. Un énorme flux d'électrons traverse l'ampoule. Lors du passage de ce flux, se produisent de nombreuses collisions entre les électrons libres et ceux présents dans le gaz de la lampe. Les collisions inélastiques peuplent des états électroniques des molécules du gaz lesquelles se

relaxent avec une émission de fluorescence dont la longueur d'onde dépend de la nature du gaz et des conditions de décharge.

### I.3 Cas des lampes de photoionisation (PID)

Les lampes à décharge utilisées en photoionisation utilisent différents gaz de remplissage tels que le Xénon, le Krypton, l'Argon ou encore le Deutérium avec une très grande pureté pour une durée de vie de la lampe assez longue. Différents matériaux de fenêtres peuvent être utilisés avec des longueurs d'onde différentes. L'excitation des lampes à photoionisation se fait en courant continu ou alternatif et la gamme des énergies d'ionisation avec ce type de lampe varie entre 8,4 à 11,8 eV. Comme il s'agit de lampe à décharge, il faut savoir que la lampe n'est pas constituée de filament mais d'un capillaire. On crée alors un courant d'électron qui se déplace entre les deux électrodes. Ce courant d'électrons excite le gaz (Xe, Kr ou Ar) par impact électronique. Ainsi, l'atome de gaz se relaxe en réémettant de la lumière qui produit dans 99,9 % des cas une seule raie.



**Figure 1** : Lampe de photoionisation Heraeus™ utilisée avec la source d'ions APPI

Les lampes PID Heraeus™ sont commercialisées avec des fenêtres MgF<sub>2</sub>, LiF, en saphire ou encore des fenêtres en silice synthétique. Le fluorure de magnésium (MgF<sub>2</sub>) est de loin le matériau le plus utilisé puisqu'il fournit une excellente transmission dans l'ultraviolet avec une durée de vie raisonnable. Seules les lampes Heraeus™ permettent l'utilisation d'une fine épaisseur de MgF<sub>2</sub> améliorant ainsi la transmission de la fenêtre et la durée de vie de la lampe du fait de la réduction de la densité de lumière absorbée par les centres de couleur. Les caractéristiques de ces lampes sont présentées sur le **tableau 1**.

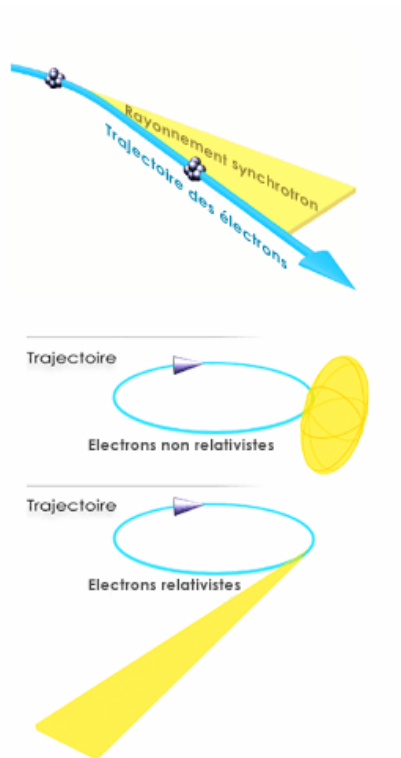
**Tableau 1** : Quelques données concernant les lampes de photoionisation Heraeus™

<b>Lamp type</b>	<b>PXS 084</b>	<b>PXS 096</b>	<b>PKS 106</b>	<b>PAS 118</b>	<b>PXL 084</b>	<b>PKL 102</b>	<b>PAL 118</b>
Excitation	DC	DC	DC	DC	DC	DC	DC
Ignition voltage (V)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Photon energy (eV)	8.4	9.6	10.6	11.8	8.4	10.2	11.8
Operating current (mA)	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Ignition time (s)	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
Dimensions (Length x Diameter in mm)	52 x 19.6	52 x 19.6	52 x 19.6	52 x 19.6	56 x 34.7	56 x 34.7	56 x 34.7

## II. LES SOURCES ACCORDABLES : LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON

### II.1 Généralités

Lorsque des particules chargées (comme les électrons) sont accélérés à une vitesse relativiste, ils émettent un rayonnement appelé “*brehmstrahlung*”. Cette radiation est appelée ainsi pour des raisons historiques. Elle a été observée pour la première fois au béatron à Schenectady en 1946 comme résultante d’un bombardement d’électrons rapides sur une fine “cible” métallique [Baldwin, 1975 et Kulipanov, 1988].



**Figure 2** : Trajectoires des électrons relativistes et non relativistes

Le rayonnement synchrotron est essentiellement continu en longueur d'onde ou en énergie. Cependant, une limite supérieure existe pour l'énergie maximum émise, comme les photons ne peuvent pas être émis avec plus d'énergie que l'énergie cinétique des particules. Pour des particules ayant une masse au repos  $m_0$  et une orbite circulaire l'énergie émise par cycle  $\varepsilon$  est donnée par [Liénard, 1889] :

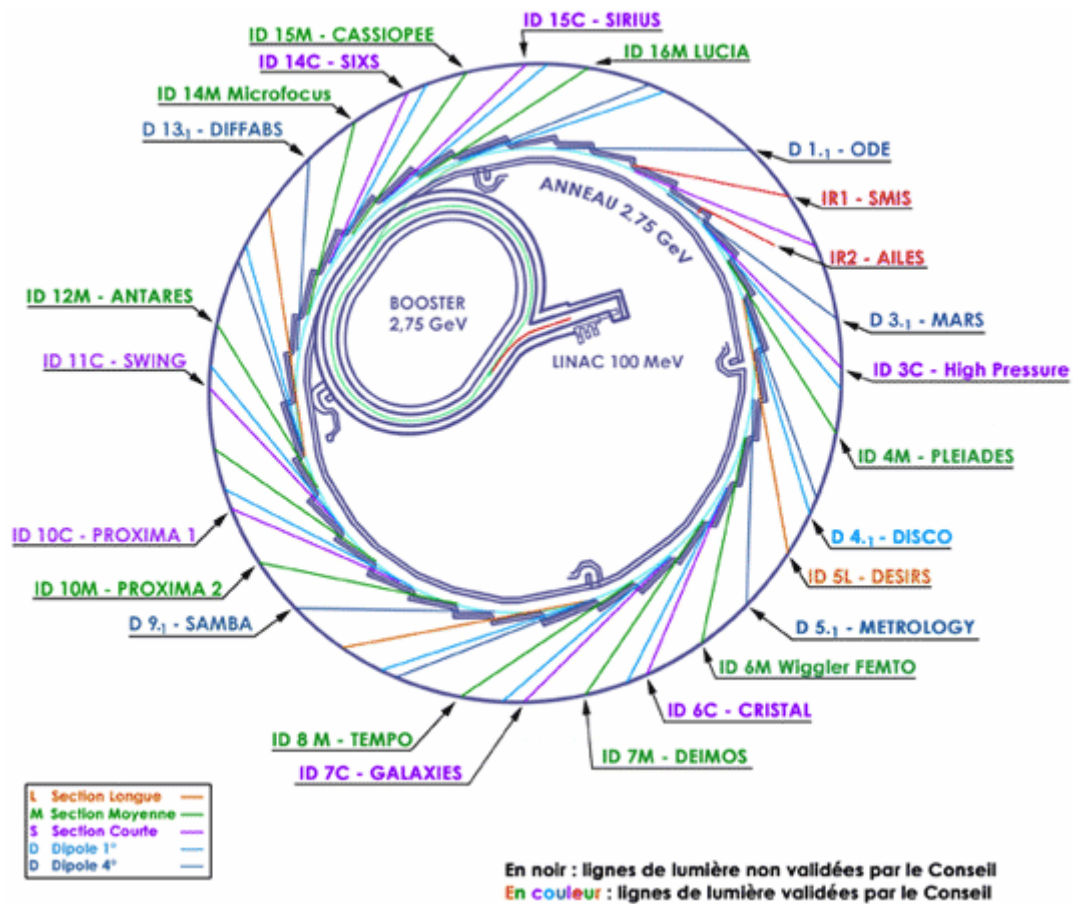
$$\varepsilon \propto \left( \frac{T}{m_0 c^2} \right)^4$$

où T est l'énergie cinétique des particules. Cette équation indique que les particules de bas poids moléculaire émettent plus d'énergie que celles plus lourdes. Généralement, les électrons et parfois les positrons sont utilisés pour le rayonnement synchrotron.

## II.2 L'installation de rayonnement synchrotron SOLEIL

Le rayonnement synchrotron SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE) est une source de 3<sup>ème</sup> génération qui est en fonctionnement officiel

depuis le 23 janvier 2008, date de l'accueil des premiers utilisateurs. Le schéma de la machine est donné à la *figure 3*.

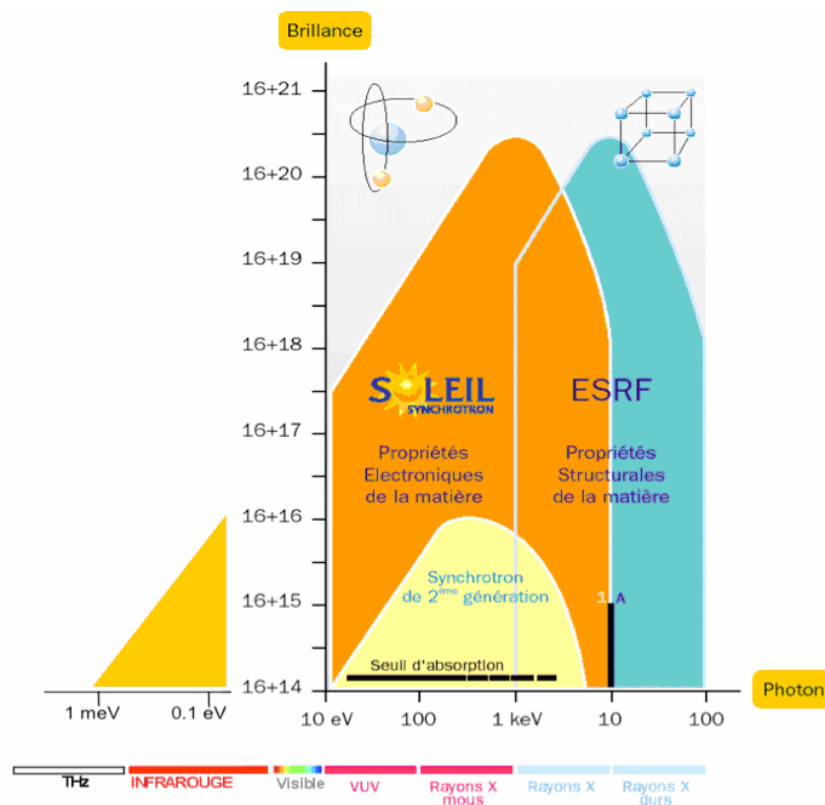


**Figure 3** : L'installation de rayonnement synchrotron SOLEIL

Les électrons produits par un canon sont accélérés dans un accélérateur linéaire appelé LINAC à 100 MeV. Ils sont introduits dans un second accélérateur annulaire, le booster, et portés à 2,75 GeV. Lorsqu'ils ont atteint cette énergie, les électrons sont injectés dans l'anneau de stockage de 354 mètres de circonférence qui peut accumuler jusqu'à 500 mA.

Les électrons sont maintenus sur une orbite fermée par des aimants de courbure, dipolaires, qui sont autant de sources de lumières. Des aimants quadripolaires et sextupolaires sont utilisés pour la focalisation du faisceau d'électrons. Deux cryomodules contenant les cavités radiofréquences permettent de compenser les pertes d'énergie du faisceau consécutives à l'émission de rayonnement. Ces éléments permettent en outre de rassembler les électrons en paquets, ce qui est à l'origine de la structure temporelle du rayonnement synchrotron.

Le rayonnement synchrotron est produit dans deux types principaux de sources : les aimants de courbures et les éléments d'insertions. Les aimants de courbures produisent une lumière blanche tangiellement à la trajectoire des électrons. Les éléments d'insertions sont des dispositifs placés dans les sections droites de l'anneau et comprennent les wigglers et les onduleurs. Ils sont composés de séries de petits aimants dont les polarités sont alternées et servent à intensifier le rayonnement dans l'ultraviolet lointain et les rayons X. La **figure 4** compare la brillance en fonction de l'énergie des photons de SOLEIL avec celle de l'ESRF.



**Figure 4** : Comparaison de SOLEIL et de l'ESRF au niveau énergétique

Le rayonnement synchrotron est extrait de l'anneau par une tête de ligne et est envoyé dans une ligne de lumière. Les lignes de lumière sont composées de l'ensemble des éléments de vide, d'optique et de diagnostic nécessaire pour assurer le transport de la lumière vers les stations expérimentales. Ce sont sur ces dernières que sont entreprises les expériences.

L'expérience de photoionisation à pression atmosphérique qui se compose de la source APPI et du spectromètre de masse Qstar pulsar *i* a été transférée sur la ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL le 22 novembre 2007. Ce projet vise à remplacer la lampe UV de la source APPI par le rayonnement délivré par la ligne de lumière.

### III. LA LIGNE DE LUMIERE DISCO

#### III.1 Présentation de la ligne DISCO

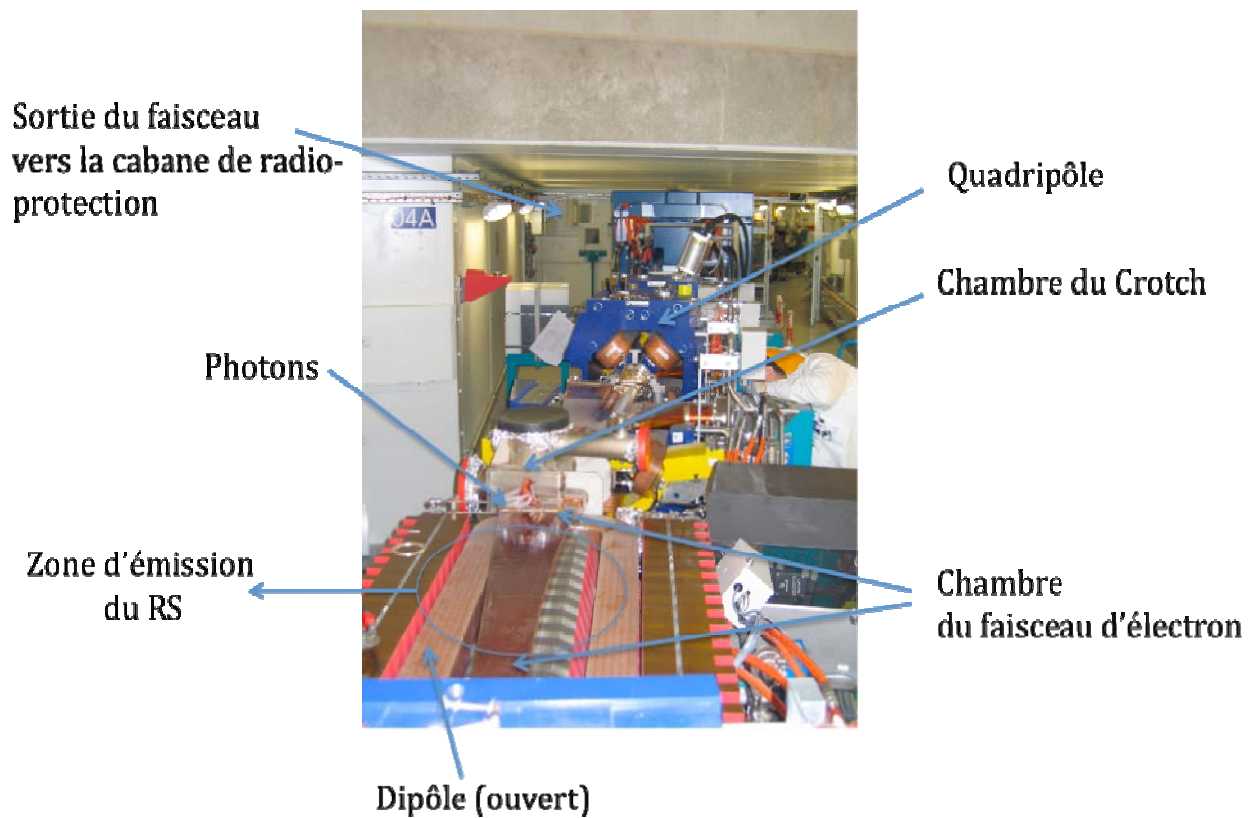
DISCO (*Dichroism, Imaging and Mass Spectrometry for Chemistry and biOlogy*) est une ligne de lumière couvrant le domaine VUV jusqu'au visible. C'est une ligne sur aimant de courbure partagée entre trois stations expérimentales ; une station de dichroïsme circulaire, une station d'imagerie confocale dans l'UV-Visible et une station de phototisation à pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse. Les caractéristiques optiques de la ligne ont été choisies de façon à satisfaire au mieux les besoins des trois expériences. Le *tableau 2* résume quelques caractéristiques de la ligne.

*Tableau 2* : Caractéristiques spectrales des différentes branches de la ligne DISCO

	Dichroïsme circulaire	Spectrométrie de masse	Imagerie confocale
Domaine spectral	2-10 eV 600-120 nm	<b>5-20 eV</b> <b>250-60 nm</b>	1-6 eV 1000-200 nm
Résolution spectrale	0.1-1%	<b>0.1-1%</b>	0.5-2%
Spécificités	Polarisé circulairement et horizontalement	<b>Pompage différentiel</b>	Time structure

#### III.2 Aimant et tête de ligne

DISCO récupère 40 mrad de l'émission d'un dipôle qui dévie le faisceau de 11,25°.

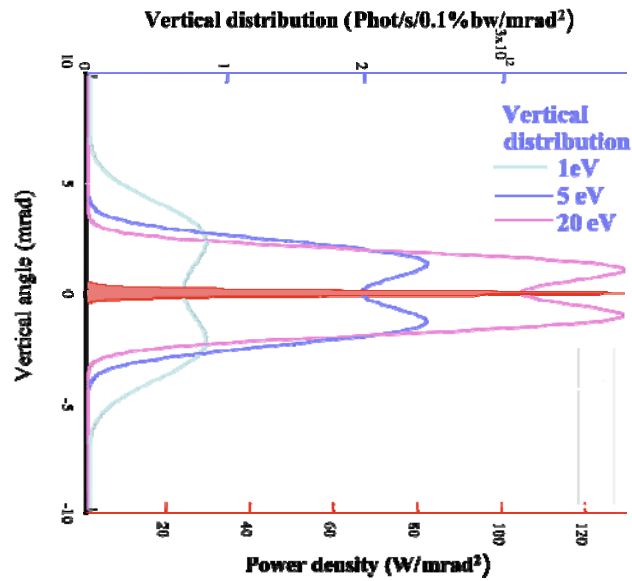


**Figure 5** : Photographie de la tête de ligne

Le crotch est un absorbeur refroidi situé à la sortie de la chambre dipôle qui permet de définir la portion du faisceau qui est prélevée. Dans notre cas, le crotch laisse passer 40 mrad en horizontal par 10 mrad en vertical.

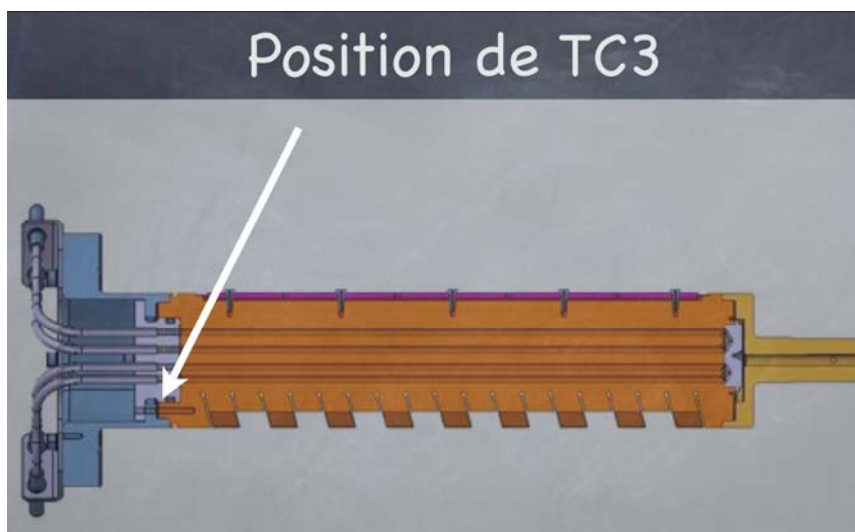
La densité de puissance émise par un dipôle dans le plan vertical est donnée à la **figure 6**. Cette densité montre deux maximums situés symétriquement par rapport au plan horizontal. La position de ces maximums se rapproche du centre de la nappe lorsque l'énergie des photons augmente.





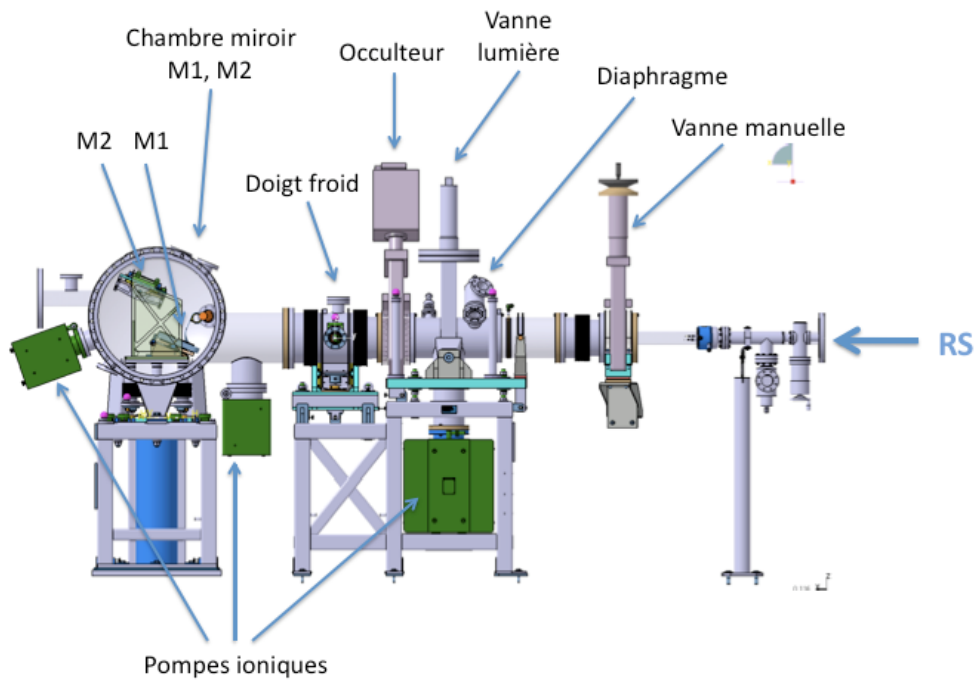
**Figure 6** : Densités de puissance émise par le dipôle de DISCO en fonction de l’angle vertical calculées pour trois énergies de photons

Les trois stations expérimentales de DISCO utilisent le rayonnement entre 1 et 20 eV. La portion du spectre située à plus haute énergie qui contient les rayonnements X n’est pas désirée. De plus, ces rayonnements sont énergétiques et occasionnent un échauffement important pour les premiers éléments d’optiques. Il a donc été décidé de se débarrasser du centre de la nappe au moyen d’un absorbeur, appelé doigt froid dans la suite. Cet élément, représenté à la **figure 7**, est placé au centre de la nappe ; il divise donc le faisceau de la ligne en deux nappes séparées par l’ombre du doigt froid.



**Figure 7** : Absorbeur doigt froid. La position d’un thermocouple mesurant la température est indiquée.

La disposition des premiers éléments de la tête de ligne est reprise à la **figure 8**. Suivant le trajet de la lumière on trouve une vanne manuelle, organe de sécurité vide pour éviter toute ouverture accidentelle. Le faisceau issu du crotch est redéfini par un diaphragme refroidit. Une vanne pilotable, appelée vanne lumière, permet de sectionner le vide. L'occulteur est un élément mobile qui permet d'intercepter le faisceau en cas d'augmentation de température sur l'un des éléments en aval.



**Figure 8** : Disposition des premiers éléments de la tête de ligne de DISCO

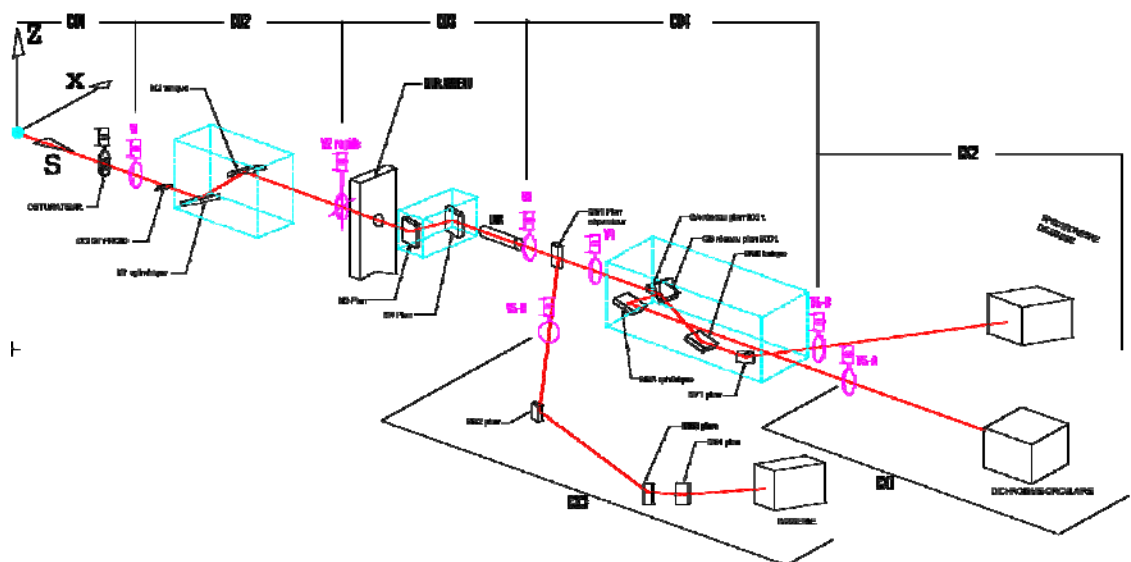
Le doigt froid est placé dans une chambre après l'occulteur et avant les deux premiers miroirs M1 et M2. Les éléments optiques seront détaillés un peu plus tard.

La tête de ligne se termine par une ligne à retard acoustique (LARA) qui est un dispositif de sécurité pour le vide. En cas de remontée de pression brusque causée par une fuite, la LARA a pour but de retarder la propagation de l'onde de choc pour permettre à la vanne lumière de se fermer avant l'arrivée de cette onde et donc de préserver l'anneau de stockage. Enfin, un piège à rayon gamma, élément de sécurité de radio protection, est placé juste avant le mur.

Le mur de l'anneau marque la fin de la tête de ligne et le début de la ligne de lumière.

### III.3 L'optique

L'ensemble des éléments optique de DISCO (*figure 9*) permet de transférer le rayonnement synchrotron aux différentes expériences. Les caractéristiques des différents miroirs sont rassemblées au *tableau 3*.



*Figure 9* : Schéma optique de la ligne de lumière DISCO

*Tableau 3* : Caractéristiques des éléments d'optique de la ligne

Imag se rapporte à la branche d'imagerie, CD à la branche de CD, MS à la branche de spectrométrie de masse et Comm désigne les éléments communs.

Elément	Branche	Caratéristiques
M1	Comm	Cylindrique convexe ; rasance : $22.5^\circ$ ; $R = -100$ m ; dimension 180 x 320 (écl : 160x300)
M2	Comm	Torique ; rasance $22.5^\circ$ ; $R = 22$ m, $r = 2.62$ m ; dimension 180 x 330 (écl : 160x310)
M3	Comm	Cylindrique, rasance $22.5^\circ$ ; $R = 9.7$ m ; dimension 300 x 30 (écl : 280x12)
M4	Comm	Plan ; rasance : $22.5^\circ$ ; dimension 300 x 30 (écl : 280x10)
M51	Imag	Sphérique convexe ; rasance $22.5^\circ$ ; $R = -15$ m, dimension 30 x 20 (écl : 20x7)

M52	Imag	Cylindrique ; rasance $20.4^\circ$ ; $r = 0.84$ m ; dimension 20 x 10 (écl : 30x20)
M53	Imag	Torique ; rasance $22.5^\circ$ ; $R = 4.87$ m $r = 0.716$ m ; 160 x 80 (écl : 140x60)
M54	Imag	Torique ; rasance $22.5^\circ$ ; $R = 9.93$ m $r = 1.42$ m ; 150 x 80 (écl : 130x60)
GA	CD	Réseau Plan 400t 100nm/350nm ; rasance $75^\circ$ ; dimension 60 x 80 (écl : 50x70)
M6A	CD	Torique ; rasance : $75^\circ$ ; $R = 7.82$ m $r = 5.74$ m ; dimension 60 x 90 (écl : 50 x 74)
GB	MS	Réseau Plan 300t 60nm/300nm ; rasant en sortie ; rasance $15^\circ$ ; dimension 180 x 80 (écl : 160x70)
M6B	MS	Torique ; rasance : $15^\circ$ ; $R = 38.2$ m $r = 1.88$ m ; dimension 180 x 90 (écl : 160 x 75)
M7	MS	Cylindrique, rasance $11^\circ$ ; $R = 37.3$ m ; dimension 520 x 50 (écl : 500x40)

Les miroirs et réseaux ont été séparés en deux groupes principaux : les éléments communs aux trois stations et les éléments propres aux stations. Les caractéristiques des éléments communs doivent convenir aux trois applications. En revanche, les éléments propres sont choisis en fonctions des besoins des stations à qui ils sont dédiés.

La suite de la description de la ligne sera focalisée sur les optiques concernant la branche de spectrométrie de masse. Les couples de miroirs M1-M2 et M3-M4 sont des éléments imposés par la radioprotection. Concernant les miroirs M1-M2, ils dévient le faisceau verticalement pour sortir du plan du Brehmstrahlung. Les couples M3-M4 dévient le faisceau horizontalement hors de l'axe de l'émission. L'ensemble M3-M4 est placé dans une cabane blindée en plomb et appelée « cabane de radioprotection ». Une fois hors de la cabane de radioprotection, il n'y a plus de risque et plus aucun blindage n'est nécessaire.

Le faisceau est alors envoyé sur le monochromateur qui est composé d'un miroir torique M6B qui focalise le faisceau sur un réseau plan GB de 300 traits/mm. Le rôle de cet élément est de rendre monochromatique le rayonnement synchrotron par une dispersion des

différentes longueurs d'ondes sur la fente de sortie (non représentée à la *figure 9*). Le domaine de longueur d'onde du monochromateur va de 400 nm à 60 nm.

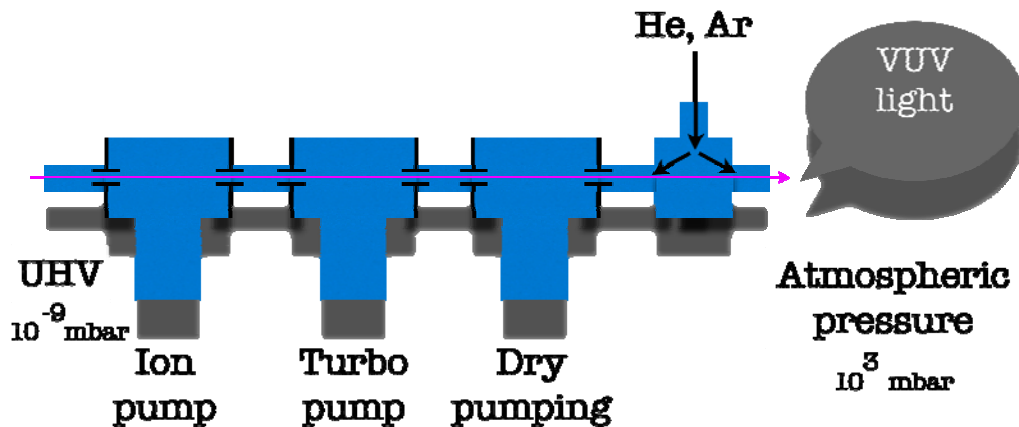
### III.4 Le vide

Le vide qui règne dans l'anneau de stockage est un ultra-haut vide (UHV) de l'ordre de  $10^{-10}$  mbar. En effet, la conservation des électrons le plus longtemps possible sur une orbite stable nécessite d'avoir le moins possible de gaz résiduel dans l'anneau.

De même, la ligne de lumière, y compris la tête de ligne, est sous UHV. En effet, le rayonnement ultra-violet et notamment la portion appelée ultra-violet du vide (VUV) au dessus de 110 nm (*cut off* du LiF) est absorbée par tous les matériaux. Il n'existe donc pas de fenêtre étanche au vide mais transparente aux UV que l'on pourrait utiliser pour isoler l'anneau de la ligne. La ligne DISCO est donc entièrement sous vide. Le vide est assuré par des pompes ioniques réparties tout au long de la ligne. Des vannes secteurs permettent d'isoler différents secteurs de la ligne, pour permettre d'intervenir sur une zone tout en conservant le reste de la ligne sous vide. Chaque secteur a été prévu par des groupes de pompage mobiles comprenant une pompe turbomoléculaire (et son pompage primaire) jusqu'à l'obtention d'un vide assez bon pour pouvoir mettre en marche les pompes ioniques. Tout au long de la ligne, le vide est enregistré par des jauges ioniques.

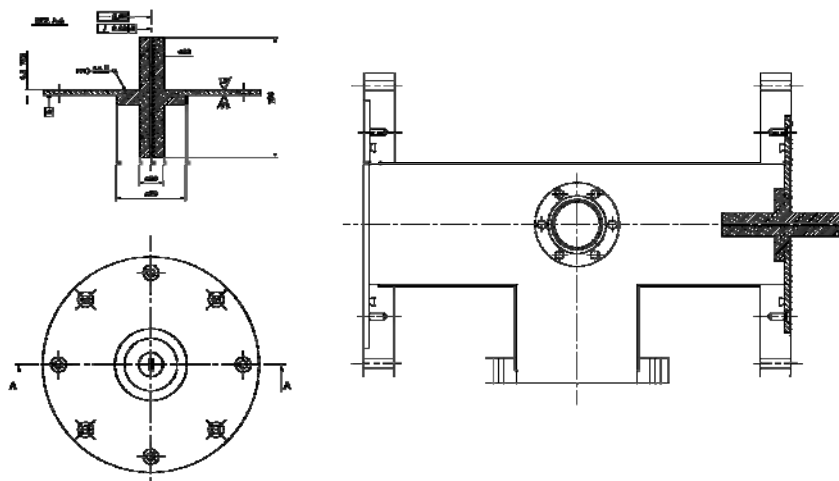
#### III.4.1 Le pompage différentiel

La branche de spectrométrie de masse utilise une portion du spectre qui va au delà de la limite de transparence du LiF. Ainsi, pour atteindre les 60 nm, il est nécessaire de prévoir un pompage différentiel permettant de relier la pression atmosphérique (1013 mbar) de la source et l'ultra haut vide de la ligne ( $10^{-9}$  mbar), soit 12 ordres de grandeurs de pression. Mais l'air de l'atmosphère absorbe fortement les UV. Il n'est donc nécessaire de délivrer les photons dans un flux de gaz rare, seul gaz transparents aux UV. Le schéma de principe du pompage différentiel de DISCO est représenté à la *figure 10*.



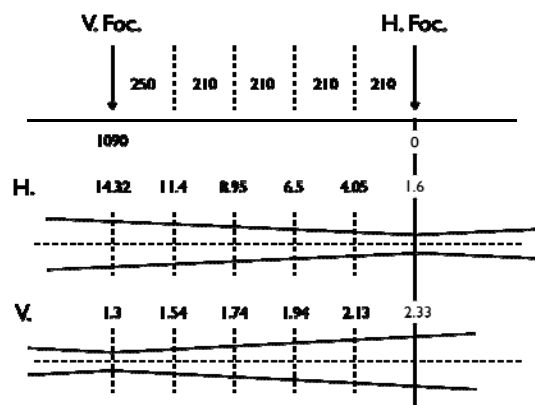
*Figure 10* : Schéma de principe du pompage différentiel de DISCO

Le pompage différentiel est composé de quatre cellules sur lesquelles sont montées un système de pompage et une jauge. A l'entrée et à la sortie de chaque cellule on trouve une plaque, soit percée d'un trou, soit portant un tube, qui permet de réduire la conductance entre les cellules. La *figure 11* présente les chambres et une plaque portant un tube. Les chambres font 210 mm de long.



*Figure 11* : Cellules du pompage différentiel

Le pompage différentiel subit la double contrainte d'assurer le différentiel de pression dont on a parlé mais aussi de se plier aux dimensions du faisceau de lumière qui doit le traverser. Les dimensions du faisceau sont données à la *figure 12*.



**Figure 12** : Dimension du faisceau dans le pompage différentiel

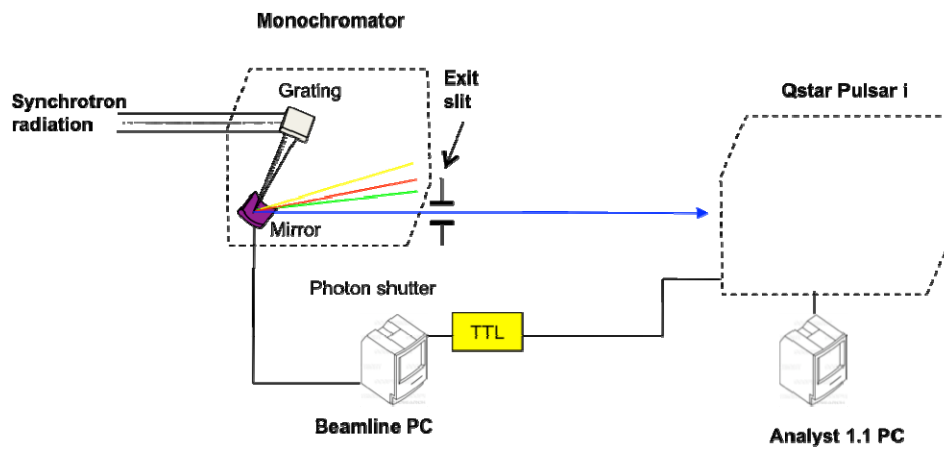
Les distances sont données en millimètre par rapport à l'orifice de sortie. Le faisceau possède un point focal dans les deux directions horizontale et verticale. L'orifice d'entrée du pompage est évidemment placé à la focale horizontale. Les fentes de sortie du monochromateur sont placées à la focale verticale.

### III.5 Synchronisation QStar/monochromateur

Une source accordable a l'avantage sur une source de raie de permettre de pouvoir balayer la longueur d'onde. Le défilement des longueurs d'onde sur la fente de sortie est assuré par la rotation du réseau GB du monochromateur. Un moteur électrique continu assure le déplacement de GB.

La possibilité d'un balayage continu du monochromateur durant une acquisition chromatographique est apparu particulièrement intéressante. Cela offrirait des possibilités de LC/MS résolues en longueur d'onde.

Pour cela il est nécessaire de pouvoir synchroniser le balayage en longueur d'onde et l'acquisition des spectres de masse. Le QStar est piloté par la version 1.1 d'Analyst QS (Applied Biosystems/Sciex). Le monochromateur est piloté par des logiciels développés en interne au synchrotron SOLEIL. L'architecture retenue pour la synchronisation est schématisée à la **figure 13**. Un PC de la ligne DISCO lit l'état du QStar sur la prise auxiliaire de la machine. Cette prise permet aussi l'envoi d'une information de type START par un signal TTL.



**Figure 13** : Principe de l'architecture retenue pour la synchronisation de système de contrôle commande de DISCO avec le logiciel Analyst 1.1 (Applied Biosystems/Sciex)



## REFERENCES IV

### $\mathcal{B}$

[Baldwin, 1975] G.C. Baldwin, Origin of synchrotron radiation, *Phys. Today*, 28, 1975, 9

### $\mathcal{K}$

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

### $\mathcal{L}$

[Linéard, 1889] A. Liénard, Champ électrique et champ magnétique produits par une charge en un point et animée d'un mouvement quelconque, *L'éclairage électrique*, 16, 1889, 5

# *Troisième partie*

## *Résultats & Discussion*

*Chapitre 5 :*  
*Etude d'acides nucléiques*

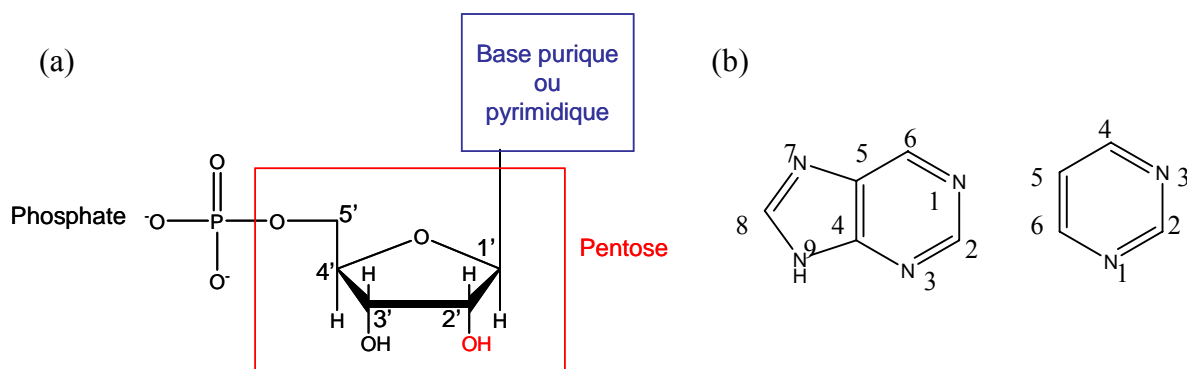
## CHAPITRE 5 : Etude d'acides nucléiques

### I. INTRODUCTION GENERALE

#### I.1 Généralités sur les acides nucléiques

Les **nucléotides** sont composés de trois parties : (i) une base azotée, (ii) un pentose et (iii) un phosphate (**Figure 1a**). Les bases azotées (appelées aussi **nucléobases**) sont des dérivés de deux composés pyrimidine et purine (**Figure 1b**). La base est liée (au N-1 des pyrimidines et au N-9 des purines) par une liaison *N*-glycosilique sur le carbone 1' du pentose, et le phosphate estérifie le carbone 5' ou 3' pour donner respectivement, un 3'-nucléotide ou 5'-nucléotide. En absence de groupe phosphate, on parle de **nucléoside**.

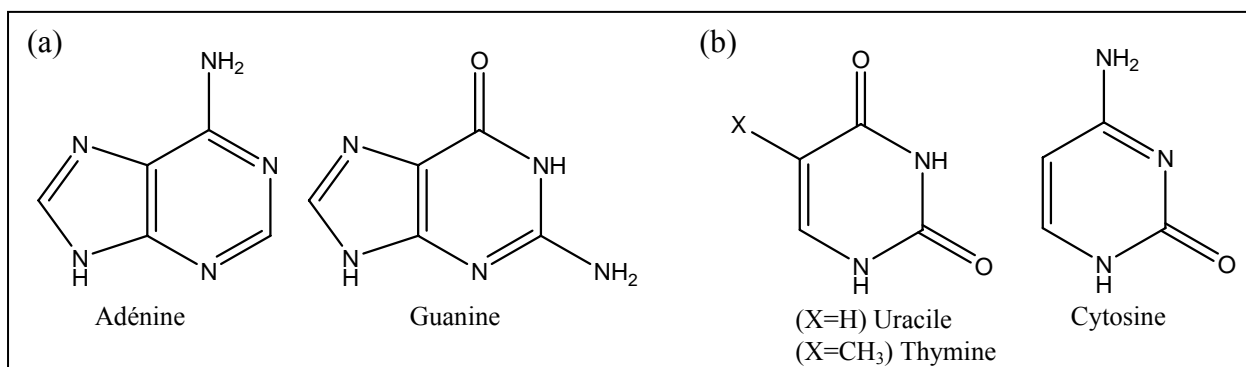
Deux types de pentose sont présents dans les acides nucléiques : du 2'-désoxy-D-ribose pour les unités de désoxyribonucléotides de l'ADN et du D-ribose pour les unités ribonucléotidiques de l'ARN (acide ribonucléique).



**Figure 1 :** (a) La structure présentée ici est celle d'un ribonucléotide. Dans les désoxyribonucléotides, le groupement **OH** sur le carbone 2' est remplacé par **H**. (b) Les composés parentaux des bases pyrimidiques et puriques des nucléotides et des acides nucléiques, indiquant les conventions de numérotation pour les structures du noyau.

*Noter que les systèmes de numérotation des atomes des cycles de type purine et pyrimidine sont différents et que les chiffres suivis du signe « prime » se réfèrent aux atomes de carbone du résidu ribose alors que les chiffres sans ce signe se réfèrent aux atomes de la base azotée.*

L'ADN et l'ARN contiennent tous deux des bases puriques communes, l'adénine et la guanine, et deux bases pyrimidiques dont la cytosine (**Figure 2b**). L'unique différence entre les bases de l'ADN et de l'ARN repose sur la nature de la seconde base pyrimidique ; avec la thymine pour l'ADN et l'uracile pour l'ARN (**Figure 2b**).

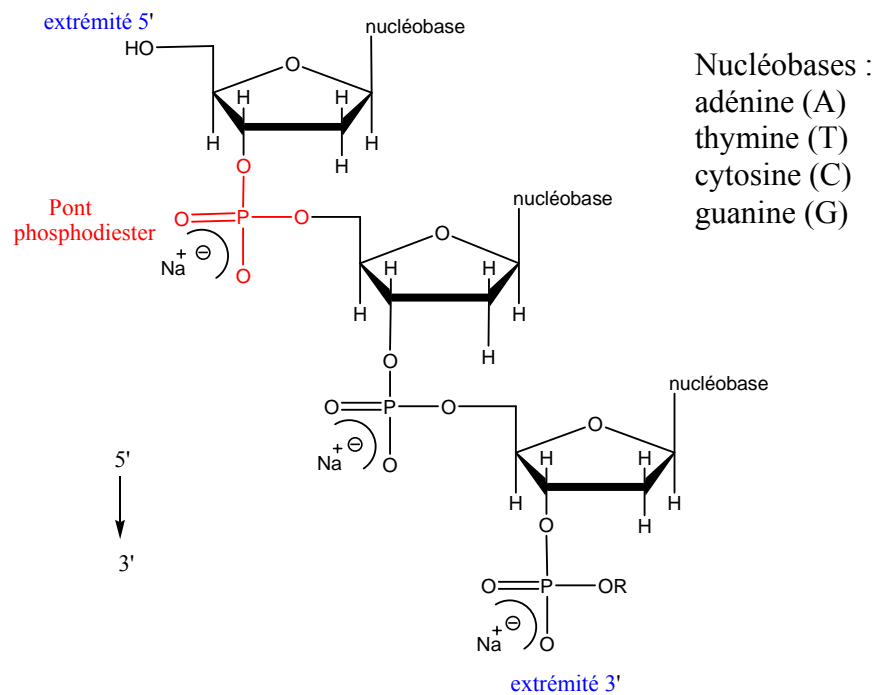


**Figure 2** : Principales bases (a) puriques et (b) pyrimidiques des acides nucléiques

**Tableau 1** : Noms et abréviations des nucléobases, nucléosides et nucléotides

Nucléobase	Nucléoside	Nucléotide	Acide nucléique
<b>Purines</b>			
Adénine (Ade)	Adénosine (A) Désoxyadénosine (dA)	Adénosine monophosphate (AMP) Désoxyadénosine monophosphate (dAMP)	ARN ADN
Guanine (Gua)	Guanosine (G) Désoxyguanosine (dG)	Guanosine monophosphate (GMP) Désoxyguanosine monophosphate (dGMP)	ARN ADN
<b>Pyrimidines</b>			
Cytosine (Cyt)	Cytidine (C) Désoxycytidine (dC)	Cytidine monophosphate (CMP) Désoxycytidine monophosphate (dCMP)	ARN ADN
Thymine (Thy)	Thymidine ou Désoxythymine	Thymidine monophosphate (TMP) ou Désoxythymidine monophosphate (dTMP)	ADN
Uracile (Ura)	Uridine (U)	Uridine monophosphate (UMP)	ARN

Un enchaînement d'unités nucléotidiques, liées entre elles par des ponts phosphodiester, permet de former un simple brin d'ADN, souvent appelé oligonucléotide (**Figure 3**). Les squelettes covalents des acides nucléiques sont donc formés d'une alternance de résidus phosphate et pentose, et les bases caractéristiques peuvent être considérées comme des groupements latéraux unis au squelette à intervalles réguliers. Notons aussi que les squelettes de l'ARN et l'ADN sont hydrophiles. Les groupements hydroxyles des résidus de sucre forment des liaisons hydrogène avec l'eau et les groupements phosphates dans le squelette polaire possédant des pKa proches. Ainsi, ils sont complètement ionisés et chargés négativement à pH 7, de ce fait l'ADN est un acide. Ces charges négatives sont habituellement neutralisées par des interactions ioniques avec les charges positives de protéines, d'ions métalliques et de polyamines. La notation couramment utilisée pour nommer un tel brin d'ADN est dpApGpTpC (ou encore la notation plus simplifiée dp(AGTC)). Le « d » signifie que le sucre est déshydroxylé en position 2', et le « p » désigne la présence d'un groupement phosphate. Les enchaînements sont toujours écrits dans le sens 5' vers 3'.

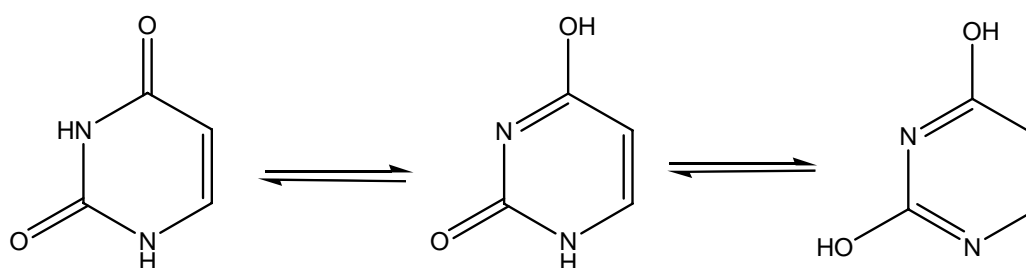


**Figure 3** : Exemple d'un brin d'ADN correspond à l'association de plusieurs déoxyribonucéotides

## I.2 Propriétés physico-chimiques des bases nucléiques

Les purines et pyrimidines sont des molécules fortement conjuguées, dont les effets sont importants sur la structure et la distribution électronique. La résonance de nombreux atomes du noyau donne à la plupart des liaisons le caractère partiel d'une double liaison. Il en résulte que les pyrimidines sont des molécules planes alors que les purines le sont presque [Saenger, 1984].

Les bases puriques et pyrimidiques libres peuvent exister sous deux ou plusieurs formes tautomériques selon le pH. L'uracile, par exemple, existe sous forme lactame (forme céto), lactime (forme éno) et double lactime (*Figure 4*).



*Figure 4* : Les formes tautomériques de l'uracile

Les structures des purines et pyrimidines, montrées dans la *Figure 2*, sont les tautomères qui prédominent à pH 7. Des valeurs de pKa sont reportées dans le *Tableau 2* pour les nucléosides.

*Tableau 2* : Valeurs des pKa des nucléosides. Ces valeurs sont obtenues à 20°C et en absence de sels. Elles correspondent à une perte de proton pour un pKa > 9 et à une capture de proton pour un pKa < 5 d'après [Saenger, 1984]

Nucléosides	Site de protonation	Site de déprotonation	Valeur de pKa
Adénosine	N1		3.8 ± 0.3
Cytidine	N3		4.1 ± 0.1
Guanosine	N7	N1	2.0 ± 0.1 9.1 ± 0.1
Thymidine		N3	9.8 ± 0.2
Uridine		N3	9.5 ± 0.1

Il est clair qu'à pH voisin du pH physiologique (pH compris entre 5 et 9), les bases puriques et pyrimidiques ne portent aucune charge. Les acides nucléiques dans une solution dont le pH est voisin du pH physiologique sont des polymères chargés négativement, charges dont la contribution est uniquement due aux groupements phosphates. En solution, les acides nucléiques sont donc fortement dissociés à pH physiologique avec une charge nette de -2 sur chaque groupement phosphodiester en raison de leur forte acidité.

A partir de ces rappels, nous pouvons étudier les propriétés physico-chimiques en phase gazeuse des constituants de l'ADN avant de passer à l'étude d'oligomères.

## II. ETUDE DE BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES EN APPI

### II.1 Conditions expérimentales

Toutes les expériences réalisées dans ce mémoire ont été effectuées avec la source Photospray™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cette source est montée avec une lampe Krypton PKS 106 (Cathodeon, Cambridge, UK) générant un flux continu de photons à 10 eV avec une contribution mineure à 10,6 eV (*cf.* spectre d'émission de la lampe dans le chapitre 3).

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

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

Les bases nucléiques utilisées au cours de cette étude ont été gracieusement fournies par le Dr Pascale Clivio (FRE CNRS 2715, Reims, France). Les bases ont été dissoutes dans l'eau ou dans du méthanol puis injectées en mode FIA. Les paramètres instrumentaux utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le *tableau 3*.



**Tableau 3** : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse des bases nucléiques

Quantité injectée :	20 $\mu\text{L}$ à $10^{-4}$ mol.L <sup>-1</sup>
Solvant LC :	H <sub>2</sub> O ou MeOH à 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Dopants :	Anisole, Toluène ou Acétone

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

Comme on peut le voir sur ce tableau, les paramètres instrumentaux du spectromètre de masse ont été ajustés de telle façon à obtenir un rapport signal/bruit satisfaisant tout en évitant de faire du CID en source.

## II.2 Photoionisation en absence de dopant : Photoionisation directe

Les spectres de masse des différentes bases nucléiques enregistrés à 400 °C en éteignant la lampe mettent en évidence la présence d'espèces moléculaires intactes protonées et/ou cationisées sans aucune fragmentation (spectres non montrés). Les espèces cationisées observées lorsque la lampe est éteinte sont quand à elles des espèces préformées en solution, qui sont transférées en phase gazeuse par un processus de type *Thermospray* (désolvatation par chauffage d'espèces chargées préformées en solution). Ce phénomène a déjà été décrit par des travaux antérieurs [Cristoni, 2002 et Debois, 2006]. Il apparaît donc que la dégradation thermique de l'échantillon est extrêmement mineure et ne doit pas être prise en compte pour la compréhension des mécanismes proposés.

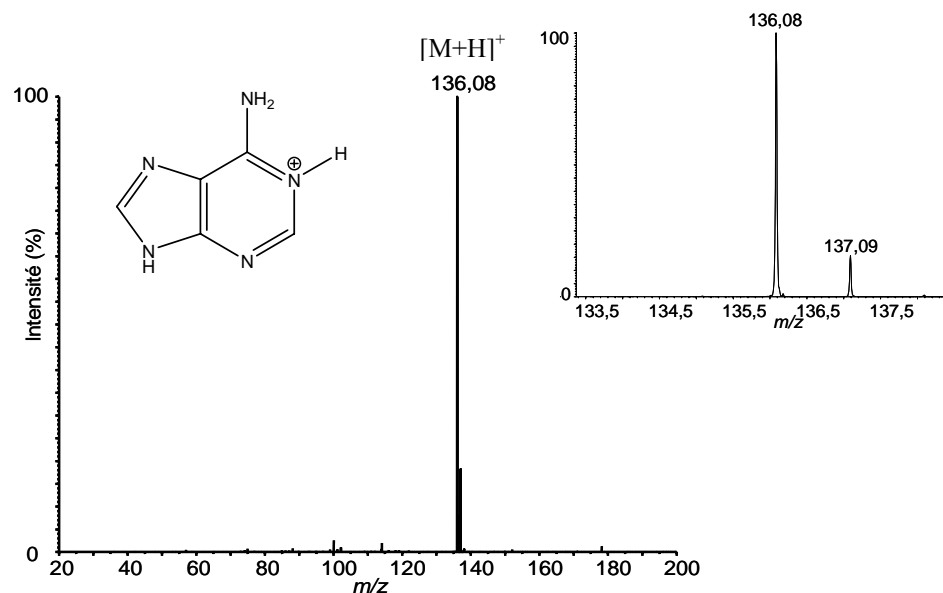
Le **tableau 4** liste quelques données thermochimiques pertinentes pour la suite de ce travail et nécessaires à la compréhension des phénomènes observés.

**Tableau 4** : Energies d'ionisation (EI) et affinités protoniques (AP) des nucléobases et des molécules de dopants. Valeurs obtenues sur le *NIST Webbook* [Linstrom, 2005] à l'exception de l'AP du radical méthoxyphenyl qui a été trouvé d'après [Kauppila, 2004]

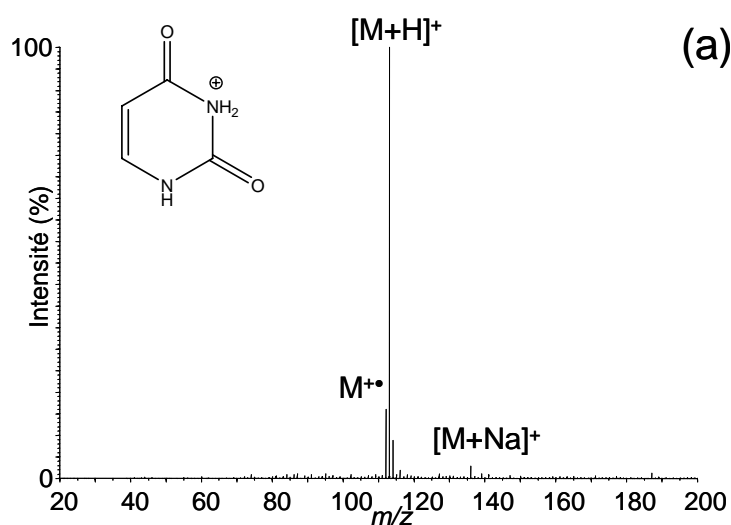
Composés	EI (eV)	AP (kJ/mol)
Guanine	7.8-8.2	959.5
Adénine	8.3-8.9	942.8
Cytosine	8.4-9.0	949.9
Thymine	9.0-9.4	880.9
Uracile	9.2-9.8	872.7
Adénosine		989.3
Cytidine		982.5
Uridine		947.6
Toluène	8.83	
radical benzyle		831.4
Anisole	8.20	
radical méthoxyphenyl		~ 880
Acétone	9.69	
radical 2-oxopropyl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

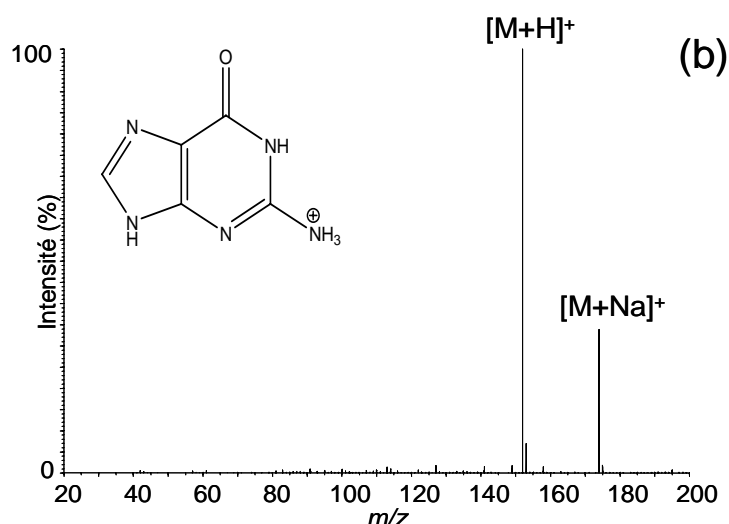
Notons que nous avons reporté sur le **tableau 4** les deux valeurs extrêmes du potentiel d'ionisation de chaque base nucléique. En effet, il n'y a pas de mesure fiable de cette énergie : le NIST [Linstrom, 2005] ne recommande aucune valeur précise de cette énergie. A partir de ces valeurs, on peut s'attendre à ce que toutes les bases soient ionisées sous APPI puisque les valeurs des potentiels d'ionisation sont toutes inférieures à l'énergie des photons délivrés par la lampe (10 eV). Ainsi, le fait d'allumer la lampe peut, dans ce cas, fournir des informations supplémentaires. Lorsque nous allumons la lampe, on s'aperçoit rapidement que le courant ionique total (TIC) augmente brusquement et les intensités absolues des ions observées sont relativement importantes comparées au *Thermospray*. **La figure 5** présente le spectre APPI de l'adénine enregistré dans l'eau à 400°C. Le spectre de masse de l'adénine met en évidence la formation d'une espèce protonée  $[M+H]^+$  relativement intense. Ce phénomène est observé pour toutes les bases nucléiques étudiées ici (cas de la guanine **Figure 6b**) et en désaccord avec les expériences de photoionisation effectuées en milieu dilué où l'on observe

uniquement l'espèce moléculaire  $M^{+}$  [Jochims, 2005]. De plus, on ne détecte que des espèces moléculaires protonées et/ou sodées intactes sans aucun fragment. Dans le cas de l'uracile (**Figure 6a**), cette observation est en accord avec de précédents travaux en photoionisation sur des molécules isolées en phase gazeuse pour lesquelles le seuil d'apparition des fragments a été trouvé égal à 10,95 eV [Jochims, 2005].



**Figure 5** : Spectre APPI de l'adénine enregistré dans l'eau à 400°C





**Figure 6** : Spectres de masse APPI de (a) l'uracile (b) la guanine enregistrés dans l'eau à 400°C

L'uracile présente un comportement distinct des autres bases nucléiques puisqu'on observe la formation de l'ion moléculaire  $M^+$ . La réaction de transfert d'hydrogène doit donc être considérée, dans ce cas, comme compétitive au processus menant aux ions moléculaires (photoionisation directe ou réaction de transfert de charge). Selon Syage [Syage, 2004], l'enthalpie de la réaction de transfert d'atome d'hydrogène peut être exprimée comme suit (voir chapitre 3) :

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

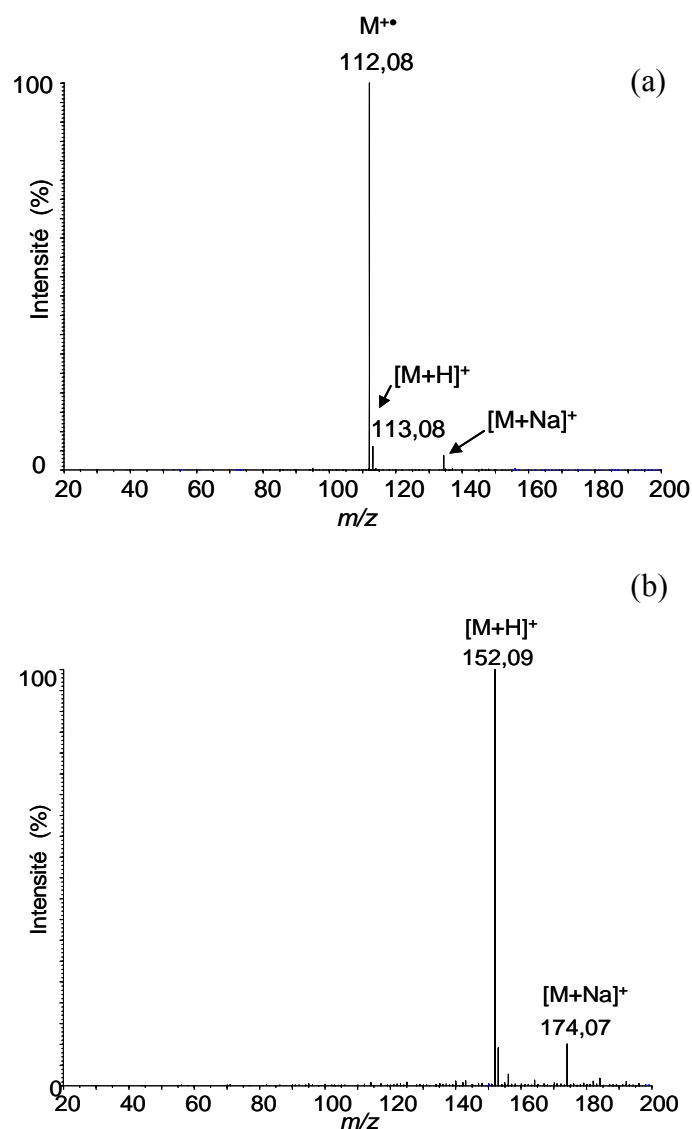
où  $EI(H)$  et  $EI(M)$  sont les énergies d'ionisation respectives de l'atome d'hydrogène et de l'analyte,  $AP(M)$  est l'affinité protonique de l'analyte et  $D_H(S)$  est l'énergie de dissociation de la liaison de l'atome d'hydrogène dans la molécule de solvant. Avec  $IE(H) = 13,6$  eV,  $D_H(H_2O) = 5,16$  eV et  $D_H(MeOH) = 4,08$  eV, on peut calculer l'enthalpie de la réaction ( $\Delta H$ ) pour chaque base nucléique et dans les deux systèmes de solvants étudiés, en tenant compte de la valeur minimale du potentiel d'ionisation des bases. Les résultats obtenus, listés dans le **tableau 5**, sont comparés au rapport des intensités  $M^+/[M+H]^+$  calculés dans les deux systèmes de solvants étudiés.

**Tableau 5** : Valeur de l'enthalpie de réaction de transfert d'hydrogène calculée avec la valeur minimale de l'EI (tableau 4) et rapport des intensités du cation radical moléculaire sur la molécule protonée pour chaque base dans l'eau et dans le méthanol

Bases	$\Delta H_{H_2O}$	$\Delta H_{MeOH}$	$[M^{+\cdot}]/[M+H]^+$ dans	$[M^{+\cdot}]/[M+H]^+$ dans
	(kJ/mol)	(kJ/mol)	H <sub>2</sub> O	MeOH
Guanine	96.3	-7.7	0.01	0.01
Adénine	73.2	-30.8	$2.4 \cdot 10^{-3}$	0
Cytosine	48.2	-55.8	$2.1 \cdot 10^{-4}$	$6.7 \cdot 10^{-5}$
Thymine	46.2	-100.1	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$3.45 \cdot 10^{-3}$
Uracile	48.2	-55.8	0.16	16.6

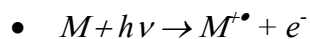
D'après les valeurs obtenues, il apparaît que la réaction de transfert de H est toujours endothermique dans l'eau mais elle devient exothermique dans le méthanol. Selon les valeurs obtenues dans l'eau, la réaction de transfert d'hydrogène serait moins défavorisée énergétiquement pour l'uracile que pour la guanine. Or ce n'est pas ce que l'on observe sur les spectres de masse (**Figure 6**). La **figure 7** présente, quand à elle, les spectres de masse APPI enregistrés dans le méthanol pour ces deux bases. D'après les valeurs des enthalpies calculées dans le méthanol (**Tableau 5**), on devrait s'attendre à avoir une réaction d'arrachement d'un hydrogène favorisée dans le cas de l'uracile, or ce n'est pas le cas.

A partir des valeurs des rapports d'intensités données dans le **tableau 5**, on s'aperçoit que pour chaque nucléobase le cation radical est quasi inexistant dans les deux solvants à l'exception de l'uracile. Ainsi, aucune généralité ne peut être tirée de la comparaison de l'enthalpie calculée et des rapports d'intensité. Un tel désaccord entre les observations et le calcul de l'enthalpie dans l'eau avait déjà été soulevé antérieurement [Syage, 2004]. Bien que les solvants utilisés au cours de cette étude soient très purs (qualité HPLC), on pourrait suggérer une ionisation d'une impureté, présente dans le milieu, suivie d'un transfert de proton vers la base pour expliquer les résultats obtenus.



**Figure 7** : Spectres de masse APPI enregistrés dans le méthanol à 400°C de (a) l'uracile (b) la guanine

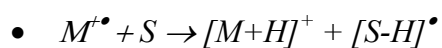
*En résumé, on peut tirer quelques généralités de ces résultats concernant les réactions suivantes :*



→ Composés de faible basicité (uracile vs guanine)

→ Composés (ou solvants) de forte volatilité

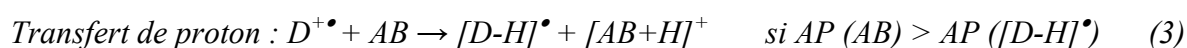
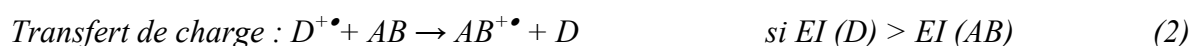
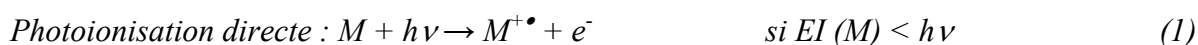
→ Quand l'énergie de solvation de l'analyte est réduite



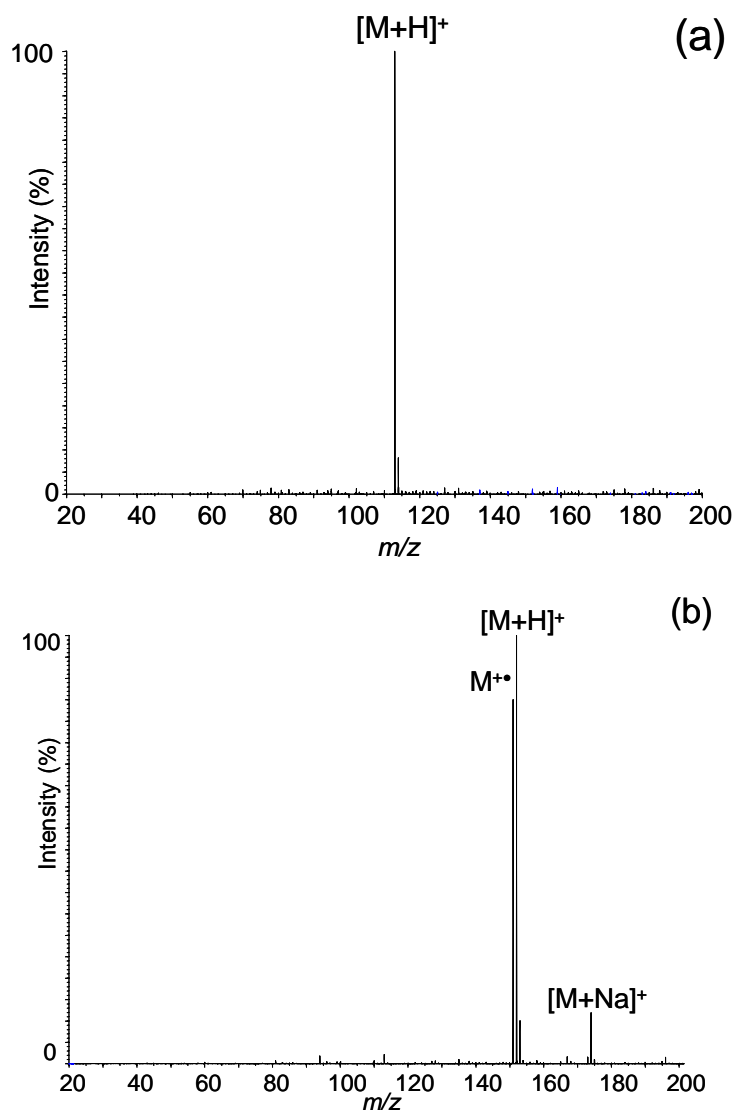
- Bien que thermodynamiquement défavorisée, cette réaction est possible grâce à un équilibre cinétique par l'excès de solvant présent dans la source.
- Cette réaction a lieu au sein de complexes solvatés et non entre espèces isolées en phase gazeuse
- Réaction observée pour tous les composés possédant un site de protonation quelles que soient les conditions expérimentales

### II.3 Photoionisation en présence de dopant : photoionisation assistée

*Rappel :*



L'utilisation d'un dopant fournit des informations complémentaires sur les processus d'ionisation ayant lieu au sein de la source APPI. La **figure 8** présente le spectre de masse de l'uracile et de la guanine en présence d'anisole à 0,5 µL/min (**Figures 8a et 8b**). On note que la situation est complètement inversée par rapport aux spectres précédents. En effet, on détecte l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  de la guanine qui est très intense alors que l'uracile est détecté uniquement sous sa forme protonée. Les spectres de masse en condition assistée des autres bases sont similaires à celui enregistré pour l'uracile (**Figure 8a**) sans aucun ion moléculaire ni d'ions fragments.



**Figure 8** : Spectres de masse APPI enregistrés à 400°C en présence d'anisole dans le cas de (a) l'uracile et (b) la guanine

D'après le **tableau 4**, on s'aperçoit que l'affinité protonique des espèces  $[D-H]^+$  formées à partir du dopant est inférieure à celle des nucléobases justifiant ainsi la protonation facile sous conditions assistées par dopant (DA-APPI). Le cas de la guanine est particulièrement intéressant dans la mesure où cette base possède l'affinité protonique la plus élevée (ce qui serait en faveur de la réaction de protonation, équation 1) et la plus basse énergie d'ionisation (ce qui pourrait induire des réactions de transfert de charge efficaces, équation 2).



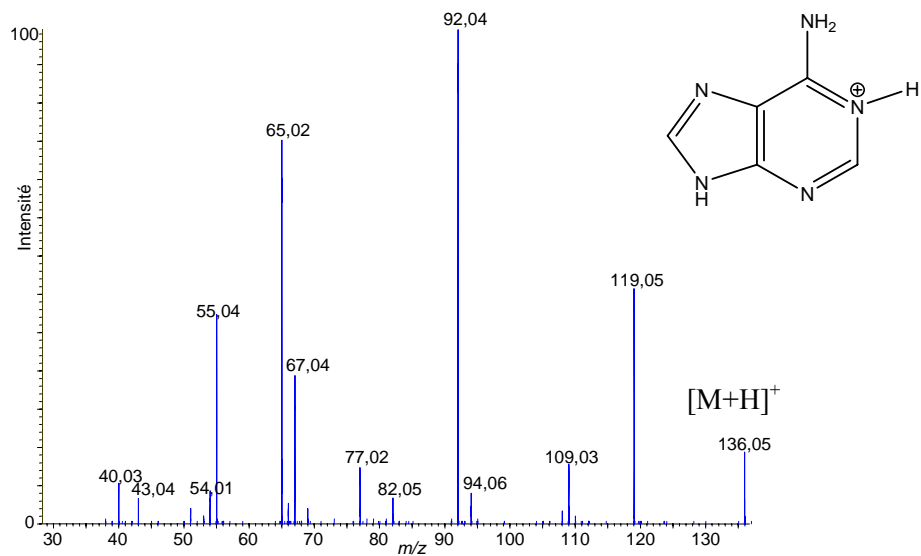
Il est important de souligner que la guanine est la seule molécule pour laquelle l'énergie d'ionisation est inférieure à celle de l'anisole (**Tableau 4**). En accord avec les énergies respectives d'ionisation de la guanine et de l'anisole, la réaction de transfert de charge peut donc avoir lieu avec ce dopant, comme observé sur le spectre de la **figure 8b**. Cette condition n'est pas remplie pour les autres bases nucléiques.

Ce résultat nous permet de comprendre l'origine du cation radical qui est observé pour l'uracile en absence de dopant (**figure 6a**). La comparaison des spectres de masse de ce composé (**figures 6a et 8a**), démontre clairement que l'espèce moléculaire  $M^{+\bullet}$  est formée par photoabsorption (**figure 6a**, équation 1). Ce processus ne peut pas être observé lorsqu'un dopant est introduit dans la source puisque la photoionisation du dopant serait plus probable que celle de l'analyte.

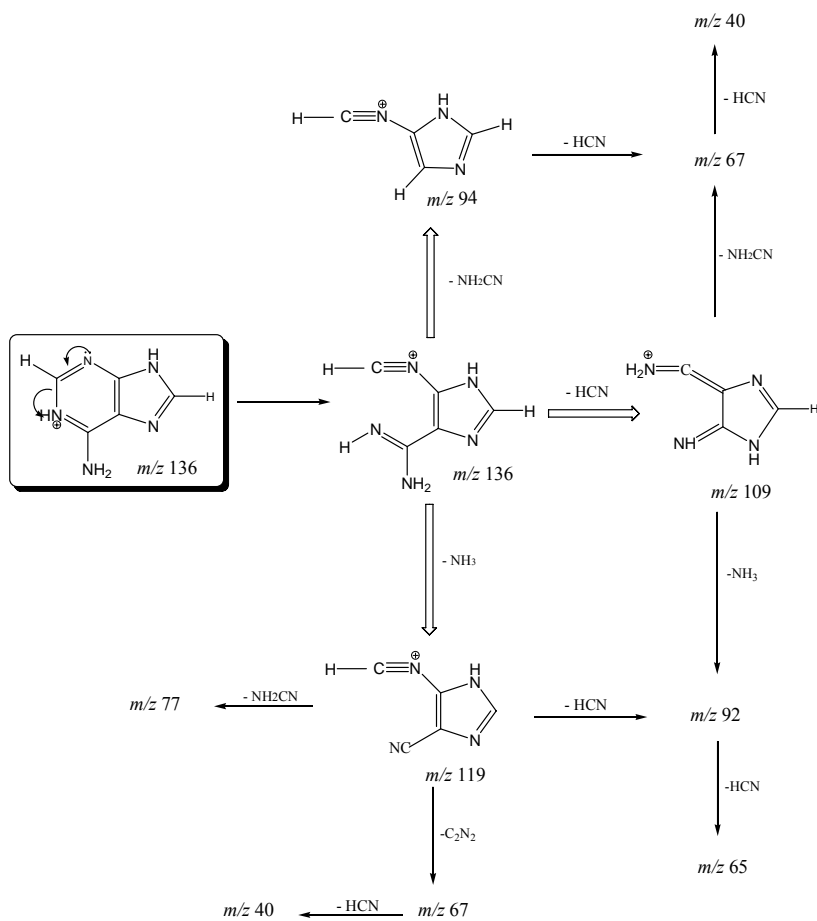
Toutes ces observations confirment notre affirmation que la photoionisation directe de l'analyte peut être négligée en photoionisation assistée dans une source Photospray™. Selon la valeur des affinités protoniques et des énergies d'ionisation du dopant et des molécules d'analyte, leur interaction conduit soit à un échange de charge, soit à des transferts de H soit aux deux.

#### II.4 Expériences de dissociations induites par collision

Plusieurs expériences de dissociation induite par collision (CID) à différentes valeurs d'énergie de collision (CE) ont été réalisées sur les bases nucléiques. Le spectre de la **figure 9** présente celui de l'adénine enregistré pour une énergie de collision de 50 eV. Le spectre CID des ions  $[M+H]^+$  met en évidence la présence d'ions à  $m/z$  119, 92, 65 et 55 majoritairement. Les canaux de fragmentations observés sont expliqués sur la **figure 10** ci-après.

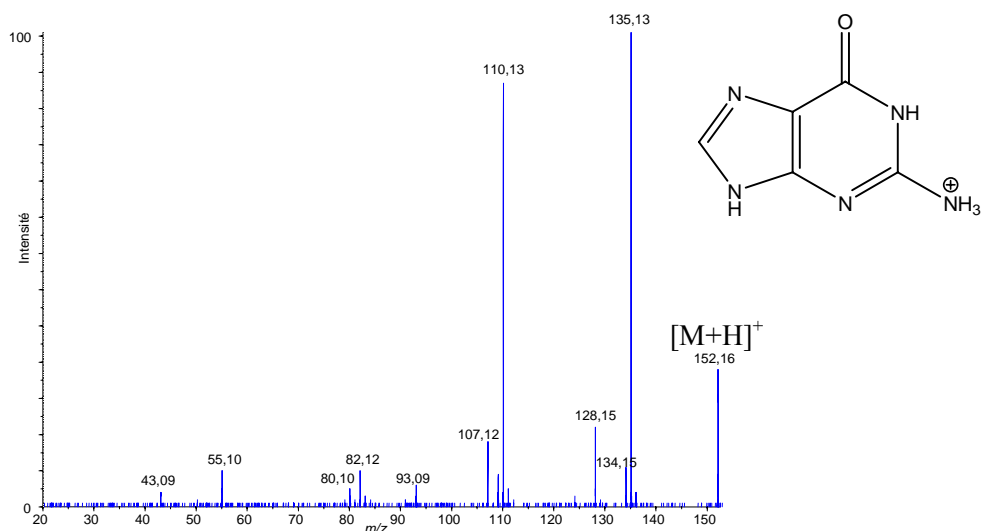


**Figure 9** : Spectre CID de l'adénine avec CE = 50 eV

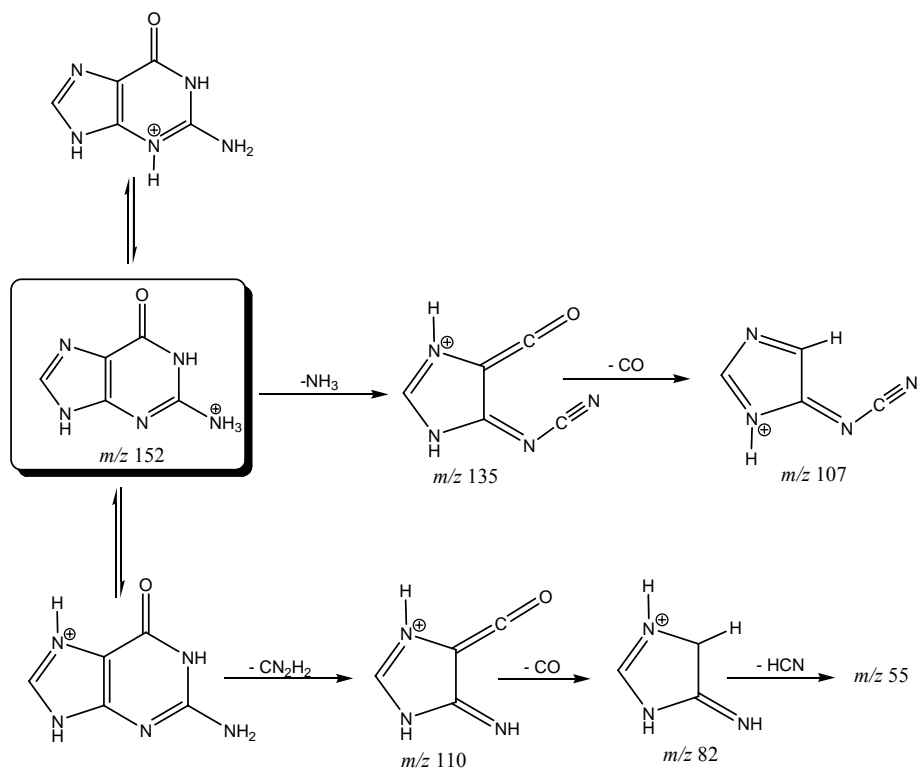


**Figure 10** : Voies de fragmentation observées par dissociation induite par collisions sur l'adénine protonée. Les flèches pleines indiquent les produits de réaction primaires et les produits secondaires sont indiqués par des simples flèches d'après [Nelson, 1992].

Le spectre CID de l'autre base pyrimidique (la guanine) a aussi été enregistré dans les mêmes conditions mais avec une valeur d'énergie de collision de 30 eV. Ce spectre est présenté sur la **figure 11** mettant en évidence de nombreux fragments majoritaires, notamment les ions à  $m/z$  135 et 110 correspondant à une perte d'une molécule d'ammoniac et de cyanamide respectivement (**figure 12**).



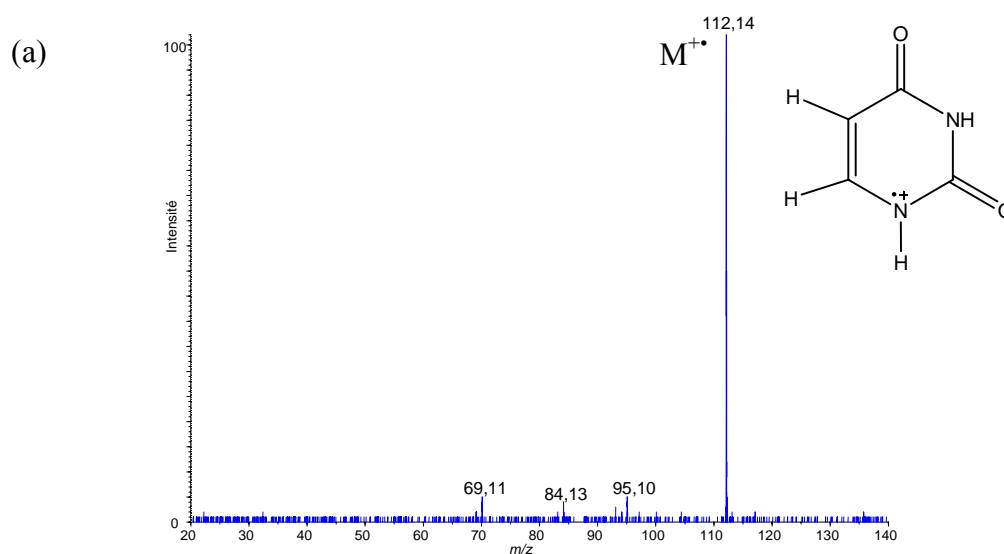
**Figure 11** : Spectre CID de la guanine avec CE = 30 eV



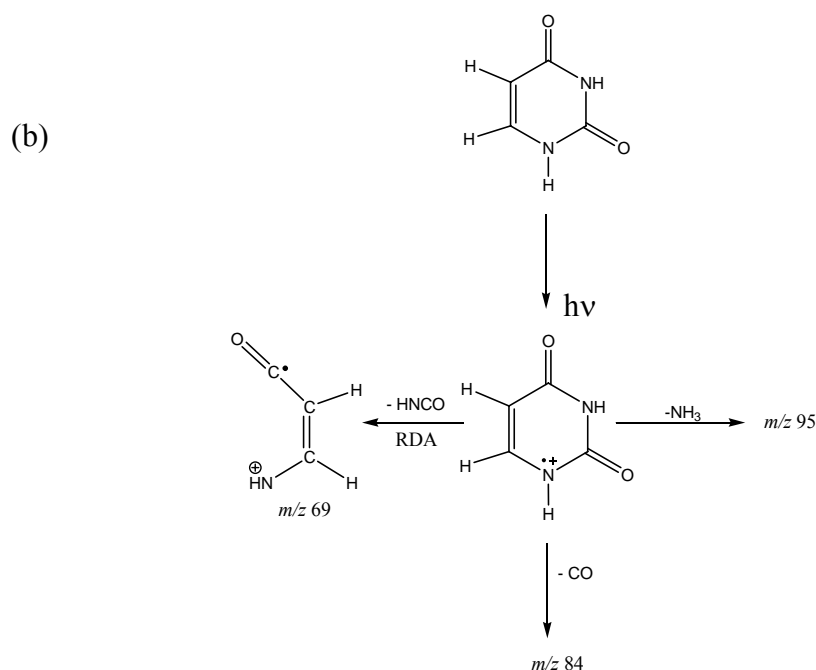
**Figure 12** : Voies de fragmentation observées par dissociation induite par collisions sur la guanine protonée d'après [Qian, 2007]

Ces expériences de spectrométrie de masse tandem sur des bases pyrimidiques permettent de retrouver la quasi-totalité des ions fragments décrits dans la littérature [Jochims, 2005, Nelson, 1992 et Qian, 2007]. D'une manière générale, les ions produits formés par CID en photoionisation proviennent essentiellement de réactions de déamination de ces nucléobases protonées [Qian, 2007].

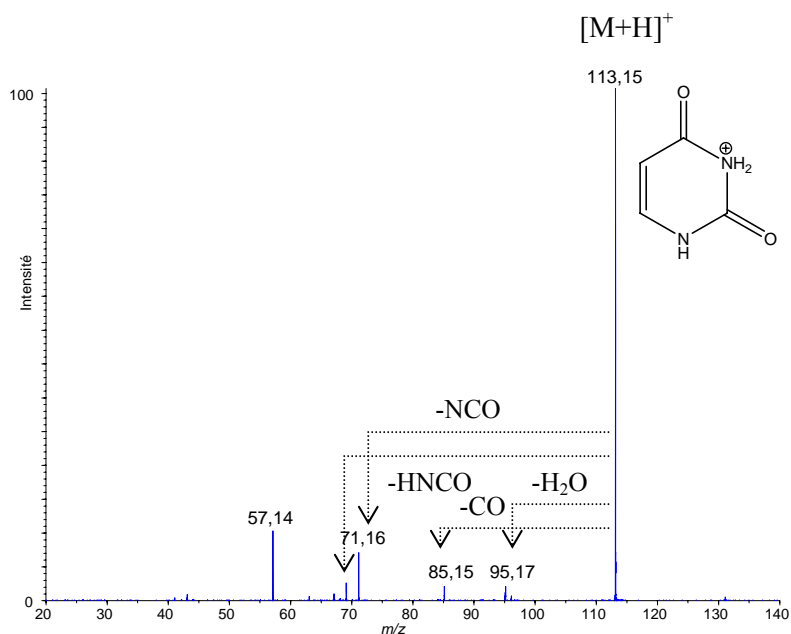
Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'uracile qui présente un comportement distinct par rapport aux autres bases nucléiques. Dans ce but, nous avons enregistré des spectres MS/MS du cation radical et de l'espèce protonée (*Figures 13a et 14*).



**Figure 13a** : Spectre CID du cation radical de l'uracile à CE = 10 eV



**Figure 13b**: Voies de fragmentations observées pour l'espèce radicalaire de l'uracile d'après [Jochims, 2005]



**Figure 14** : Spectre CID de la molécule protonée de l'uracile avec un CE = 10 eV

### III. ETUDE DE RIBO- ET DEOXYNUCLEOSIDES EN APPI-MS

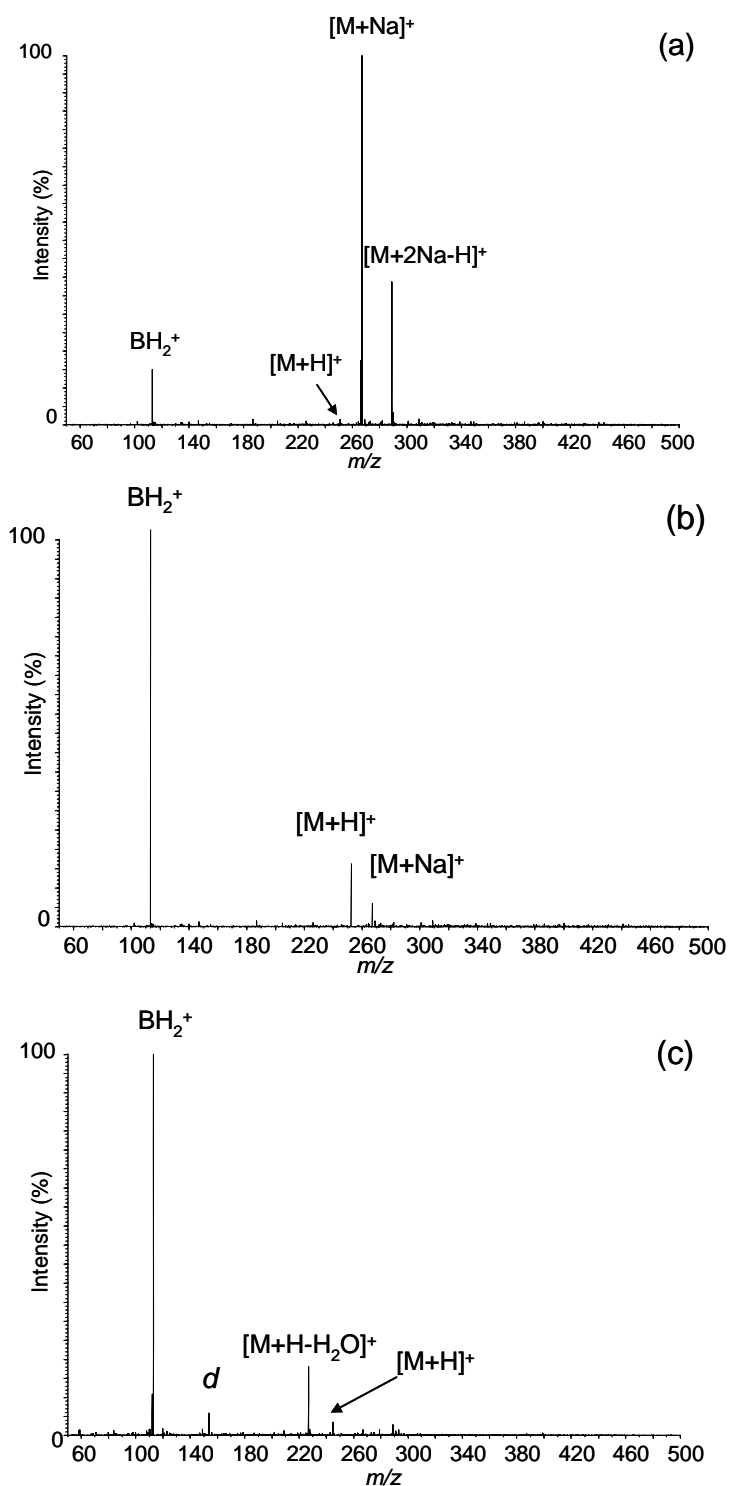
#### III.1 Les ribonucléosides

Les spectres APPI des ribonucléosides (adénosine, cytidine, uridine et guanosine) sont très similaires à ceux obtenus sous conditions thermospray (c'est-à-dire avec la lampe éteinte) mais le courant ionique total est beaucoup plus important lorsque la lampe est allumée. La **Figure 15a** présente le spectre de masse APPI de l'uridine enregistré à 500 °C dans l'eau. Les pics majoritaires observés correspondent aux espèces cationisées [M+Na]<sup>+</sup> et [M+2Na-H]<sup>+</sup> avec un unique fragment attribué à la nucléobase protonée provenant de la perte de la partie sucre neutre [Wu, 2004 et Vrkic, 2000].

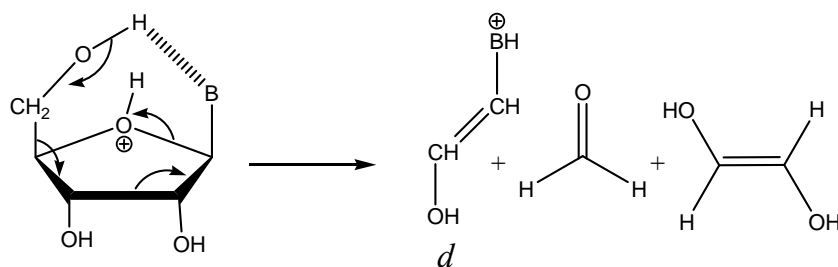
L'introduction d'un dopant dans la source engendre des conséquences non négligeables sur le spectre de masse des ribonucléosides. Comme le prouve la **figure 15b**, l'infusion de toluène à 10 μL.min<sup>-1</sup> dans la source d'ions diminue fortement le signal de l'espèce [M+Na]<sup>+</sup> en faveur de l'ion [M+H]<sup>+</sup>. La perte de la partie ribose, conduisant à la base protonée (notée BH<sub>2</sub><sup>+</sup>), est toujours observée sans aucun autre processus de fragmentation.

L'utilisation de l'acétone comme dopant provoque quelques modifications sur le spectre de masse APPI-DA de l'uridine (**Figure 15c**). Outre la présence de la molécule

protonée et de l'ion  $\text{BH}_2^+$ , des ions fragments supplémentaires apparaissent à  $m/z$  227 ( $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ) et  $m/z$  155. Ce dernier correspond à un ion *d* selon la nomenclature proposée par le groupe de McCloskey et décrit dans la **figure 16** [Wilson, 1975 et Shaw, 1970].



**Figure 15** : Spectres de masse APPI de l'uridine enregistrés dans l'eau à 500°C (a) sans dopant (b) assistés en infusant 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  de toluène et (c) en infusant l'acétone comme dopant à 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$



**Figure 16** : Mécanisme de la formation de l'ion *d* selon McCloskey *et al.* [Wilson, 1975]

Dans le cas de l'uridine, cet ion *d*, détecté à  $m/z$  155, n'apparaît que lorsque l'acétone est employée comme dopant et son intensité relative augmente avec le débit d'acétone (spectres non montrés). La formation de cet ion doit être reliée au comportement différent de ces deux dopants vis-à-vis de la réaction de protonation de l'analyte. La faible affinité protonique du radical 2-oxo-propyl (correspondant à l'espèce  $[D-H]^{\bullet}$  formée à partir de l'acétone) semble favoriser la protonation du nucléoside sur le site le moins basique de la molécule conduisant à la fragmentation observée sur la **figure 16**. L'affinité protonique de la partie sucre est estimée inférieure à  $865 \text{ kcal.mol}^{-1}$  par le groupe de McCloskey [Wilson, 1975]. L'absence de l'ion *d* lorsqu'on infuse du toluène (**Figure 15b**) permet de préciser l'affinité protonique du ribose qui se situe entre celle du radical benzyl ( $AP = 831 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) et celle du radical 2-oxo-propyl ( $AP = 820 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Notre hypothèse d'une protonation sur le site le moins basique pour expliquer l'origine des ions *d* est renforcée par la présence simultanée d'une perte d'eau sur l'espèce protonée (**Figure 15c**).

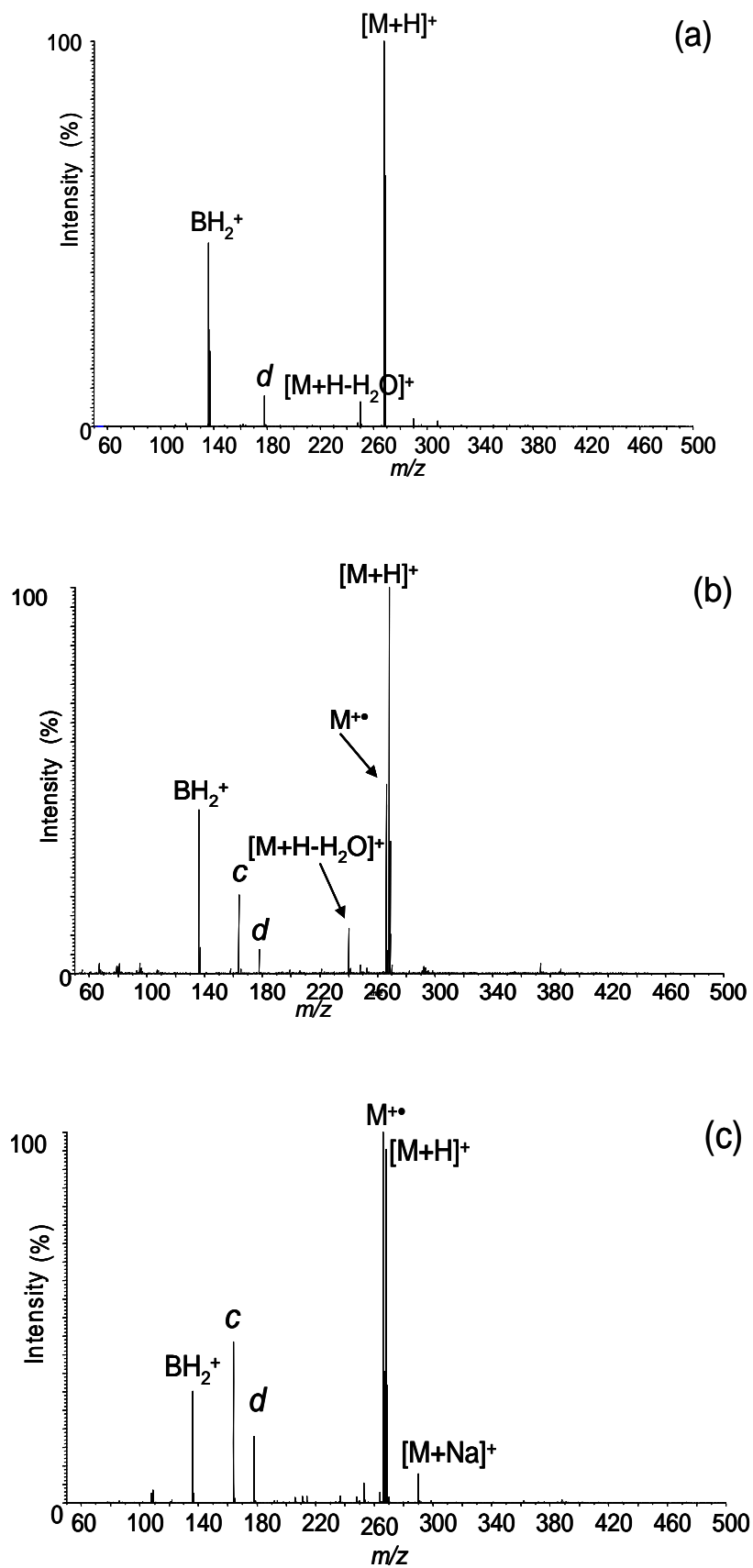
On vient donc de voir que pour un composé donné, il est possible d'orienter la réaction vers un type particulier d'ions « moléculaires » ( $M^+$  ou  $[M+H]^+$ ). L'influence des propriétés du dopant sur le comportement des molécules d'analyte sous conditions assistées est aussi illustrée avec le cas de l'adénosine.

La **figure 17** expose le spectre APPI de l'adénosine enregistré en introduisant de l'acétone dans la source à  $10 \mu\text{L.min}^{-1}$ . Les mêmes ions fragments que pour l'uridine (**Figure 15c**) sont observés ici mais avec des intensités relatives différentes : le pic de base correspond à la molécule protonée et les abondances relatives des deux principaux ions fragments  $[M+H-H_2O]^+$  et  $BH_2^+$  sont fortement réduits. La grande stabilité de l'ion  $[M+H]^+$  formé à partir de l'adénosine s'explique par l'affinité protonique de l'adénosine qui est relativement élevée comparée à celle de l'uridine ( $989.3 \text{ kJ.mol}^{-1}$  vs  $947.6 \text{ kJ.mol}^{-1}$  cf.

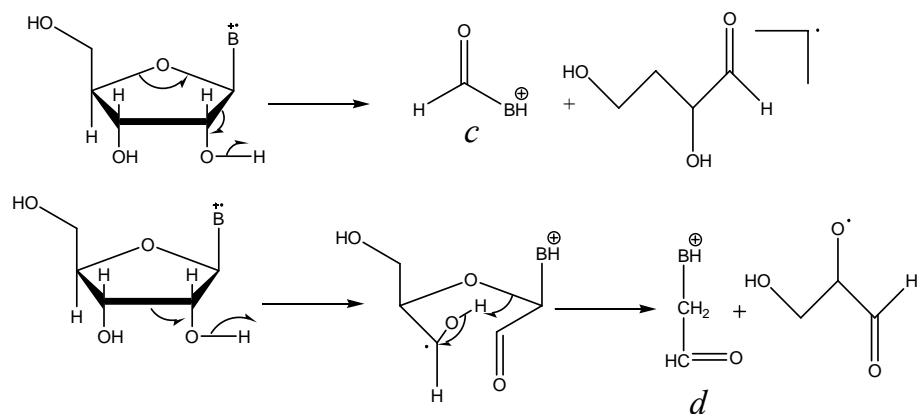
**tableau 4**). En remplaçant l'acétone par le toluène, les espèces  $[M+H-H_2O]^+$  et  $BH_2^+$  sont toujours observées sur le spectre de masse avec des intensités similaires alors que l'on note la formation d'un ion fragment à  $m/z$  164 et du cation radical  $M^{+\bullet}$  (**Figure 17b**). Ce phénomène peut être attribué à la valeur de l'AP du radical benzyle qui est relativement élevée. L'emploi de l'anisole confirme cette hypothèse. Avec ce dopant, pour lequel l'espèce radicale déprotonée  $[D-H]^\bullet$  possède l'affinité protonique la plus élevée (**Tableau 4**), la protonation de l'analyte devient donc minoritaire (**Figure 17c**). A l'opposé, d'autres chemins réactionnels sont favorisés tels que ceux conduisant à la formation de l'ion  $d$  et à l'ion à  $m/z$  164 qui est attribué à un ion  $c$  selon la nomenclature adoptée par McCloskey [Wilson, 1975]. Par conséquent, les fragments  $c$  et  $d$  pourraient provenir d'un ion précurseur autre que la molécule protonée. C'est pourquoi, la présence de l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  de l'adénosine en présence de toluène et sa très forte abondance avec l'anisole doit être pris en compte. Selon Shaw *et al.* [Shaw, 1970] qui ont rapporté la formation de ces ions  $c$  et  $d$  sous ionisation par impact électronique (**Figure 18**), nous proposons d'expliquer la formation de ces ions fragments par un mécanisme qui met en jeu l'ion précurseur moléculaire  $M^{+\bullet}$  de l'adénosine formé par transfert de charge avec le cation radical du dopant.

La comparaison des énergies d'ionisation des trois dopants étudiés laisse entrevoir une contradiction : plus l'énergie d'ionisation du dopant est faible plus les réactions de transfert de charge sont favorisées (**Tableau 4**). En fait, deux facteurs doivent être pris en compte pour expliquer les phénomènes entrant en jeu. D'une part, la réaction d'échange de charge est compétitive à celle de transfert de proton : si la vitesse de réaction de cette dernière est faible, cela augmente la vitesse relative de la première. D'autre part, comme démontré par des travaux antérieurs au sein de notre laboratoire [Giuliani, 2006], la section efficace de photoionisation de l'anisole correspond approximativement à deux fois celle du toluène, augmentant ainsi l'abondance des cations radicaux capable de réagir avec l'analyte. Par conséquent, il apparaît que l'ion fragment  $d$  peut provenir soit de la molécule protonée sur la partie sucre soit du cation radicalaire  $M^{+\bullet}$ .





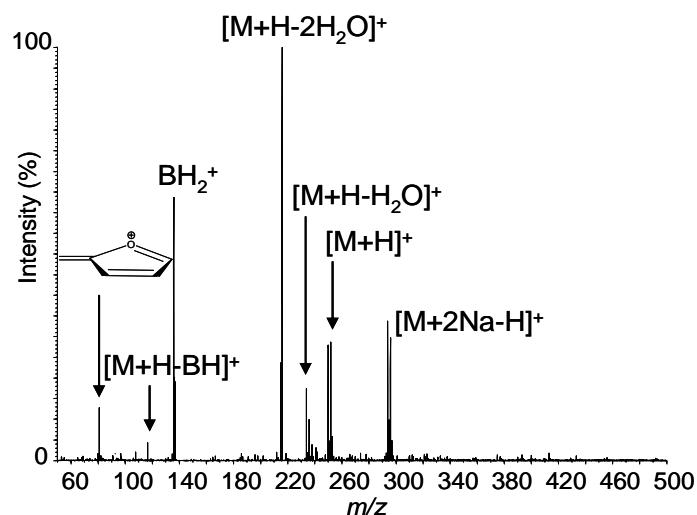
**Figure 17** : Spectres APPI-DA de l'adénosine enregistrés dans l'eau à 500 °C en infusant différents dopants (a) l'acétone (b) le toluène et (c) l'anisole



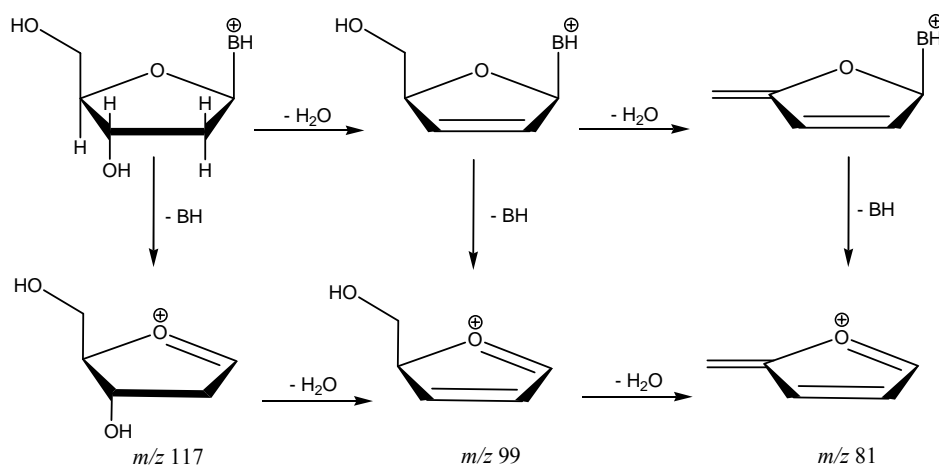
**Figure 18** : Formation des ions *c* et *d* à partir du cation radical du ribonucléoside

### III.2 Les déoxyribonucléosides

Les déoxyribonucléosides se comportent similairement aux ribonucléosides par rapport à l'ionisation thermospray et la photoionisation directe. La **figure 19** montre le spectre APPI de la déoxyadénosine enregistré en infusant  $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  de toluène. Quelque soit le dopant utilisé, les spectres de masse des déoxyribonucléosides montrent une grande abondance d'ions fragments issus de déshydratations successives suivies parfois de pertes de nucléobases comme décrit par la **figure 20** ci-après.



**Figure 19** : Spectre de masse APPI-DA de la déoxyadénosine enregistré à  $500^\circ\text{C}$  en utilisant du toluène comme dopant



**Figure 20** : Voies de fragmentation des déoxyribonucléosides par déshydratation et perte de base neutre

Les ions fragments à  $m/z$  117 ( $[M+H-BH]^+$ ) et  $m/z$  81 sont observés sur le spectre de masse de la déoxyadénosine (**Figure 19**) alors que l'ion à  $m/z$  99 ( $[M+H-BH-H_2O]^+$ ) est trop peu abondant pour être détecté. Quand aux ions correspondant aux bases protonées, ils sont détectés pour la totalité des nucléosides étudiés.

Contrairement aux ribonucléosides, la perte d'eau, caractérisant la présence d'un proton sur le carbone 2' du ribose, n'est pas accompagnée par la formation d'ions *d*. Néanmoins, d'autres processus sont observés tels que la perte d'une seconde molécule d'eau ou de  $H_2$  à partir des ions précurseurs  $[M+H]^+$  et  $[M+2Na-H]^+$ . L'absence d'ions *c* ne nous permet pas de proposer l'existence d'espèces radicalaires  $M^{\bullet+}$  qui, par ailleurs, ne sont pas détectées sur les spectres de masse.

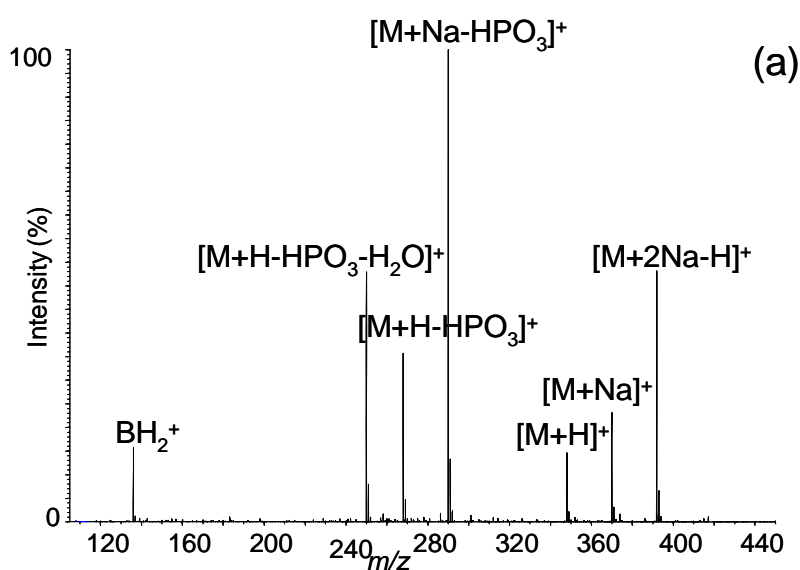
#### IV. ETUDE DE RIBO- ET DEOXYRIBONUCLEOTIDES EN APPI-MS

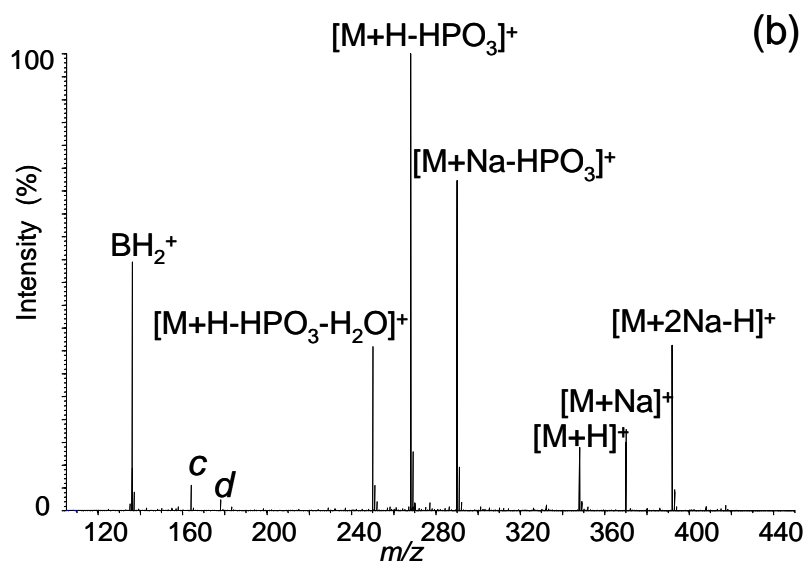
##### IV.1 Ribonucléotides

Trois ribonucléotides, cytidine-5'-monophosphate (CMP), adénosine-5'-monophosphate (AMP) et l'uridine -5'-monophosphate (UMP) ont été étudiés en Thermospray et présentent le même comportement. La **figure 21a** présente le spectre de masse obtenue pour l'AMP. Pour tous les nucléotides étudiés, les spectres Thermospray

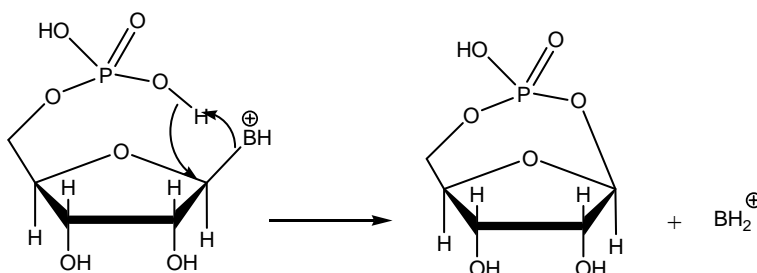
montrent la formation d'espèces moléculaires mono- et disodées avec des molécules protonées peu abondantes. Les ions fragments correspondant aux espèces  $[M+H-HPO_3]^+$  et  $[M+Na-HPO_3]^+$  sont formés à partir des nucléosides protonés et cationisés par le sodium respectivement. Une perte consécutive d'eau peut aussi avoir lieu à partir de l'espèce  $[M+H-HPO_3]^+$ , néanmoins, cette déshydratation n'est pas observée sur le fragment cationisé par le sodium. Des études mécanistiques effectuées sous CID [Kamel, 2004] ont permis de rapporter la formation de la nucléobase protonée ( $BH_2^+$ ) impliquant l'assistance du groupement phosphate, conduisant à la formation d'une molécule cyclique de phosphoribose stable (**Figure 22**). Les pics correspondant sont clairement présents sur les spectres de masse Thermospray comme illustré par le cas de l'AMP (**Figure 21a**).

Lorsqu'on allume la lampe (**Figure 21b**), les mêmes ions fragments sont détectés mais on peut noter des différences significatives au niveau des abondances relatives. En effet, la contribution des ions cationisés par le sodium au courant ionique est réduite, ce qui sous entend donc une augmentation de la quantité de molécules protonées par photoionisation. Par ailleurs, des ions fragments minoritaires, correspondant aux ions *c* et *d*, sont présents sur le spectre de masse. En infusant l'acétone comme dopant, on observe les mêmes tendances sur le spectre APPI-DA de l'AMP qui est présenté sur la **figure 23a**. Les molécules cationisées et protonées sont détectées simultanément avec les ions fragments suivants :  $BH_2^+$ ,  $[M+Na-HPO_3]^+$  et  $[M+H-HPO_3]^+$  avec une très faible intensité pour les espèces cationisées. Comme la photoionisation directe (**Figure 21b**), les fragments *c* et *d* sont minoritaires voire quasi inexistant. En fait, la seule différence avec le spectre obtenu sans dopant est l'absence de perte consécutive d'eau à partir de l'ion  $[M+H-HPO_3]^+$ .





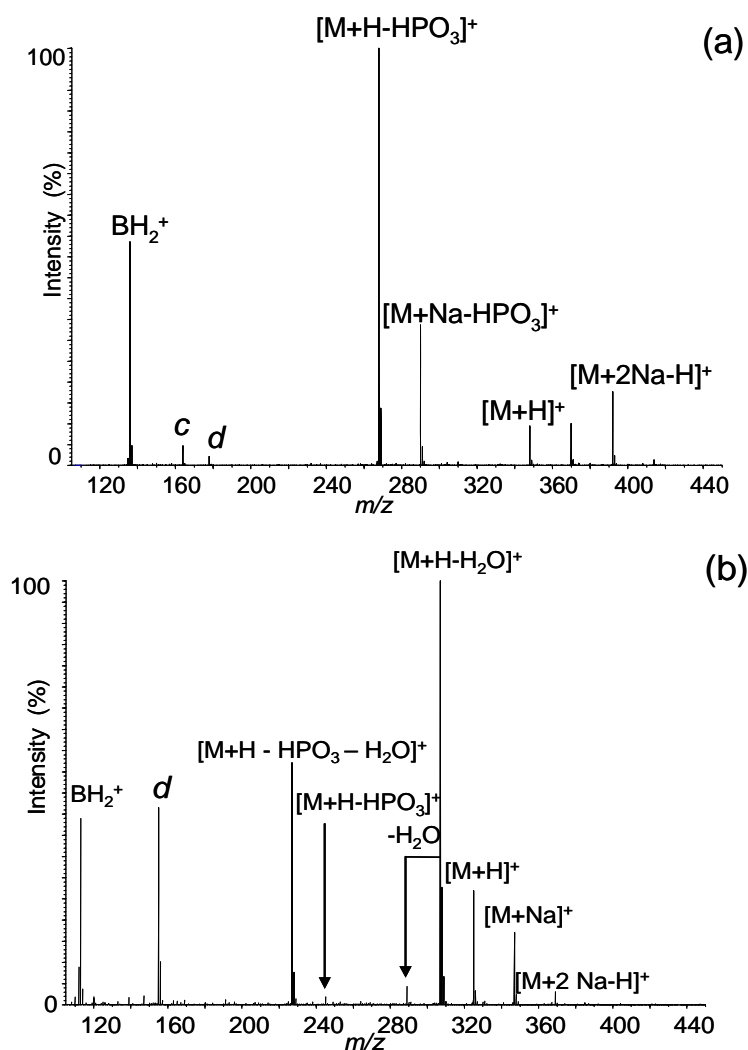
**Figure 21** : (a) Spectre de masse Thermospray de l'AMP enregistré à 500 °C (b) Spectre de masse APPI de l'AMP (sans dopant) enregistré dans les mêmes conditions



**Figure 22** : Mécanisme de fragmentation proposé pour la formation de la base protonée selon [Kamel, 2004]

Comparé à l'AMP, l'UMP présente un comportement différent. La **figure 23b** présente le spectre de masse sous conditions assistées de l'UMP en infusant de l'acétone à  $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Deux pertes consécutives d'eau sont observées à partir de la molécule protonée  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , elles étaient absentes sur le spectre de masse de l'AMP (**Figure 23a**). De plus et contrairement à la molécule d'AMP, les ions  $[\text{M}+\text{H}-\text{HPO}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$  sont cette fois-ci abondants au détriment des espèces  $[\text{M}+\text{H}-\text{HPO}_3]^+$ . Par ailleurs, la **figure 23b** montre un ion fragment *d* relativement intense et pas d'ions *c*. De la même façon que le ribonucléoside (l'uridine), ces pertes abondantes d'eau et la présence d'un intense fragment *d* suggèrent une réaction de protonation exothermique sur le ribose de l'UMP avec l'acétone. Encore une fois, on

démontre ici que ce dopant permet une accessibilité aux sites les moins basiques de la molécule.

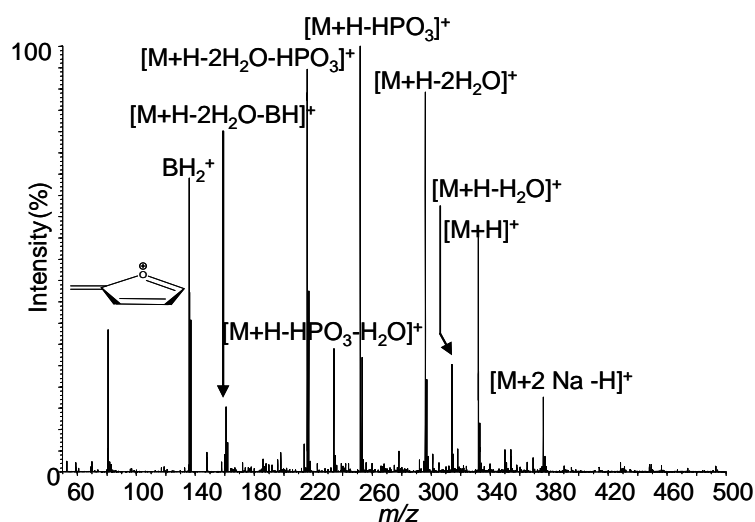


**Figure 23** : Spectres APPI-DA enregistrés en infusant du dopant et à 500 °C dans le cas de (a) AMP et (b) UMP

Les différences notables dans les voies de fragmentations entre l'UMP et l'AMP protonés soulignent le rôle prééminent des sites de protonation sur leur réactivité en phase gazeuse. La grande affinité protonique de l'adénine comparée à celle de l'uracile permet d'augmenter de manière significative la vitesse de protonation de la base nucléique pour l'AMP et, dans le même temps, celle correspondant à son nucléoside (l'adénosine). Les réactions d'échange de charge mineures peuvent aussi se produire conduisant à un signal faible mais significatif correspondant à l'ion  $c$ .

## IV.2 Les déoxyribonucléotides

Les déoxyribonucléotides suivants ont été étudiés : 2'-déoxyadénosine-5'-monophosphate (dAMP), 2'-déoxycytidine-5'-monophosphate (dCMP), 2'-déoxyguanosine-5'-monophosphate (dGMP) et 2'-déoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP). Ces nucléotides présentent des comportements similaires, c'est pour cela que nous allons ici détailler uniquement le cas de la dAMP. Son spectre de masse APPI-DA avec l'acétone est présenté sur la **figure 24**. En rapport avec le cas des ribonucléotides (**figure 23**), les molécules protonées et cationisées par le sodium sont très peu abondantes et d'intenses fragments sont observés sur le spectre de masse. Ces derniers apparaissent être indépendants de la nature du dopant. Les pertes consécutives d'acide phosphorique, d'eau et des bases nucléiques sont plus abondants dans le cas de déoxyribonucléotides comparé aux ribonucléotides (ex : dAMP vs AMP). Ces mêmes observations ont aussi été faites pour les nucléosides.



**Figure 24** : Spectre APPI-DA de la dAMP enregistré à 500 °C en infusant de l'acétone comme dopant

## V. CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail rapporte une étude par spectrométrie de masse des bases nucléiques, nucléosides et nucléotides sous photoionisation à pression atmosphérique. Les spécificités de cette technique d'ionisation ont été mis en évidence en comparant directement les spectres de masse à ceux enregistrés sous ionisation par Thermospray (c'est-à-dire lorsque la lampe UV est éteinte). Alors que les fragmentations sont minoritaires en Thermospray, elles se révèlent être particulièrement importantes sous photoionisation assistée par dopant où l'on observe une compétition entre le transfert de charge et les réactions de transfert de proton.

Pour les nucléosides et les nucléotides, les ions *c* semblent provenir d'espèces radicalaires  $M^{\bullet}$ . Les ions fragments *d*, pour leur part, peuvent avoir une double origine : l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  d'une part et, d'autre part, la protonation sur la partie ribose de la molécule. La vitesse de protonation du ribose dépend fortement de la différence d'affinités protoniques entre les bases et les molécules de dopant. Les différences au niveau des fragmentations observées des ions  $[M+H]^+$  entre les nucléotides et les nucléosides indiquent clairement une réelle différence dans la facilité de décomposition de ces espèces, montrant l'importance du groupement phosphate. Par ailleurs, des réactions de déshydratations successives ont lieu plus facilement sur des molécules contenant des déoxyribose plutôt que sur des dérivés de ribose.

En définitive, la grande versatilité des fragmentations ayant lieu en APPI est à l'origine la formation d'une variété d'ions précurseurs qui peuvent être soit des ions moléculaires (radicalaires) ou des molécules protonées sur des sites variés. C'est dans ce contexte que nous avons montré que les énergies d'ionisation et les affinités protoniques des molécules d'analyte et de dopants jouent un rôle crucial sur l'abondance relative de ces différents ions précurseurs.



## REFERENCES V

### C

[Cristoni, 2002] S.Cristoni, L.R. Bernadi, I. Biunno et F. Guidugli, Analysis of peptides using partial (no discharge) atmospheric pressure chemical ionization conditions with ion trap mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16, 2002, 1686-1691

### D

[Debois, 2006] D. Debois, A. Giuliani et O. Lapr evote, Fragmentation induced in atmospheric pressure photoionization of peptides, *J. Mass Spectrom.*, 41, 2006, 1554-1560

### G

[Giuliani, 2006] A. Giuliani, D. Debois et O. Lapr evote, Study of a bisquaternary ammonium salt by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 12, 2006, 189-197

### J

[Jochims, 2005] H.W. Jochims, M. Schwell, H. Baumg artel et S. Leach, Photoion mass spectrometry of adenine, thymine and uracil in the 6-22 eV photon energy range, *Chem. Phys.*, 314, 2005, 263-282

### K

[Kamel, 2004] A.M. Kamel et B. Munson, Collision induced dissociation of purine antiviral agents : mechanisms of ion formation using gas-phase hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 10, 2004, 239-257

[Kauppila, 2004] T.J. Kauppila, R. Kostianen et A.P. Bruins, Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 18, 2004, 808-815

## $\mathcal{L}$

[Linstrom, 2005] P.J. Linstrom, W.G. Mallard, Eds., Nist Chemistry Webbook, NIST Standard reference Database Number 69, June 2005, National Institut of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899 (<http://webbook.nist.gov>).

## $\mathcal{N}$

[Nelson, 1992] C.C. Nelson et J.A. McCloskey, Collision induced dissociation of adenine, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1992, 3661-3668

## $\mathcal{Q}$

[Qian, 2007] M. Qian, S. Yang, H. Wu, P. Majumdar, N. Leigh et R. Glaser, Ammonia Elimination from Protonated Nucleobases and Related Synthetic Substrates, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 2040-2057

## $\mathcal{S}$

[Saenger,1984] W. Saenger, *Principles of nucleic acid structure*, Springer-Verlag, New-York, (1984)

[Shaw, 1970] S.J. Shaw, D.M. Desiderio, K. Tsuboyama et J.A. McCloskey, Mass spectrometry of nucleic acid components. Analogs of adenosine, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 1970, 2510-2522

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

## $\mathcal{V}$

[Vrkic, 2000] A.K. Vrkic, R.A.J. O'Hair, S. Foote et G.E. Reid, Fragmentation reactions of all 64 protonated trimer oligodeoxynucleotides and 16 mixed base tetramer oligodeoxynucleotides via tandem mass spectrometry in an ion trap, *Int. J. Mass Spectrom.*, 194, 2000, 145-164

## W

[Wilson, 1975] M.S. Wilson et J.A. McCloskey, Chemical ionization mass spectrometry of nucleosides. Mechanisms of ion formation and estimations of proton affinity, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1975, 3436-3444

[Wu, 2004] J. Wu et S.A. McLuckey, Gas phase fragmentation of oligonucleotide ions, *Int. J. Mass Spectrom.*, 237, 2004, 197-241

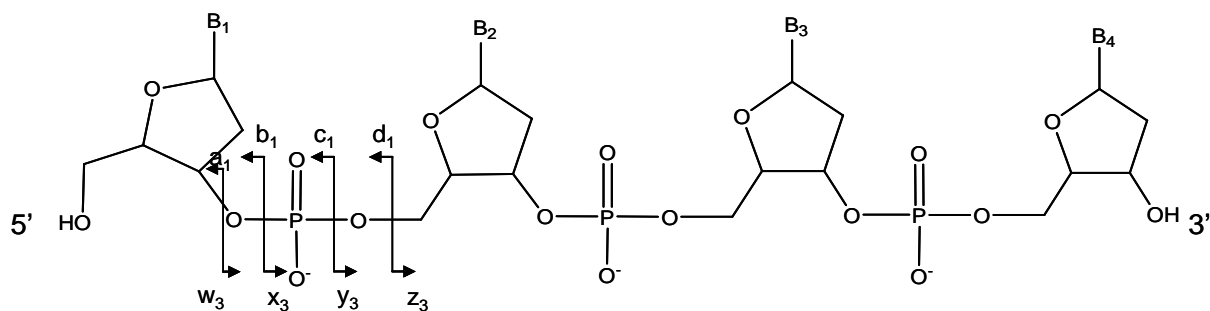
***Chapitre 6 :***  
***Etude d'oligodéoxyribonucléotides***

### I. INTRODUCTION GENERALE

#### I.1 Fragmentation des oligonucléotides par spectrométrie de masse

La compréhension du séquençage de molécules d'oligonucléotides par la spectrométrie de masse sous excitation collisionnelle a été entreprise depuis quelques années déjà, et a intéressé de nombreux analystes. Une nomenclature, permettant de différencier les fragments d'oligonucléotides obtenus par dissociation induite par collision (CID) à partir d'ions précurseurs positifs ou négatifs, a été introduite en 1992 par McLuckey [McLuckey, 1992], par analogie avec celle développée pour les peptides [Roepstorff, 1984 et Biemann, 1988]. D'autres nomenclatures existaient déjà mais ne permettaient pas de désigner tous les ions fragments observés en MS/MS et  $MS^n$  à partir d'oligonucléotides multidéprotonés.

La nomenclature proposée par McLuckey est représentée sur la *figure 1*. Les quatre ruptures possibles le long de la chaîne phosphodiester sont désignées par les lettres minuscules a, b, c, d pour les fragments conservant le groupement 5'-terminal et w, x, y, z pour les fragments contenant le groupement 3'-terminale. Les indices numériques représentent le nombre de bases conservées pour chaque fragment. La lettre majuscule B est l'abréviation générique d'une base et son indice numérique indique la position de celle-ci le long de la chaîne en partant de l'extrémité 5'-terminal. Une adaptation de la nomenclature de McLuckey par Vouros [Barry, 1995] peut également être rencontrée, où l'oligonucléotide est considéré comme une espèce neutre. Outre les ruptures de la chaîne phosphodiester, des pertes de bases, des pertes de  $H_2O$  et des fragmentations consécutives peuvent également être observées.



**Figure 1** : Représentation schématique de la nomenclature utilisée pour nommer les ions fragments des oligonucléotides selon [McLuckey, 1992]

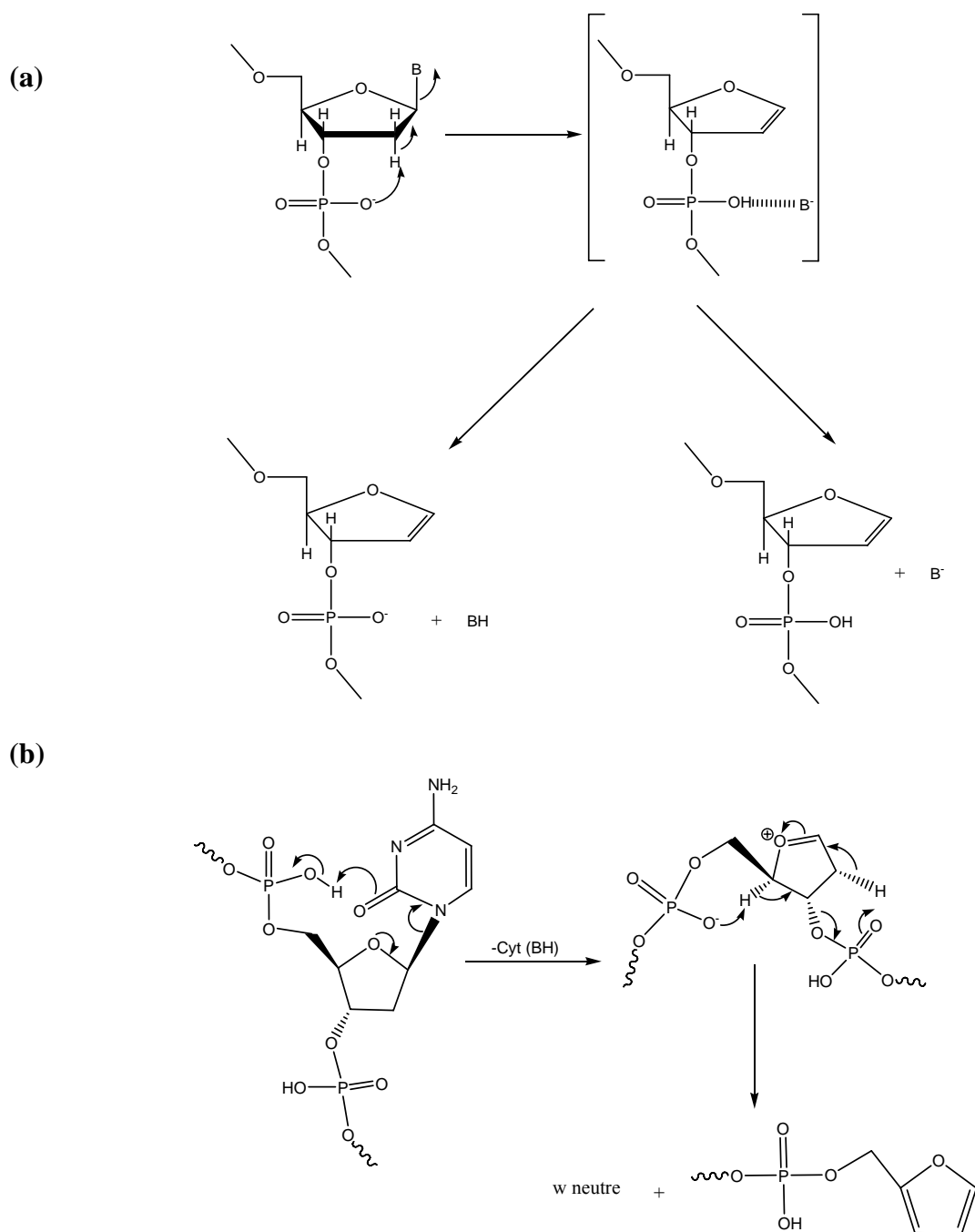
## I.2 Fragmentation d'oligonucléotides en mode d'ionisation négatif

Que ce soit à partir de duplexes d'ADN ou de simples brins d'ADN, une des voies prédominantes de décomposition est la perte d'une nucléobase adénine (A), guanine (G), cytosine (C) ou thymine (T) dans sa forme neutre ou chargée, suivie par le clivage de la liaison phosphodiester impliquant la formation des ions complémentaires  $(a_i\text{-BH})^{x-}$  et  $w_j^{x-}$ . Il est connu que la probabilité de perdre une nucléobase sous l'une de ses deux formes (neutre ou chargée) dépend fortement de l'état de charge de l'ion précurseur, de la taille de l'oligonucléotide, de la position de cette base sur la séquence et du contexte de la séquence [McLuckey, 1995 et 1997]. En effet, pour des faibles états de charge de l'ion parent, la base est perdue sous forme neutre alors qu'elle est éliminée sous forme anionique pour des états de charge élevés. Plusieurs mécanismes ont été postulés pour expliquer cette décomposition. Ces différents mécanismes ont été résumés par Gross *et al.* [Wan, 2001a et 2001b]. Les premiers sont basés sur des résultats obtenus à partir de dinucléotides, modèles plus simples que les oligonucléotides de plus grande taille. Tout d'abord, Grotjahn *et al.* [Cerny, 1986] ont proposé pour un dinucléotide une substitution nucléophile de type  $\text{SN}_2$  intramoléculaire pour l'élimination de la base  ${}^5\text{B}^-$  par l'oxygène du groupement phosphodiester chargé négativement. Pour la formation de l'ion  $[\text{M-H-}{}^5\text{BH}]^-$ , un autre mécanisme est impliqué avec une réaction de réarrangement à charge piégée. Ce modèle a depuis été critiqué car le mécanisme à charge piégée ne fait pas intervenir la position de la base le long de la chaîne phosphodiester, alors que des différences de comportement apparaissent pour les bases en position 3' et 5'-terminales [Ho, 1997]. En effet, la perte de la base nucléique en position 3' semble toujours défavorisée. De plus, selon le mécanisme, l'obtention d'ions fragments

complémentaires,  $(a_i\text{-BH})^{x-}$  et  $w_j^{x-}$ , suite à la perte de la base, est difficilement envisageable car elle nécessite la rupture de deux liaisons covalentes. Le mécanisme proposé par Beauchamp *et al.* [Rodgers, 1994], à partir d'un dinucléotide, n'implique plus une substitution nucléophile intramoléculaire mais une réaction d'élimination intramoléculaire de type  $E_2$  initiée par le groupement phosphodiester (**figure 2**). Le proton transféré au groupement phosphodiester provient de l'hydrogène en position 2' du désoxyribose. L'ion fragment  ${}^5\text{B}^-$  est formé par élimination et conduit soit directement à l'ion  ${}^5\text{B}^-$  soit à la formation d'un complexe ion-dipôle avec le reste de la molécule. Dans ce cas, une liaison hydrogène forte est créée entre l'ion  ${}^5\text{B}^-$  et le groupement phosphate hydroxyle, pouvant donner lieu soit à la formation des espèces  $[\text{M-H-}{}^5\text{BH}]^-$  (par transfert de proton vers l'ion  ${}^5\text{B}^-$ ) et  ${}^5\text{B}^-$ . Récemment, le groupe de Gross [Wan, 2001a] a proposé un autre mécanisme basé sur le transfert de proton du 5'-phosphate à la nucléobase initialement neutre impliquant la perte de cette dernière via un intermédiaire zwitterionique. Rappelons que dans le cas de petits oligomères d'ADN (moins de 4 paires de bases), il a été montré que les formes zwitterioniques n'étaient pas favorisées en phase gazeuse [Gidden, 2003]. Le zwitterion, qui a une durée de vie courte, se fragmente donc pour donner les ions  $(a_i\text{-BH})^{x-}$  et  $w_j^{x-}$ . L'existence de ce mécanisme a été mise en évidence par des études d'échanges H/D [McLucky, 1992]. Il a été suggéré par différents auteurs que ces deux mécanismes généraux pouvaient être distingués en corrélant la dissociation énergétique des différentes bases nucléiques, soit avec leur AP si la base est protonée avant le clivage de la liaison glycosidique (mécanisme (b) de la **figure 2**) soit avec leur acidité si la base est perdue *via* le complexe ion-dipôle (mécanisme (a) de la **figure 2**). La détermination des paramètres d'activation d'Arrhénius des pertes de nucléobases d'oligonucléotides 10-mères du type  $\text{XT}_9$  et  $\text{T}_9\text{X}$  (ou  $\text{X}=\text{A}, \text{C}$  et  $\text{G}$ ) en phase gazeuse ont été déterminés en utilisant le BIRD. Cette étude a montré que l'ordre relatif des énergies d'activation des pertes de bases n'est corrélé ni avec l'ordre relatif des AP des nucléobases, ni avec celui des acidités. Il est suggéré que la réactivité des bases nucléiques est influencée par des interactions intramoléculaires stabilisantes. Tous ces résultats montrent la complexité du mécanisme de perte de base et de son élucidation.

Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser les conditions expérimentales nécessaires pour observer les oligonucléotides intacts avec un meilleur rendement en APPI. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'étude des fragmentations des oligomères selon les deux modes d'ionisation et sous conditions assistées, ce qui nous a permis de dégager les mécanismes de fragmentations sous photoionisation à pression

atmosphérique pour cette famille de molécule. Enfin, on discutera des potentialités de l'APPI pour l'analyse structurale des oligonucléotides.



**Figure 2** : (a) Mécanisme proposé par Beauchamp *et al.* pour expliquer les pertes de BH et B<sup>-</sup> [Rodgers, 1994], (b) Mécanisme proposé par Gross *et al.* [Wan, 2001a]



## II. ETUDE DE DI- ET TRIMERES

### II.1 Optimisation des conditions expérimentales

Pour appliquer avec succès la spectrométrie de masse par photoionisation à l'étude des oligonucléotides, la préparation des échantillons à analyser et le contrôle des paramètres expérimentaux sont des facteurs très importants à déterminer. Les conditions d'analyse sont donc abordées ici avant de passer à l'étude de la fragmentation de ces acides nucléiques.

Les oligodéoxynucléotides étudiés ici sont d(TA) et d(TAG) qui ont été synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique).

#### *II.1.1 Choix du solvant et du tampon*

Il est nécessaire de travailler dans des conditions de solvants et de tampons proches des conditions physiologiques tout en étant compatible avec des conditions d'ionisation efficaces sous APPI. Le choix du solvant a été fait en testant différents systèmes de solvant et la composition H<sub>2</sub>O/MeOH 10/90 s'est révélée être la plus efficace. De plus, si l'utilisation de tampons non volatils comme les tampons phosphate est un peu plus difficile, celle de tampons volatils comme l'acétate d'ammonium est possible. Deux questions se posent alors : *Quelles sont les concentrations à utiliser et dans quel tampon devons nous travailler ?* La concentration en tampon doit être suffisamment élevée pour former des espèces moléculaires stables en solution à température ambiante. Ainsi, le contre ion stabilisera les groupements phosphates chargés négativement, présents sous forme de sels, de façon à minimiser les répulsions électrostatiques pouvant entraîner la dissociation de l'oligonucléotide.

Dans la littérature, le tampon le plus employé avec l'ESI pour l'analyse de biomolécules est l'acétate d'ammonium (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) [Wan, 2000]. D'autres tampons comme l'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (HCO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>) sont aussi utilisés [Ding, 1995]. Nous avons donc exploité les résultats obtenus dans la littérature, selon les tampons employés, de cette manière, nous pourrions déterminer les meilleures conditions d'analyse. A partir des résultats obtenus sur des di- et trinucleotides en APPI (spectres non montrés), on observe que malgré l'ajout de tampons, on n'observe pas l'espèce moléculaire des oligonucléotides étudiés. Des concentrations en tampons élevées ne permettent pas de détecter une espèce stable dans les deux modes d'ionisation. C'est pour cela que nous avons

choisi de travailler sans ajout de tampon. Nous avons donc préparé des solutions d'oligonucléotides dans un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH 10/90 à une concentration de 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>.

### II.1.2 Optimisation des paramètres de la source

Les paramètres instrumentaux ont été optimisés de telle façon à ce que l'on obtienne le meilleur rapport signal/bruit tout en évitant de faire du CID en source. Les paramètres utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le **tableau 1** ci-dessous. Comme on peut le voir sur ce tableau, les valeurs des tensions DP et FP sont portées à leur minimum.

**Tableau 1** : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse des oligonucléotides en APPI dans les deux modes d'ionisation étudiés

Quantité injectée :	20 µL à 10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup>
Solvant LC :	H <sub>2</sub> O/MeOH (10:90, v/v) à 200 µL.min <sup>-1</sup>
Dopants :	Anisole, Toluène ou Acétone

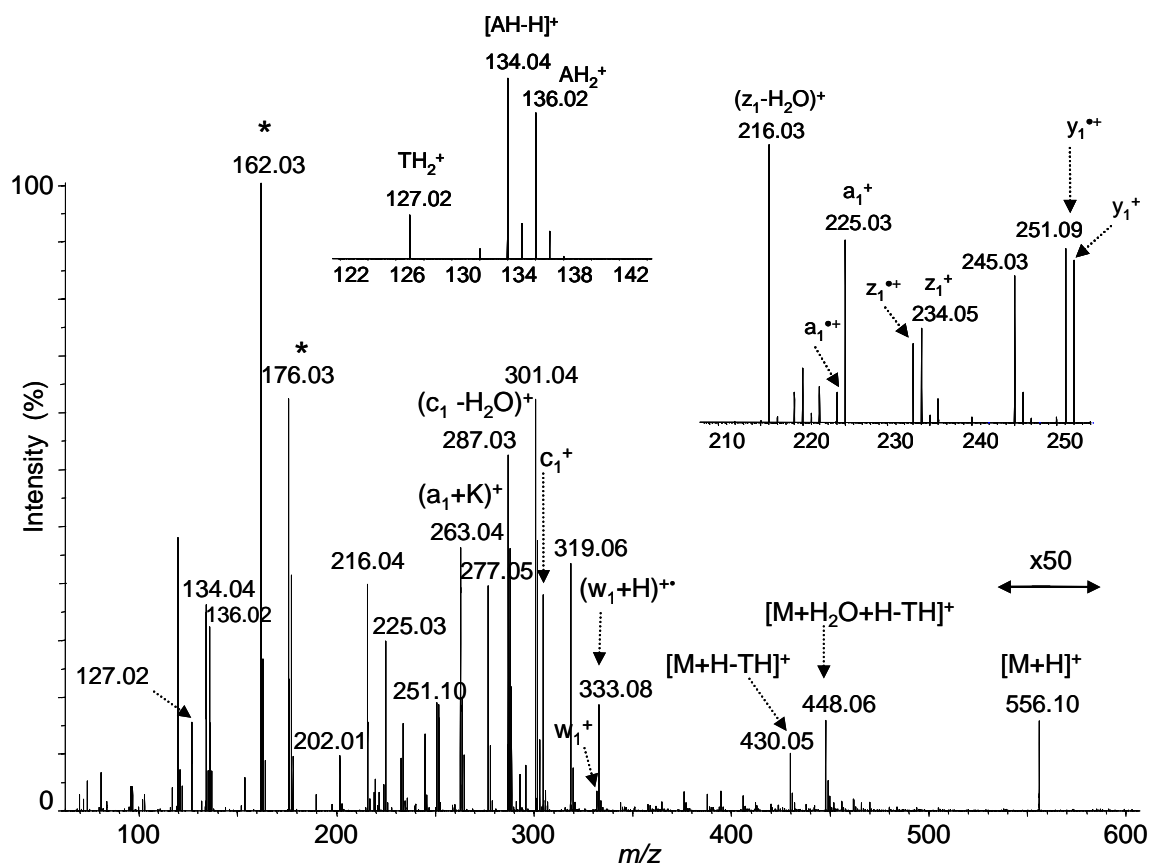
GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1	MCP
50	20	25	350/400	3	1800	20	100	15	2	2100

### II.2 Etude de nucléotides en mode d'ionisation positif

Les dinucléotides sont des systèmes modèles nécessaires à l'étude de la fragmentation d'oligonucléotides de plus grande taille dont la réactivité des ions en phase gazeuse est relativement complexe. En effet, les spectres des oligonucléotides sont souvent difficiles à analyser en raison de la grande variété de fragments formés, issus en particulier de ruptures des différentes liaisons P-O et C-O de la chaîne phosphodiester. Parce que les dinucléotides sont les plus petites sous-unités des acides nucléiques portant l'information de séquence, leur caractérisation par spectrométrie de masse est potentiellement utile pour des études structurales d'acides nucléiques.

## II.2.1 Cas d'un dinucléotide d(TA)

La **figure 3** présente le spectre APPI-DA du dinucléotide d(TA) dans H<sub>2</sub>O/MeOH (10 :90, v/v) enregistré à 350 °C avec du toluène introduit dans la source à 10 μL.min<sup>-1</sup>. Un signal très faible, correspondant à l'espèce protonée [M+H]<sup>+</sup>, est observée à *m/z* 556 avec des fragments nombreux et abondants.



**Figure 3** : Spectre de masse APPI-DA du dinucléotide d(TA) en mode d'ionisation positif en infusant du toluène dans la source

Les ions fragments observés peuvent être rassemblés en quatre groupes. En tout premier lieu, on peut rassembler deux pics à *m/z* 448 et 430 qui sont attribués aux espèces [M+H<sub>2</sub>O+H-TH]<sup>+</sup> et [M+H-TH]<sup>+</sup> respectivement. Dans un deuxième temps, les bases protonées apparaissent à *m/z* 136 et 127 avec un pic inattendu à *m/z* 134. Par la suite, la région des *m/z* entre 210 et 340 montre des pics provenant de la fragmentation du squelette de l'oligonucléotide. Dans la quatrième catégorie, on retrouve deux pics à *m/z* 176 et *m/z* 162 labellisés par une étoile sur la **figure 3**.

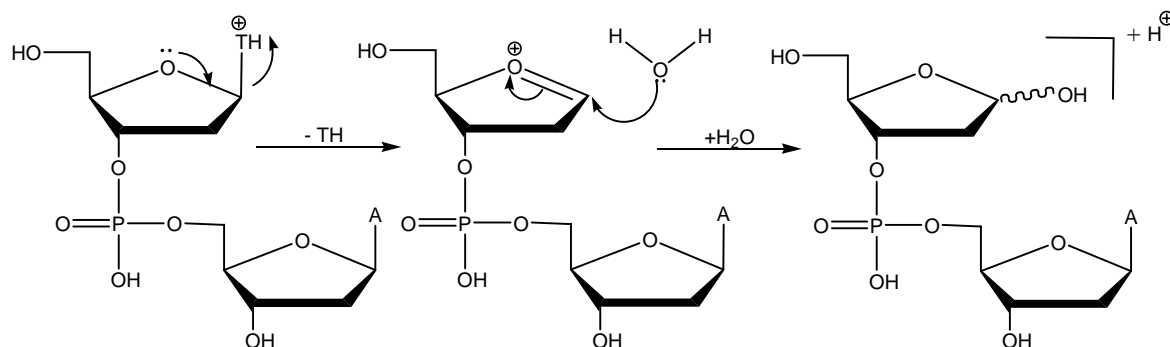
L'espèce protonée  $[M+H]^+$  est formée par protonation de la molécule neutre par transfert de proton à partir du toluène ou de clusters de solvants [Syage, 2004 et Short, 2007]. Il est connu que cette réaction de protonation est assez exothermique pour induire d'intenses fragmentations en source [Robb, 2000 et Bagag, 2007]. Les bases protonées  $AH_2^+$  et  $TH_2^+$  à  $m/z$  136 et  $m/z$  127 proviennent, quand à elles, d'une protonation sur les nucléobases correspondant au site de la molécule possédant la plus forte affinité protonique (rappel :  $AP(\text{ribose}) = 831\text{-}820 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [Bagag, 2007]). La faible affinité protonique de la thymine rend sa protonation moins favorable que celle de l'adénine. Néanmoins, on observe un pic de faible abondance à  $m/z$  127 correspondant à la thymine protonée. La formation de cet ion s'explique par une des réactions classiques rencontrées en APPI : le transfert de proton avec le dopant. La condition des affinités protoniques est bien remplie dans le cas de la thymine qui possède une AP de  $880.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , celle du toluène étant de  $831.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .



avec TH correspondant à la thymine neutre

Boschenok et Sheil [Boschenok, 1996] ont étudié des oligonucléotides de petite taille notamment des di-, tri et tétranucléotides en electrospray. Ils ont montré que les dinucléotides étudiés présentaient le même comportement à savoir que l'ion  $BH_2^+$  en position 3' est beaucoup plus abondant que celui avec la base en extrémité 5' terminale. Cette tendance peut être généralisée à tous les spectres MS/MS d'ions  $[M+H]^+$  dont ceux obtenus en FAB-MS/MS [Philipps, 1993]. Les résultats obtenus en APPI suivent ces tendances. Comme on peut le voir sur la **figure 3**, le pic à  $m/z$  136 ( $AH_2^+$ ) est accompagné d'un pic à  $m/z$  134 correspondant à l'espèce  $[AH-H]^+$ . A notre connaissance, un tel fragment n'a pas encore été reporté dans la littérature. Cet ion pourrait provenir d'une perte de  $H^{\bullet}$  à partir du cation radical de la base nucléique ( $AH^{\bullet+}$ ). L'observation de cet ion suggère l'implication de réactions radicalaires issues de l'ionisation du dopant en APPI suivi d'un clivage de la liaison base-ribose. Bien que le mécanisme de la perte de la base neutre à partir de la molécule protonée pour former l'espèce  $[M+H-TH]^+$  est bien détaillé dans la littérature [Wu, 2004 et Vrkic, 2000] et en accord avec les réactions classiques de protonation en APPI, l'origine de l'ion  $[M+H_2O+H-TH]^+$ , est quand à elle, moins évidente. Sachant que l'APPI opère à pression atmosphérique et en présence de solvant, des réactions ion-molécule sont possibles et peuvent apporter une explication pour la formation de cet ion. De ce fait, nous avons tenté d'expliquer la formation de cette espèce par une réaction de substitution d'une molécule de solvant (eau) sur la partie

sucres, comme proposé par le mécanisme de la **figure 4**. Des réactions similaires du type «glycosylation» ont été reportées auparavant sous FAB impliquant aussi une interaction analyte-solvant en phase gazeuse [Laprévôte, 1992].



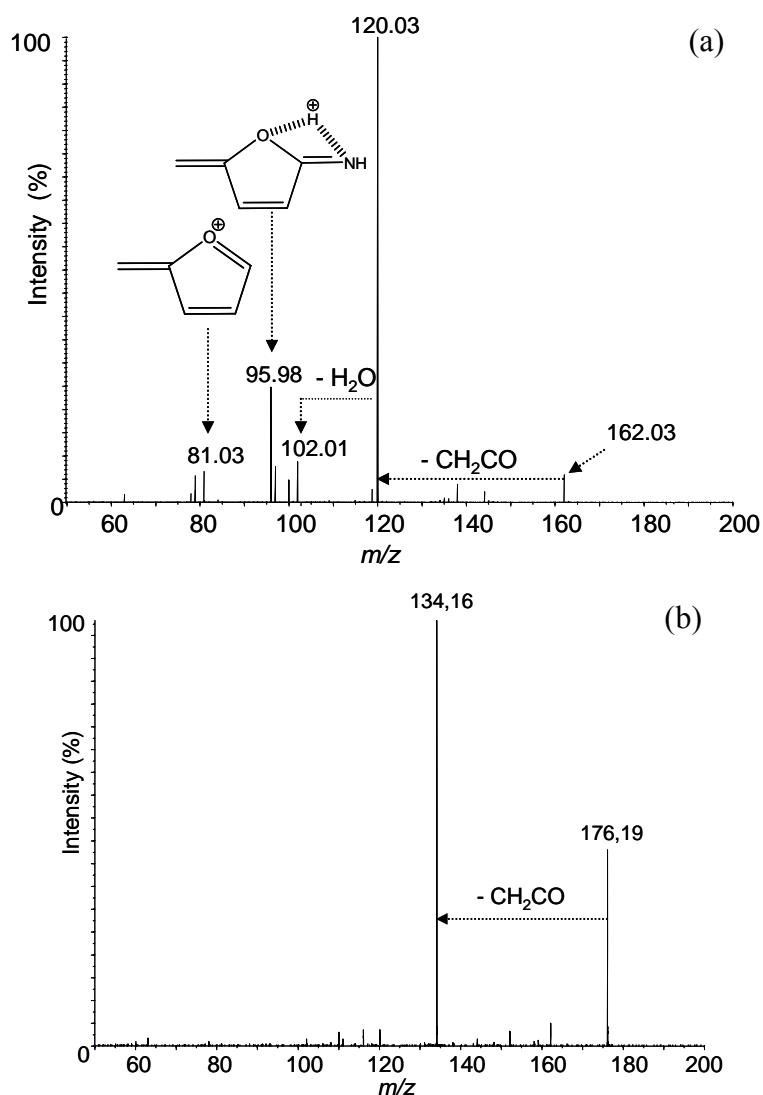
**Figure 4** : Mécanisme proposé pour expliquer la formation de l'espèce  $[M+H_2O+H-TH]^+$

Dans la région des  $m/z$  210-340, des ions fragments caractéristiques sont détectés notamment les ions  $w_1^+$ ,  $[w_1+H]^+$ ,  $c_1^+$ ,  $(c_1-H_2O)^+$ ,  $y_1^+$ ,  $z_1^+$ ,  $a_1^+$  et  $(z_1-H_2O)^+$ . Dans la suite de cette étude, les ions fragments à nombre pair d'électrons seront désignés par les lettres  $a_n^+$ ,  $b_n^+$ , etc... et les ions fragments ayant subi la perte d'un atome d'hydrogène  $H^\bullet$  sont représentés comme suit  $a_n^{+\bullet}$ ,  $b_n^{+\bullet}$  selon la nomenclature utilisée par Håkansson *et al.* [Håkansson, 2003].

Un examen minutieux de la région du domaine spectral entre  $m/z$  210 et  $m/z$  250, représenté dans l'insert de la **figure 3**, révèle des pics très intéressants. En effet, les fragments  $a_1^+$ ,  $z_1^+$  et  $y_1^+$  sont accompagnés d'ions à 1 unité de moins et labellisés comme suit :  $a_1^{+\bullet}$ ,  $z_1^{+\bullet}$  et  $y_1^{+\bullet}$ . Le groupe d'Håkansson a rapporté la formation des fragments  $a_1^{+\bullet}$  et  $z_1^{+\bullet}$  associés à des ions  $w$ -et  $d$ - à nombre pair d'électrons en capture d'électron dissociative (ECD) sur des tétra-, penta-, hexa- et hepta-déoxynucléotides doublement chargés [Håkansson, 2003]. Il est intéressant de souligner ici l'observation nouvelle des ions  $y_1^{+\bullet}$  (absents sur les spectres ECD).

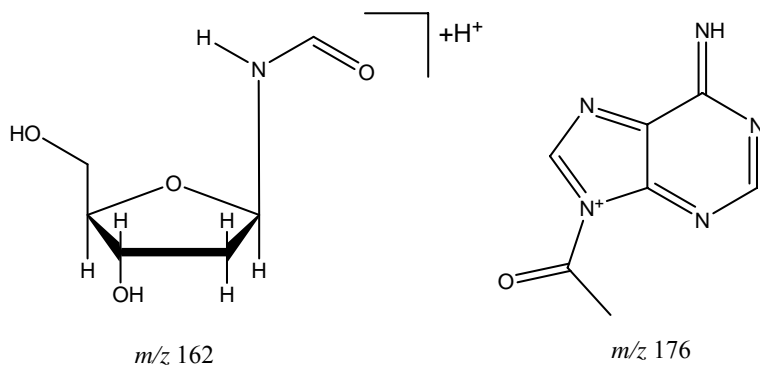
Les deux pics majoritaires sur le spectre de masse (**figure 3**) détectés à  $m/z$  162 et 176 méritent qu'on leur porte une attention particulière. Ces deux ions, labellisés par une étoile sur la **figure 3**, ne correspondent pas à des fragments caractéristiques selon la nomenclature de McLuckey [McLuckey, 1992]. En considérant que ces ions sont à nombre pair d'électrons, ils devraient contenir un (trois ou cinq) atome(s) d'azote provenant des bases nucléiques. D'après le spectre MS/MS de l'ion précurseur à  $m/z$  162 (**figure 5a**), la perte du groupe cétène ( $m/z$  120) suivi d'une déshydratation ( $m/z$  102) et la présence de pics d'ions à  $m/z$  96 et 81 qui

peuvent être facilement attribué à des fragmentations du désoxyribose, suggère la structure présentée sur la **figure 6**.



**Figure 5** : Spectres de masse CID des ions précurseurs à (a)  $m/z$  162 et (b)  $m/z$  176 provenant de la photoionisation sous conditions assistées de d(TA) en mode d'ionisation positif

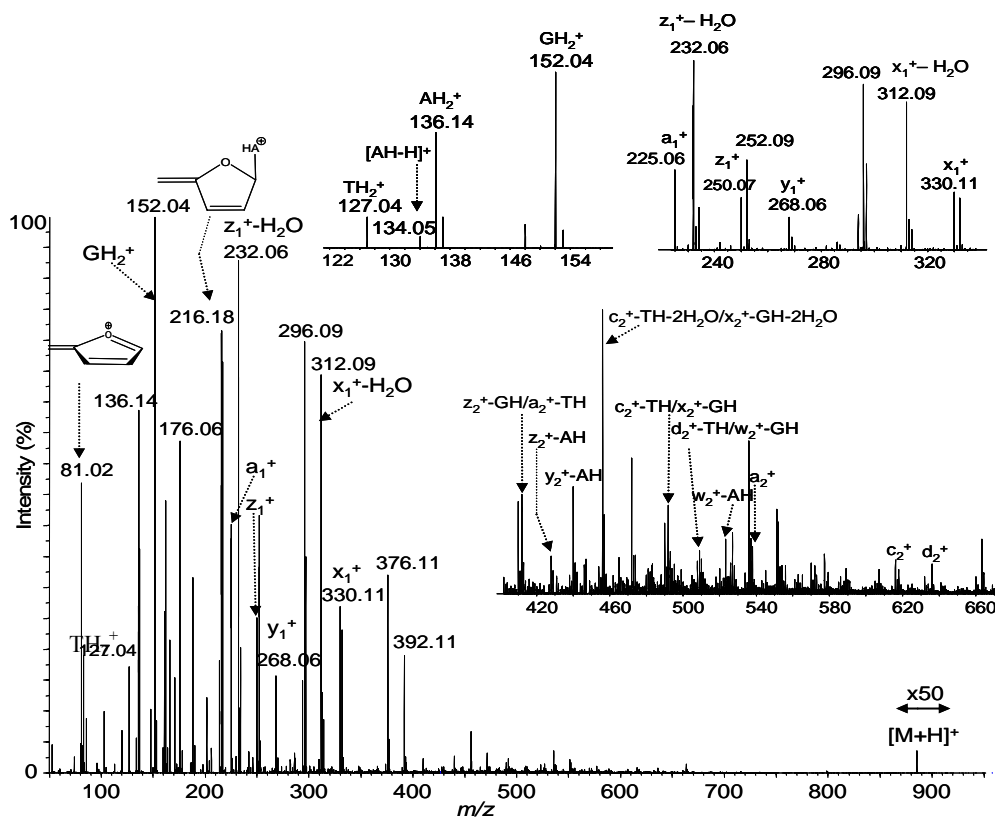
En revanche, le spectre MS/MS de l'ion précurseur à  $m/z$  176 ne présente pas de signal caractéristique du sucre ni de perte consécutive d'eau à partir de l'ion fragment à  $m/z$  134. Ce dernier correspond à une perte directe de CH<sub>2</sub>CO à partir de l'ion précurseur qui est alors assigné à la structure présentée sur la **figure 6**. Dans l'état actuel de nos connaissances, ces deux ions n'ont jamais été décrits auparavant et les mécanismes qui conduisent à leur formation restent à préciser.



**Figure 6** : Structures proposées pour les ions à  $m/z$  162 et  $m/z$  176

### 1.2.2 Cas d'un trinucleotide d(TAG)

La **figure 7** montre le spectre APPI du d(TAG) dans H<sub>2</sub>O/MeOH (10/90, v/v) enregistré à 400 °C en infusant 10 μL.min<sup>-1</sup> de toluène (dopant) dans la source. De la même façon que sur la **figure 5**, un très faible pic correspondant à l'espèce protonée [M+H]<sup>+</sup> est observé à  $m/z$  885,6. D'intenses fragmentations du tridéoxyribonucléotides sont aussi observées, impliquant notamment des pertes de bases protonées, des ruptures de la liaison phosphodiester et les deux ensemble.



**Figure 7** : Spectre de masse APPI-DA du tridéoxynucleotide d(TAG) en mode positif

Les trois nucléobases protonées  $\text{TH}_2^+$ ,  $\text{AH}_2^+$  et  $\text{GH}_2^+$  sont détectées à  $m/z$  127, 136 et 152 respectivement. La formation des nucléobases protonées est bien décrite dans la littérature à partir d'ions précurseurs protonés sur le site basique [Wu, 2004]. Comme on peut le voir sur le spectre de masse, le pic majoritaire correspond à la guanine protonée à  $m/z$  152. Selon Philipps et McCloskey [Phillips, 1993], la perte de la base terminale côté 3' est favorisée par rapport à la perte de la base côté 5'. La faible abondance de la thymine protonée est expliquée par la grande stabilité relative des liaisons glycosidiques de la thymidine [Linscheid, 1983]. Le second facteur influençant la structure et la réactivité en phase gazeuse est l'affinité protonique des bases nucléiques. Par ailleurs, rappelons que l'adénine et de la guanine protonées deviennent de bon groupements partants en raison de la stabilité de leurs formes tautomères [Greco, 1990 et Del Bene, 1983]. Enfin, le pic à  $m/z$  134 attribué à l'espèce  $[\text{AH-H}]^+$  est encore observé ici, comme pour le dinucléotide, bien que moins abondant que sur la **figure 1**.

L'agrandissement de la région entre  $m/z$  220 et 330, dans l'encart de la **figure 7**, permet de voir les pics de séquence suivants :  $a_1^+$ ,  $(z_1-\text{H}_2\text{O})^+$ ,  $z_1^+$ ,  $y_1^+$ ,  $(x_1-\text{H}_2\text{O})^+$  et  $x_1^+$ . Les ions de séquence n'étaient pas observés précédemment (**figure 1**). Néanmoins, comme pour le dinucléotide, des pertes consécutives d'eau sont favorisées pour la plupart des ions caractéristiques observés. Il est intéressant de noter que dans cette gamme de masse, aucun fragment radical n'est détecté ici contrairement au didéoxynucléotide d(TA). Cette observation est en accord avec les travaux d'Håkansson *et al.* qui ont rapporté que la fragmentation d'oligonucléotides est un phénomène dépendant de la séquence de celui-ci [Håkansson, 2003]. Ainsi, l'addition de la guanine produit des fragments a/b/c/d et w/x/y/z mais pas leurs ions complémentaires radicalaires qui étaient détectés pour le dinucléotide.

Pour finir, dans la région entre  $m/z$  400 et 660, on détecte la série quasi complète des ions fragments spécifiques de la séquence. En effet, les ions  $a_2^+/c_2^+/d_2^+$  sont accompagnés des ions complémentaires ayant perdu leur base côté 5'.

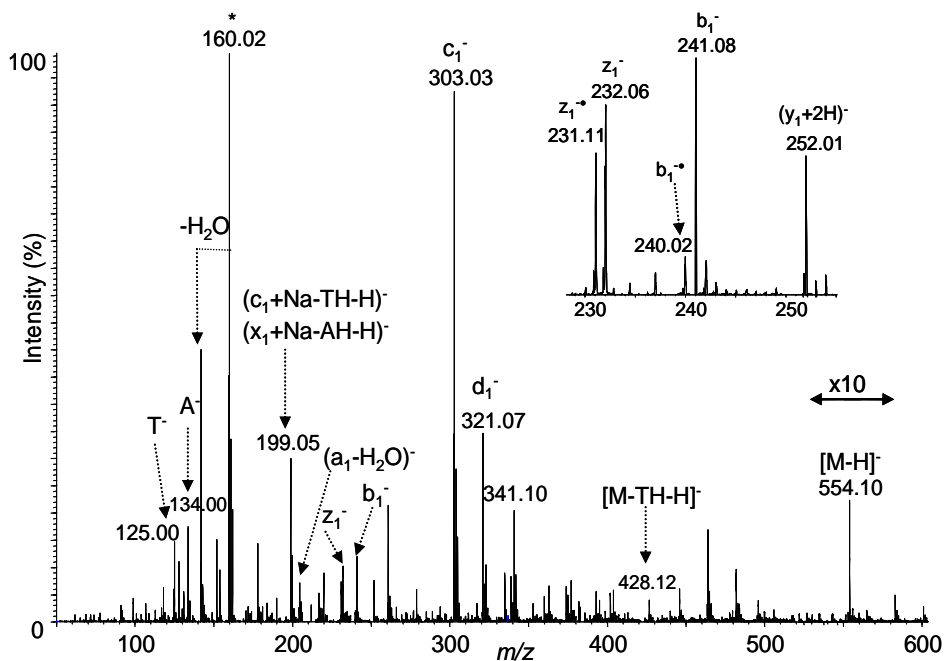
## II.3 Photoionisation d'oligodéoxyribonucléotides en mode négatif

### II.3.1 Cas du dinucléotide d(TA)

La **figure 8** présente le spectre de masse APPI-DA du d(TA) enregistré dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (10:90, v/v) à 350 °C avec 1  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  de toluène. La molécule déprotonée



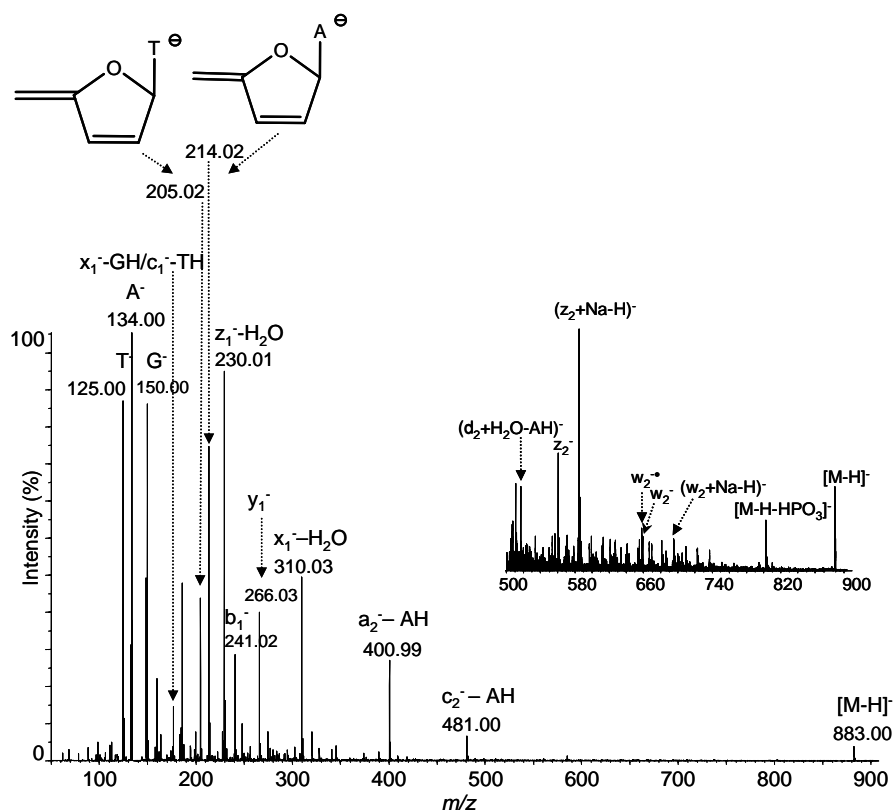
apparaît à  $m/z$  554 accompagnée de nombreux ions fragments. Dans le même ordre d'idée que pour le mode positif, la perte de la thymine neutre à partir de l'ion pseudomoléculaire est observée à  $m/z$  428. Les bases déprotonées T<sup>-</sup> et A<sup>-</sup> sont aussi détectées à  $m/z$  125 et 134 respectivement. La région spectrale entre  $m/z$  190 et 350 contient des ions fragments formés par dissociation du groupe phosphodiester. Des fragmentations du squelette de l'oligonucléotide similaires à celles obtenues en mode d'ionisation positif (*figure 5*) sont observées ici, menant notamment aux ions  $c_1^-$  (pic très intense à  $m/z$  303) et  $z_1^-$  ( $m/z$  232). Les ions radicaux  $z_1^{\bullet-}$  et  $b_1^{\bullet-}$  sont aussi détectés sur le spectre de masse (voir l'insert de la *figure 8*). Par ailleurs, il est intéressant de souligner que les ions fragments  $d_1^-$  et  $b_1^-$ , dont les équivalents sont absents sur le spectre de masse en mode positif, sont maintenant détectés. Ce n'est pas surprenant puisque ces ions possèdent un oxygène en position terminale qui peut facilement retenir la charge négative. Le pic à  $m/z$  199 est attribué sur le spectre de masse aux espèces  $(c_1+\text{Na}-\text{TH}-\text{H})^-$  et  $(x_1+\text{Na}-\text{AH}-\text{H})^-$ , par contre, l'espèce sodée  $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$  n'est pas détectée sur le spectre de masse. La perte de thymine neutre (TH) sur la molécule déprotonée est observée à  $m/z$  428 ( $[\text{M}-\text{TH}-\text{H}]^-$ ) sans la perte d'adénine AH, on peut alors supposer que l'ion  $(c_1+\text{Na}-\text{TH}-\text{H})^-$  a plus de chance d'être formé que l'ion  $(x_1+\text{Na}-\text{AH}-\text{H})^-$ . Le pic de base du spectre de masse est localisé à  $m/z$  160. Il correspond à la forme déprotonée du fragment détecté à  $m/z$  162 et décrit précédemment en mode positif.



**Figure 8** : Spectre de masse APPI-DA du d(TA) enregistré en mode d'ionisation négatif

### II.3.2 Etude du trinuécléotide d(TAG) en mode négatif

La **figure 9** présente le spectre de masse APPI-DA en mode négatif du tridéoxynucléotide d(TAG) enregistré dans H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH (10:90, v/v) à 400 °C avec 1 μL.min<sup>-1</sup> de toluène (dopant). Parallèlement au cas du dinuécléotide, l'espèce [M-H]<sup>-</sup> est observée mais avec une très faible abondance. Par ailleurs, les fragmentations observées de la molécule déprotonée montrent les mêmes tendances. La décomposition la plus importante implique une perte de bases chargées. En effet, les bases déprotonées T<sup>-</sup>, A<sup>-</sup> et G<sup>-</sup> sont détectées à *m/z* 125, 134 et 150 respectivement. Les intensités relatives de ces pics peuvent être reliées aux stabilités relatives des anions correspondants, qui sont à leur tour reliés aux acidités en phase gazeuse des bases nucléiques. Un ordre pour les acidités des bases a été établi par Rodgers *et coll.* qui est le suivant : adénine > thymine > guanine > cytosine [Rodgers, 1995]. Les intensités relatives des nucléobases déprotonées, observées sur le spectre de masse de la **figure 9**, sont en accord avec cet ordre. Les autres ions intéressants apparaissent à *m/z* 205 et 214 et correspondent aux nucléosides ayant subi deux déshydratations consécutives. Des fragments similaires ont été observés en mode d'ionisation positif en FAB-MS/MS par Phillips *et al.* [Phillips, 1993] et par Wang *et al.* en *electrospray* [Wang, 1997]. La région spectrale entre *m/z* 220 et 500 contient des fragments caractéristiques. Outre les fragments issus du squelette de l'oligonuécléotide similaires à ceux obtenus en mode positif, l'ion b<sub>1</sub><sup>-</sup> est ici détecté à *m/z* 241. Ce comportement est similaire à celui du dinuécléotide d(TA). Cependant, contrairement au mode d'ionisation positif, on détecte ici d'intenses fragments a<sub>2</sub><sup>-</sup> et c<sub>2</sub><sup>-</sup> dépourvus de leur adénine. Dans la région des *m/z* 500-900, les ions z<sub>2</sub><sup>-</sup>, (z<sub>2</sub>+Na-H)<sup>-</sup>, w<sub>2</sub><sup>-</sup> et (w<sub>2</sub>+Na-H)<sup>-</sup> sont observés. Un très faible signal provenant d'une perte de 80 unités de masse à partir de l'ion [M-H]<sup>-</sup>, qui pourrait correspondre à une molécule de HPO<sub>3</sub>, est aussi observé.



**Figure 9** : Spectre de masse APPI-DA du d(TAG) enregistré en mode d'ionisation négatif

### III. DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS & CONCLUSION

Lors de cette étude, un didéoxynucléotide et un tridéoxynucléotide ont été étudiés sous photoionisation assistée par dopant. Il est intéressant de souligner que lorsque la lampe UV est éteinte, aucun signal ionique n'est mesuré. Ce qui est regrettable puisque la comparaison des spectres de masse obtenu sans irradiation UV (c'est-à-dire en thermospray) à ceux enregistrés en photoionisation (lampe allumée) se révèle parfois très utile pour l'identification des mécanismes d'ionisation et de fragmentation en APPI [Bagag, 2007]. Néanmoins, quelques points peuvent être discutés. Il apparaît ainsi par ce travail qu'en APPI des pertes de base et de molécules d'eau sont significatives et observées à partir de la molécule protonée et aussi à partir de nombreux ions fragments. Il est connu que des expériences de CID et de dissociation multiphotonique infrarouge (IRMPD) d'oligonucléotides produisent d'intenses pertes de base et d'eau [Wu, 2004 et Håkansson, 2003]. Le cas de l'ECD n'est pas très clair puisque dans certains cas ces réactions ne sont pas observées [Håkansson, 2003] alors que dans d'autres cas

elles le sont [Schultz, 2004] et qu'elles paraissent être dépendantes des conditions expérimentales. Les pertes de base et les déshydratations observées au cours de cette étude pourraient provenir d'une activation thermique des oligonucléotides en source. Il est donc raisonnable de supposer que le chauffage de la source induit une activation partielle et une fragmentation pour laquelle les oligonucléotides apparaissent être sensibles.

En CID et dans les deux modes de polarités, les fragments les plus abondants rapportés dans la littérature correspondent aux nucléobases chargées et aux pertes de base neutre sur les ions pseudomoléculaires [McLuckey,]. L'IRMPD en mode positif fournit des voies de fragmentations très similaires [Håkansson, 2003]. En APPI positif, il a été montré que la réaction de protonation est assez exothermique pour conduire à d'intenses fragmentations en source [Bagag, 2007]. Outre la possibilité d'activation thermique, les réactions de transfert de proton avec le dopant ou avec des clusters de solvants doivent être pris en compte pour la compréhension des mécanismes proposés, notamment la formation des bases protonées pour lesquelles les intensités relatives suivent l'échelle des affinités protoniques des bases.

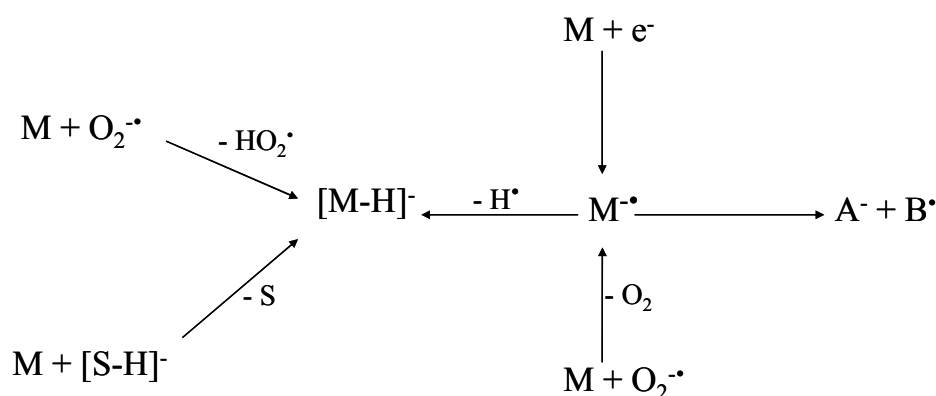
Concernant le dinucléotide d(TA) et dans les deux modes d'ionisation, l'ion fragment majoritaire a été attribué à la thymidine partiellement décomposée (*figures 5 et 8*), de tels ions sont reportés pour la première fois ici. Nous avons aussi reporté des ions fragments radicaux, qui ont été détectés auparavant seulement en ECD notamment les ions  $a^{\bullet}$ ,  $y^{\bullet}$  et  $z^{\bullet}$ . A partir de ces résultats, il apparaît clairement que les différentes fragmentations observées, notamment en mode d'ionisation positif, ne sont pas simplement expliquées par des réactions de protonation ou une activation thermique de l'analyte. Ce qui nous amène logiquement à considérer une éventuelle participation d'ions précurseurs radicaux dans ces mécanismes. En APPI, la photoionisation du dopant libère dans le milieu des photoélectrons de faible énergie et leurs possible implication dans les mécanismes réactionnels doit être prise en compte et ne doit pas être négligée. Les photoélectrons sont connus pour être largement responsables de l'ionisation en mode négatif. Par exemple, il est connu que la capture de photoélectrons sur une espèce neutre produit les ions  $[M-H]^{-}$  [Kauppila, 2004]. Des études antérieures [Delobel, 2003 et Debois, 2006] ont démontré la faisabilité d'un mécanisme de type ECD/ETD pour la fragmentation de peptides en APPI. Par conséquent, une capture de photoélectrons par les oligonucléotides peut être envisagée comme étant à l'origine des fragments de type ECD observés ici.

Néanmoins, la séquence des événements n'est pas tout à fait claire. Les différentes espèces, telles que les ions radicaux  $a^{\cdot}$  et  $z^{\cdot}$  par exemple, sont détectés en APPI et décrites dans la littérature comme provenant d'une capture d'électrons sur l'oligonucléotide dichargé [Håkansson, 2003]. L'observation de ce type de fragments nécessite donc, en mode d'ionisation positif, un ion précurseur doublement protoné. Or, dans cette étude, nous n'observons pas de molécule doublement chargée en mode d'ionisation positif. Il est peu probable que l'espèce doublement chargée se forme et réagisse immédiatement et totalement avec les photoélectrons pour ne pas être détectée. Une forme zwitterionique des oligonucléotides, dans laquelle la charge globale est de +1 où les deux bases nucléiques sont protonées et le groupement phosphate déprotoné, peut être envisagée comme un précurseur possible pour expliquer ces fragments radicalaires. La forme zwitterionique est un passage nécessaire dans le mécanisme de cette fragmentation. Håkansson *et al.* ont rapporté la formation de fragments doublement chargés à partir d'oligonucléotides doublement protonés (du tétra- jusqu'à l'heptanucléotide) soumis aux conditions ECD. Les auteurs ont interprété ces résultats par la formation d'un intermédiaire zwitterionique. Pour le dinucléotide d(TA), une espèce zwitterionique pourrait correspondre à la protonation de deux bases adjacentes. Une telle quantité de charge sur une si petite molécule paraît peu probable en particulier du fait de la faible affinité protonique de la thymine. Rappelons que dans le cas de petits oligomères d'ADN (moins de 4 paires de bases), il a été montré que les formes zwitterioniques n'étaient pas favorisées en phase gazeuse [Gidden, 2003].

Un autre mécanisme possible impliquerait une capture électronique par une molécule monochargée pouvant conduire à des fragments de type ECD neutres. Ces derniers, à leur tour, s'ioniseraient par les réactions classiques de l'APPI. Ce mécanisme met en jeu une protonation de la molécule d'oligonucléotide, une capture d'électron et une dissociation suivie d'une autre étape de réaction de protonation/transfert de charge pour conduire aux fragments observés. Une telle séquence d'événements rend ce mécanisme très peu crédible.

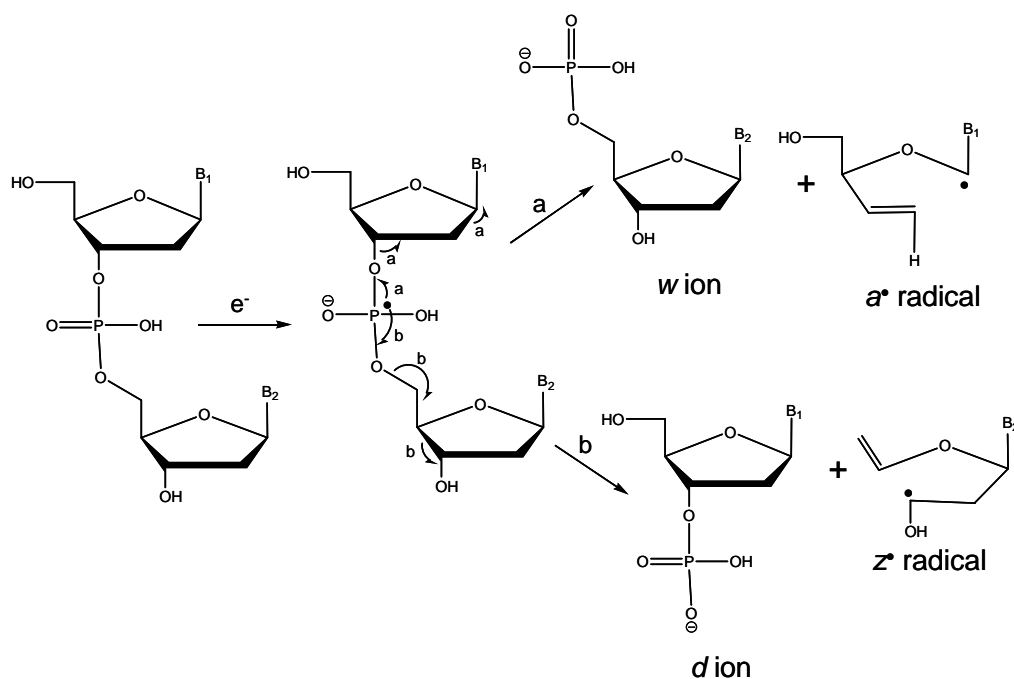
Un autre mécanisme, de loin le plus probable, pourrait impliquer une capture d'électron par la molécule neutre. La capacité à former simultanément des espèces négatives et positives dans la source d'ion APPI a été démontrée récemment par le groupe de Marshall et confirme notre suggestion [Purcell, 2007]. Ainsi, la capture d'électron par une espèce neutre produit des fragments anioniques et leurs contreparties neutres. Ces derniers peuvent être ionisés par échange de charge ou transfert de proton, avec le dopant. Par ailleurs, ce mécanisme possède l'avantage d'expliquer les fragmentations observées dans les deux modes d'ionisation. Un appui supplémentaire à cette hypothèse résulte de la comparaison des *figures*

**3 et 8.** Les ions  $c_1^-$  et  $d_1^-$  sont observés (en mode négatif) sur la **figure 8** alors que les ions radicalaires  $y_1^{+\bullet}$  et  $z_1^{+\bullet}$ , complémentaires des ions  $c_1^-$  et  $d_1^-$ , sont détectés (en mode positif) sur la **figure 3**. Ainsi, l'attachement d'un électron sur la molécule produirait un ion temporaire négatif, de courte durée de vie, qui n'est pas observé sur les spectres de masse (pas assez stable pour être détecté). Cet ion négatif  $M^{\bullet-}$  pourrait évoluer vers une décomposition rapide pour former l'espèce déprotonée  $[M-H]^-$  ou des ions de séquence spécifiques à nombre pair d'électrons avec ses contreparties radicalaires, comme schématisé par la **figure 10**.



**Figure 10** : Schéma récapitulatif permettant d'expliquer la formation des espèces observées avec A et B représentant des ions fragments de type ECD

Différents mécanismes de fragmentation des brins d'ADN ont été décrits dans la littérature [Li, 2003 et Berdys, 2004]. Brièvement, deux modèles ont été proposés pour expliquer les fragmentations observées sur de l'ADN simple brin. D'une part, Li *et al.* ont proposé que les électrons de faible énergie soient d'abord capturés par le phosphate, formant anion radical centré sur le phosphate [Li, 2003]. D'autre part, Zheng *et al.* ont proposé que la fragmentation des oligonucléotides est initiée par un attachement d'électrons sur les bases nucléiques suivi d'un transfert de charge sur le groupement phosphate [Zheng, 2005]. Néanmoins, dans ces deux mécanismes, le groupe phosphodiester possède l'électron, ce qui provoque la fragmentation du brin. Nos résultats sont en accord complet avec cette hypothèse, comme on l'a résumé sur la **figure 11**.



**Figure 11** : Mécanisme proposé par Zheng *et al.* pour expliquer le clivage de la liaison phosphodiester dans l'ADN [Zheng, 2005]

Ce travail rapporte une étude d'un di- et tridéoxynucléotide, dTA et dTAG, sous photoionisation assistée (APPI-DA) dans les deux modes d'ionisation. D'intenses fragmentations sont observées dans tous les cas et proviennent de trois mécanismes bien identifiés: activation thermique (issu lors du chauffage de la source), réaction de protonation exothermique et capture d'électrons. Plusieurs ions fragments sont reportés ici pour la première fois. En effet, la série d'ions à nombre pair d'électrons d/w sont présents dans les spectres de masse mais nous détectons aussi de nombreux ions a/z (espèces à nombre pair d'électrons et leur contrepartie radicalaire), (a/z - B), c/x, c - B et les ions d/w avec une perte minime de la base nucléique sur l'ion précurseur. La présence d'ions fragments spécifiques de la séquence est similaire au comportement de l'ADN observé en capture électronique dissociative [Yang, 2006]. L'analyse des fragments de type ECD observés pour le dinucléotide dTA suggère que, pour cette classe de composés, la capture d'électron sur la molécule neutre produit un ion radical temporaire qui est à l'origine de ces voies de fragmentations. Travailler en présence de dopant (sous conditions assistées) apparaît être important pour l'étude des dégâts des radiations ionisantes sur des molécules biologiques et nous permet d'émettre l'hypothèse que le mécanisme de fragmentation des brins d'ADN est

provoqué par une capture électronique. Ces résultats sont donc importants pour l'étude de l'effet de radiations ionisantes sur l'ADN et les acides nucléiques.

Enfin, on pourrait essayer d'examiner les modifications sur les spectres de masse qu'apporterait l'utilisation de l'azote comme gaz nébuliseur au lieu de l'oxygène.



## REFERENCES VI

### **B**

[Bagag, 2007] A. Bagag, A. Giuliani et O. Lapr evote, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of nucleic bases, ribonucleosides and ribonucleotides, *Int. J. Mass Spectrom.* 264, 2007, 1-9

[Barry, 1995] J.P. Barry, P. Vouros, A. Van Schepdael et S.J. Law, Mass and sequence verification of modified oligonucleotides using electrospray tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 30, 1995, 993-1006

[Berdys, 2004] J. Berdys, I. Anusiewicz, P. Skurski et J. Simons, Damage to model DNA fragments from very low-energy (< 1eV) electrons, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 2004, 6441-6447

[Biemann, 1988] K. Biemann, Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 16, 1988, 99-111

[Boschenok, 1996] J. Boschenok et M.M. Sheil, Electrospray tandem mass spectrometry of nucleotides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10, 1996, 144-149

### **C**

[Cerny, 1986] R. Cerny, M.L. Gross et L. Grotjahn, Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the study of dinucleotides, *Anal. Biochem.*, 16, 1986, 424-435

### **D**

[Debois, 2006] D. Debois, A. Giuliani et O. Lapr evote, Fragmentation induced in atmospheric pressure photoionization of peptides, *J. Mass Spectrom.*, 41, 2006, 1554-1560

[Del Bene, 1983] J.E. Del Bene, Molecular orbital study of the protonation of DNA bases, *J. Phys. Chem.*, 87, 1983, 367-371

[Delobel, 2006] A. Delobel, S. Roy, D. Touboul, K. Gaudin, D.P. Germain, A. Baillet, F. Brion, P. Prognon, P. Chaminade et O. Laprévotte, Atmospheric pressure photoionization coupled to porous graphitic carbon liquid chromatography for the analysis of globotriaosylceramides. Application to Fabry disease, *J. Mass Spectrom.*, 41, 2006, 50-58

[Delobel, 2003] A. Delobel, F. Halgand, B. Laffranchisse-Gosse, H. Snijders et O. Laprévotte, Characterization of hydrophobic peptides by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 75, 2003, 5961-5968

[Ding, 1995] J. Ding et R.J. Andereg, Specific and nonspecific dimer formation in the electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 6, 1995, 159-164

## G

[Gidden, 2003] J. Gidden et M.T. Bowers, Gas-phase conformations of deprotonated trinucleotides (dGTT<sup>-</sup>, dTGT<sup>-</sup>, and dTTG<sup>-</sup>): the question of zwitterion formation, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14, 2003, 161-170

[Giuliani, 2006] A. Giuliani, D. Debois et O. Laprévotte, Study of a bisquaternary ammonium salt by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 12, 2006, 189-197

[Greco, 1990] F. Greco, A. Liguori, G. Sindona et N. Uccella, Gas phase proton affinity of deoxyribonucleosides and related nucleobases by fast atom bombardment tandem mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 1990, 9092-9096

## H

[Håkansson, 2003] K. Håkansson, R.R. Hudgins, A.G. Marshall et R.A.J. O'Hair, Electron capture dissociation and infrared multiphoton dissociation of oligodeoxynucleotide dication, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14, 2003, 23-41

[Ho, 1997] Y. Ho et P. Kebarle, Studies of the dissociation mechanisms of deprotonated mononucleotides by energy resolved collision-induced dissociation, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 165-166, 1997, 433-455

## $\mathcal{K}$

[Kauppila, 2004] T.J. Kauppila, T. Kotiaho, R. Kostianen et A.P. Bruins, Negative ion-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 2004, 203-211

## $\mathcal{L}$

[Laprévôte, 1992] O. Laprévôte, C. Girard, B.C. Das et R. Mukherjee, Usefulness of fast-atom bombardment and collision-activated dissociation linked scan (B/E) mass spectrometry for structural investigation of indole alkaloids, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 6, 1992, 318-321

[Li, 2003] X. Li, M.D. Sevilla et L. Sanche, Density functional theory studies of electron interaction with DNA: can zero eV electrons induce strand breaks?, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2003, 13668-13669

[Linscheid, 1983] M. Linscheid et A.L. Burlingame, Collisionally activated dissociation of field desorbed protonated dinucleoside phosphates, *Org. Mass Spectrom.*, 18, 1983, 245-247

## $\mathcal{M}$

[McLucky, 1992] S.A. McLucky, G.J. Van Berkel et G.L. Glish, Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 3, 1992, 60-70

[McLucky, 1995] S.A. McLucky, G. Vaidyanathan et S. Habibi-Goudarzi, Charged vs neutral nucleobase loss from multiply charged oligonucleotide anions, *J. Mass Spectrom.*, 30, 1995, 1222-1229

[McLuckey, 1997] S.A. McLuckey et G. Vaidyanathan, Charge state effects in the decompositions of single-nucleobase oligonucleotide polyanions, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 162, 1997, 1-16

### *P*

[Phillips, 1993] D.R. Phillips et J.A. McCloskey, A comprehensive study of the low energy collision-induced dissociation of dinucleoside monophosphates, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 128, 1993, 61-82

[Purcell, 2007] J.M. Purcell, C.L. Hendrickson, R.P. Rodgers et A.G. Marshall, Atmospheric pressure photoionization proton transfer for complex organic mixtures investigated by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18, 2007, 1682-1689

### *R*

[Robb, 2000] D.B. Robb, T.R. Covey and A.P. Bruins, Atmospheric Pressure Photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 72, 2000, 3653-3659

[Rodgers, 1995] M.T. Rodgers, S. Campbell, E. Marzluff et J.L. Beauchamp, Low energy collision-induced dissociation of deprotonated dinucleotides: determination of the energetically favored dissociation pathways and the relative acidities of the nucleic acid bases, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes*, 148, 1995, 1-23

[Roepstorff, 1984] P. Roepstorff et J. Fohlman, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 1984, 601-602

### *S*

[Schultz, 2004] K.N. Schultz et K. Håkansson, Rapid electron capture dissociation of mass-selectively accumulated oligodeoxynucleotide dications, *Int. J. Mass Spectrom.*, 234, 2004, 123-130

[Short, 2007] L.C. Short, S.S. Cai et J.A. Syage, APPI-MS: Effects of mobile phases and VUV lamps on the detection of PAH compounds, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 2007, 589-599

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

### V

[Vrkcic, 2000] A.K. Vrkcic, R.A.J. O'Hair, S. Foote et G.E. Reid, Fragmentation reactions of all 64 protonated trimer oligodeoxynucleotides and 16 mixed base tetramer oligodeoxynucleotides via tandem mass spectrometry in an ion trap, *Int. J. Mass Spectrom.* 194, 2000, 145-164

### W

[Wan, 2000] K.X. wan, T. Shibue et M.L. Gross, Gas-phase stability of double-stranded oligodeoxynucleotides and their noncovalent complexes with DNA-binding drugs as revealed by collisional activation in an ion trap, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11, 2000, 450-457

[Wan, 2001a] K.X. Wan et M.L. Gross, Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides: effects of replacing phosphates with methylphosphonates and thymines with other bases in T-rich sequences, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 2001, 580-589

[Wan, 2001b] K.X. Wan, J. Gross, F. Hillenkamp et M.L. Gross, Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides studied by H/D exchange and electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 2001, 193-205

[Wang, 1997] P.P. Wang, M.G. Bartlett et L.B. Martin, Electrospray collision induced dissociation mass spectra of positively charged oligonucleotides, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 11, 1997, 846-856

[Wu, 2004] J. Wu et S.A. McLuckey, Gas-phase fragmentation of oligonucleotide ions, *Int. J. Mass Spectrom.*, 237, 2004, 197-241

## $\Upsilon$

[Yang, 2006] J. Yang et K. Håkansson, Fragmentation of oligoribonucleotides from gas phase ion electron reactions, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 17, 2006, 1369-1375

## Z

[Zheng, 2005] Y. Zheng, P. Cloutier, D.J. Hunting L. Sanche et J.R. Wagner, Chemical basis of DNA sugar-phosphate cleavage by low-energy electrons, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 2005, 16592-16598

***Chapitre 7 :***  
***Etude d'oligosaccharides***

## CHAPITRE 7 : Etude d'oligosaccharides

### I. INTRODUCTION GENERALE

L'analyse structurale par spectrométrie de masse des oligosaccharides se révèle souvent difficile, du fait de la complexité de la stéréochimie des résidus. En effet, la caractérisation complète des sucres implique de déterminer la nature des résidus osidiques, la position des liaisons glycosidiques ainsi que la stéréochimie des centres asymétriques. Dans les années 1980, l'avènement des techniques d'ionisation douce contribue au développement considérable des études concernant les sucres et plus généralement les hétérosides. La formation d'espèces stables et abondantes en phase gazeuse permet l'étude d'oligosaccharides complexes.

L'utilisation de la spectrométrie de masse pour caractériser les oligosaccharides n'est pas récente. En effet, la GC-MS permet depuis plusieurs décennies l'analyse de monosaccharides ou de très petits oligosaccharides. Bien entendu, l'utilisation de la GC-MS requiert l'analyse de ces molécules sous forme de dérivés méthylés, acétylés ou triméthylsilylés. Dans les années 1960, Björndal *et al.* enregistrent les spectres en ionisation électronique d'alditols acétylés partiellement méthylés [Björndal, 1967]. Aujourd'hui, la GC-MS est encore utilisée de manière intensive pour déterminer la composition en ose des oligosaccharides. Cette détermination se base le plus fréquemment sur l'hydrolyse ou la méthanolyse de l'oligosaccharide en monosaccharides qui après conversion en dérivés triméthylsilylés sont analysés par GC-MS [Merkle, 1994]. La GC-MS est également largement utilisée dans une méthode appelée l'analyse par méthylation qui permet de déterminer l'isomère de position de chaque liaison glycosidique d'un oligosaccharide [Hellerqvist, 1990]. Cette méthode nécessite un processus de dérivatisation plus complexe de manière à marquer distinctement les groupements hydroxyles libres de ceux qui forment les liaisons glycosidiques. Dans sa version la plus utilisée, cette méthode requiert l'hydrolyse de l'oligosaccharide préalablement perméthylé. Ensuite, les monosaccharides résultants sont réduits puis acétylés pour donner des alditols acétates partiellement méthylés. L'analyse de ces molécules par GC-MS permet de déterminer la position des acétyles et donc de caractériser les hydroxyles impliqués dans les liaisons glycosidiques de l'oligosaccharide initial.



L'analyse d'oligosaccharides par spectrométrie de masse sans recourir à une dégradation préalable a pris réellement son essor grâce à l'apparition du FAB et plus récemment de l'ESI et du MALDI. Comparée aux méthodes plus récentes comme l'ESI et le MALDI, le FAB montre une faible efficacité d'ionisation. Cependant, les oligosaccharides natifs neutres sont plus difficilement ionisables par ESI que par MALDI. En effet, vu leur faible acidité ou basicité, ils ne sont pas chargés efficacement par protonation ou déprotonation et donc s'ionisent peu par *electrospray*. L'intensité de la réponse des oligosaccharides natifs neutres est nettement moindre que celle obtenue pour une quantité comparable de peptides ou protéines [Bahr, 1997]. Seuls les oligosaccharides natifs phosphorylés ou sulfatés ainsi que les oligosaccharides contenant de l'acide sialique peuvent être analysés avec une grande sensibilité par ESI en mode négatif.

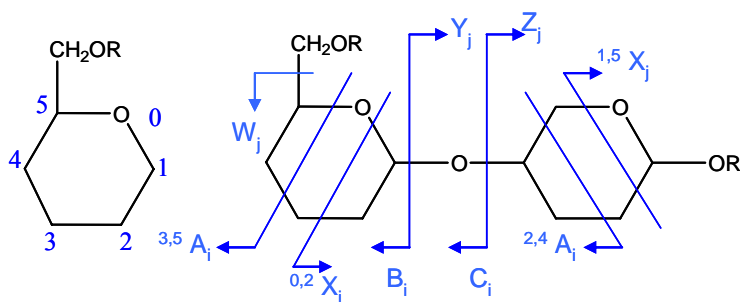
D'une façon générale, le fait que les oligosaccharides natifs soient difficiles à ioniser, incite à l'analyse de ces molécules par spectrométrie de masse sous forme de dérivés et plus particulièrement sous forme de dérivés peracétylés, perméthylés et dérivés par amination réductrice [Dell, 1990]. Ces différents dérivés montrent un accroissement de la réponse dû à leur caractère hydrophobe qui permet l'usage de solvants organiques plus volatils. L'amination réductrice provoque une augmentation de la réponse en raison non seulement de son caractère hydrophobe mais surtout par l'introduction d'un site de protonation ou d'une charge permanente. La perméthylation est préférée à la peracétylation car elle provoque un accroissement moins important de la masse et donc permet son application à des oligosaccharides contenant un plus grand nombre d'oses. Comme nous le verrons par la suite, l'utilisation des oligosaccharides dérivatisés ne permet pas uniquement d'augmenter leur détection mais également d'apporter des informations structurales supplémentaires lors de leur analyse par spectrométrie de masse en tandem.

## II. NOMENCLATURE ET OBSERVATION DES FRAGMENTS

Etant donné que les méthodes classiques d'ionisation permettant l'analyse des oligosaccharides produisent une fragmentation minimale, l'étude de la fragmentation des ions pseudomoléculaires de ces molécules nécessite le recours à la photoionisation. Dans ce travail, cette technique est appliquée aux ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  d'oligosaccharides natifs ou dérivés obtenus par APPI. La fragmentation des oligosaccharides

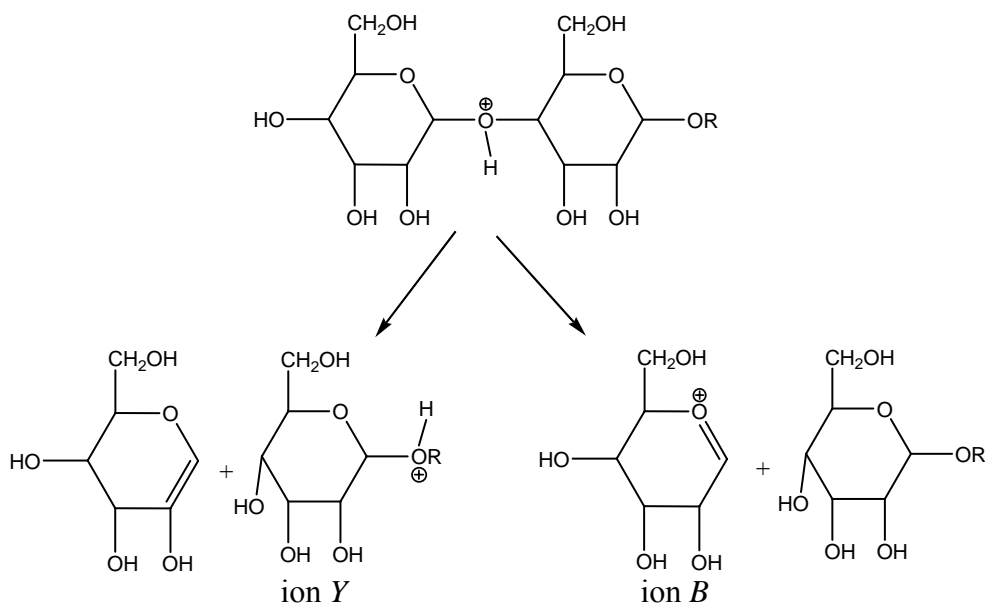
est fortement influencée par un grand nombre de facteurs tels que la méthode d'ionisation, l'analyseur, la nature de la dérivation, la nature de l'ion pseudomoléculaire, ... Cependant, quels que soient ces facteurs, cinq séries d'ions fragments peuvent être observés.

Une nomenclature a été proposée par Domon et Costello pour caractériser les différents fragments obtenus par spectrométrie de masse quelle que soit la méthode utilisée pour les produire [Domon, 1988]. Les fragments retenant la charge sur le côté non réducteur sont appelés *A*, *B* ou *C*, ceux retenant la charge sur l'extrémité réductrice sont appelés *X*, *Y* et *Z* suivant qu'il coupent le cycle ou la liaison glycosidique (**figure 1**). Le numéro en indice correspond au numéro du lien glycosidique rompu tandis que les exposants présents à gauche des fragments *A* et *X* correspondent aux liaisons rompues pour observer ces fragments, les liaisons étant numérotées comme indiqué sur la figure.

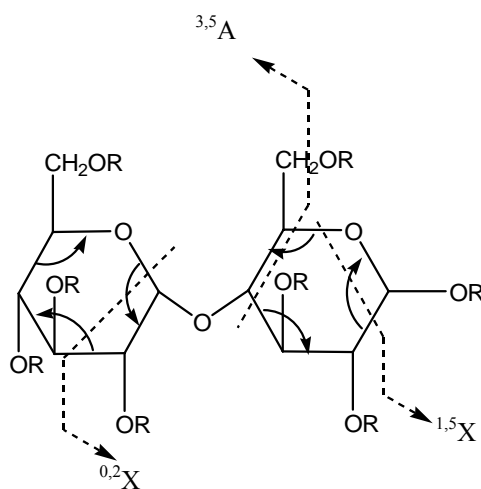


**Figure 1** : Nomenclature de fragmentation des polysaccharides proposée par Domon et Costello [Domon, 1988]

Les fragments le plus souvent retrouvés dans les spectres à basse énergie des molécules protonées correspondent à la rupture du lien glycosidique avec rétention de l'atome d'oxygène sur la partie réductrice suivant un mécanisme présenté sur la **figure 2** pour donner les ions de type *B* et *Y*. Quant aux ions fragments coupant le cycle (ions de type *A* et *X*), leur formation est favorisée à haute énergie à partir des adduits sodiques. Ces fragments sont produits par un mécanisme de type CRF (*Charge Remote Fragmentation*) décrit à la **figure 3**. Ce mécanisme résulte de réarrangements intracycliques et peut, dans certains cas, être déterminant pour définir la nature des isoméries de position. De nombreuses stratégies ont été développées pour favoriser ce type de clivage : addition de métaux (lithium, cobalt) [König, 1998] et addition d'alcalino-terreux [Lemoine, 1993].



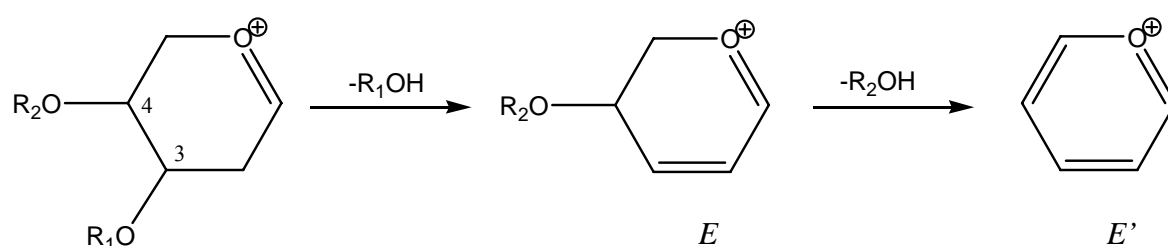
**Figure 2** : Mécanisme de formation des ions de type *B* et *Y* en mode positif



**Figure 3** : Mécanisme de formation des ions de type *A* et *X* en mode positif

Des ions fragments dits de seconde génération peuvent également se former, qui résultent du clivage consécutif de deux liaisons glycosidiques. Le premier clivage, classique, donne un ion de première génération, lequel subit ensuite une autre fragmentation pour conduire à un ion de seconde génération. Par exemple, des ions, qui possèdent une structure de type oxonium, peuvent perdre un puis deux substituants du cycle osidique, ce qui conduit à des ions secondaires stabilisés par conjugaison. De tels fragments sont observés par Domon et Costello mais non labellisés, sous forme principalement de couple de pics distants de 32 uma

(perte de méthanol dans le cas de dérivés perméthylés) ou quelques fois d'ions séparés par la masse d'un résidu HexOH. Le groupe partant est celui situé en position 3. En 1997, cette voie de dissociation a été rationalisée et ces fragments sont nommés *E* et *E'* suivant qu'ils proviennent de la perte d'un et de deux substituants respectivement [Viseux, 1997]. L'observation de tels signaux permet d'appréhender la substitution en position 3 et 4 d'un résidu donné.



**Figure 4** : Formation des ions *E* et *E'* selon Viseux *et al.*

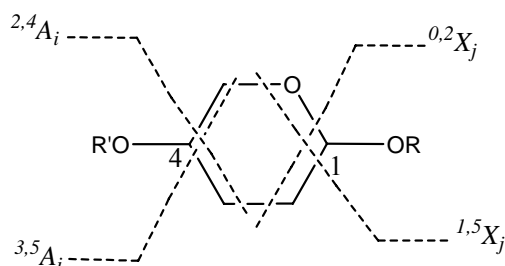
Lemoine *et al.* [Lemoine, 1993] ont observé par ailleurs la présence d'ions issus d'un clivage entre les atomes de carbone 5 et 6 de composés perméthylés cationisés par le sodium, accompagné d'une perte de méthanol, dans le cas de deux résidus reliés en 1-6. Ces ions sont présents sur les spectres CID à haute énergie de collision, sont dénommés  $W_j$  et comportent l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide.

Les fragments  $A_i$  et  $X_i$ , de même que les ions  $W_j$  décrits ci-dessus (**figure 1**) doivent potentiellement permettre d'identifier la position de chaque liaison glycosidique par leur présence ou leur absence sur les spectres de masse. Un tableau a été proposé présentant les pics diagnostiques de chaque liaison en mode d'ionisation positif [Lemoine, 1993].

**Tableau 1** : Pics diagnostiques potentiels pour déterminer l'isomérisation de position (+ : présence, - : absence)

Position des hydroxyles sur le cycle qui forment des liaisons glycosidiques	Frgaments						
	$^{0,2}X_j$	$^{1,5}X_j$	$W_j$	$^{0,4}A_i$	$^{1,3}A_i$	$^{2,4}A_i$	$^{3,5}A_i$
1 → 2	-	+	-	-	+	-	-
1 → 3	+	+	-	-	+	+	-
1 → 4	+	+	-	-	-	+	+
1 → 6	+	+	+	+	-	-	+

Par exemple, l'implication des positions 1 et 4 dans des liaisons glycosidiques doit ne permettre que la formation d'ions  $^{0,2}X$ ,  $^{1,5}X$ ,  $^{2,4}A$  et  $^{3,5}A$  (**figure 5**).



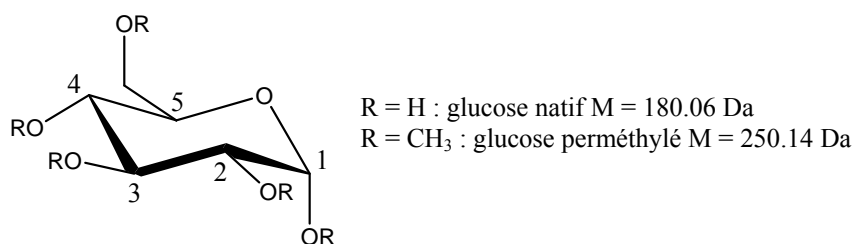
**Figure 5** : Fragments attendus pour un saccharide substitué en (1-4)

La perméthylation des polysaccharides renseigne sur les isoméries de position des liaisons interglycosidiques. Les ions fragments obtenus à partir d'oligosaccharides perméthylés sont différenciables selon qu'ils sont issus d'un simple ou d'un double clivage, ce qui évite toute confusion lors de l'interprétation des fragments [Viseux, 1998]. Ainsi, dériver les carbohydrates par perméthylation améliore de manière significative l'intensité des ions détectés et permet aussi une meilleure interprétation des fragmentations obtenues. Le protocole que nous avons utilisé pour la perméthylation des sucres est celui décrit par Ciucanu et Kerek en 1984 et amélioré récemment [Ciucanu, 1984 et 2003].

### III. ETUDE D'OLIGOSACCHARIDES NATIFS

#### III.1 Etude d'un sucre simple : le glucose

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à un monosaccharide simple : le glucose dont la formule est présentée sur la **figure 6**.



**Figure 6** : Structure du glucose

### III.1.1 Conditions expérimentales

Le **tableau 2** ci-dessous rapporte les conditions expérimentales utilisées lors de cette étude.

**Tableau 2** : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse des oligosaccharides

Quantité injectée :	20 $\mu\text{L}$ à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Solvant LC :	$\text{H}_2\text{O/MeOH}$ (50:50, v/v) ou $\text{CHCl}_3$
Débit solvant LC :	200 $\mu\text{L.min}^{-1}$
Dopants testés :	Anisole, Toluène ou Acétone

GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1
50	20	25	400	3	1500	10	50	15	2

Comme on peut le voir sur ce tableau, les paramètres instrumentaux du spectromètre de masse ont été ajustés de telle façon à obtenir un rapport signal/bruit satisfaisant tout en évitant de faire du CID en source. Les valeurs des tensions DP et FP sont portées à leur valeur minimum afin de travailler dans des conditions les moins activantes possible.

### III.1.2 Photoionisation du glucose en mode positif dans le système de solvant $\text{H}_2\text{O/MeOH}$ (50:50, v/v)

Tout d'abord, l'analyse du spectre obtenu en absence de photons UV et à 400°C indique qu'il n'y a pas de dégradation thermique du glucose. Le spectre met en évidence la présence de l'espèce cationisée  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  : aucun fragment n'est observé. Les espèces cationisées observées lorsque la lampe est éteinte sont des espèces préformées en solution, qui sont transférées en phase gazeuse par un processus de type *Thermospray* (désolvation par chauffage d'espèces chargées préformées en solution). Notons que le fait d'éteindre et d'allumer la lampe peut, dans ce cas, fournir des informations complémentaires.

La **figure 7a** présente le spectre APPI en mode d'ionisation positif du glucose natif enregistré dans le système  $\text{H}_2\text{O/MeOH}$  (50 :50, v/v) sans présence de dopant. Ce spectre fait

apparaître une espèce cationisée  $[M+Na]^+$  majoritaire à  $m/z$  203 sans aucune fragmentation. Le toluène, introduit dans la source comme dopant, conduit à la formation de plusieurs ions fragments (**figure 7b**). L'espèce  $[M+Na]^+$  est cette fois-ci minoritaire laissant place notamment à des pertes d'eau et de méthanol (sur le C5) à partir de l'espèce protonée (qui n'est pas détectée) pour donner respectivement les ions à  $m/z$  163 et 149. Ce spectre est aussi caractérisé par la présence d'un fragment à  $m/z$  130 issu d'une déshydratation suivie d'une perte de méthanol à partir du cation radical du glucose qui n'est pas détecté sur le spectre de masse. Enfin, soulignons la présence d'un ion fragment provenant de l'espèce disodée du glucose détecté à  $m/z$  177.

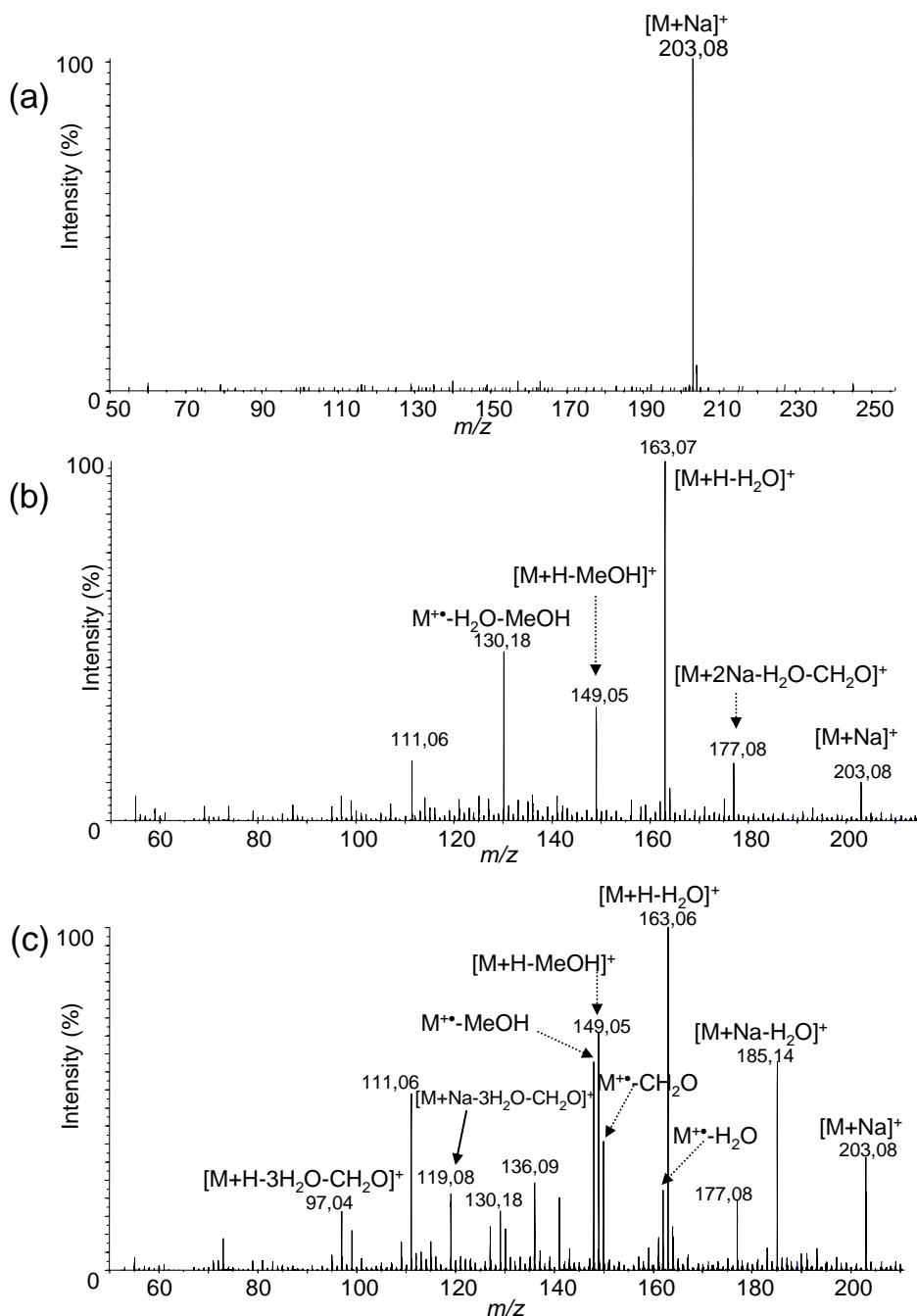
Trois types de fragments peuvent être différenciés selon la nature de l'ion précurseur. En effet, on distingue ici des ions issus de l'espèce protonée (pic à  $m/z$  163 et 149) du cation radical  $M^{\bullet+}$  ( $m/z$  130) et de l'espèce disodée ( $m/z$  177).

Le rôle du dopant, qui subit une photoionisation par les photons UV et induit ainsi la formation d'électrons et d'atomes d'hydrogène  $H^{\bullet}$  et  $H^+$ , est indéniable. Afin de mieux comprendre l'origine de ces fragmentations, et essayer de les contrôler par la suite, nous avons voulu étudier l'influence du dopant en employant cette fois-ci un dopant aprotique : l'hexafluorobenzène ( $C_6F_6$ ). Le spectre DA-APPI, obtenu en infusant ce dopant à 6  $\mu\text{L}/\text{min}$ , est présenté sur la **figure 7c**. Ce spectre n'est pas tout à fait identique au précédent (**figure 7b**). Malgré ses similitudes, par la présence notamment des pics à  $m/z$  177, 163, 149, 130 et 111, certains ions, absents avec le toluène, sont observés ici. En effet, nous retrouvons des ions fragments issus du cation radical du glucose d'abondances relatives importantes : notamment des pertes d'eau ( $m/z$  162), de formaldéhyde ( $m/z$  150) et de méthanol ( $m/z$  148) sur l'ion moléculaire  $M^{\bullet+}$ . La deuxième famille de fragments observés ici correspond essentiellement à des déshydratations (3 pertes d' $H_2O$ ) suivies d'une perte d'une molécule de formaldéhyde à partir des espèces protonées et sodées pour donner les ions à  $m/z$  97 et 119 respectivement.

*En résumé, l'analyse de ces spectres permet de mettre en avant plusieurs faits expérimentaux :*

- *En absence de photons UV et/ou de dopant, on n'observe que des espèces moléculaires intactes et cationisées*

- Lorsqu'on est en présence à la fois de photons UV et de dopant, les espèces moléculaires deviennent minoritaires et on n'observe que des fragments protonés, cationisés ou radicalux
- En présence de dopant aprotique ( $C_6F_6$ ), on augmente l'abondance des ions fragments provenant de l'espèce  $M^{\bullet}$  du glucose

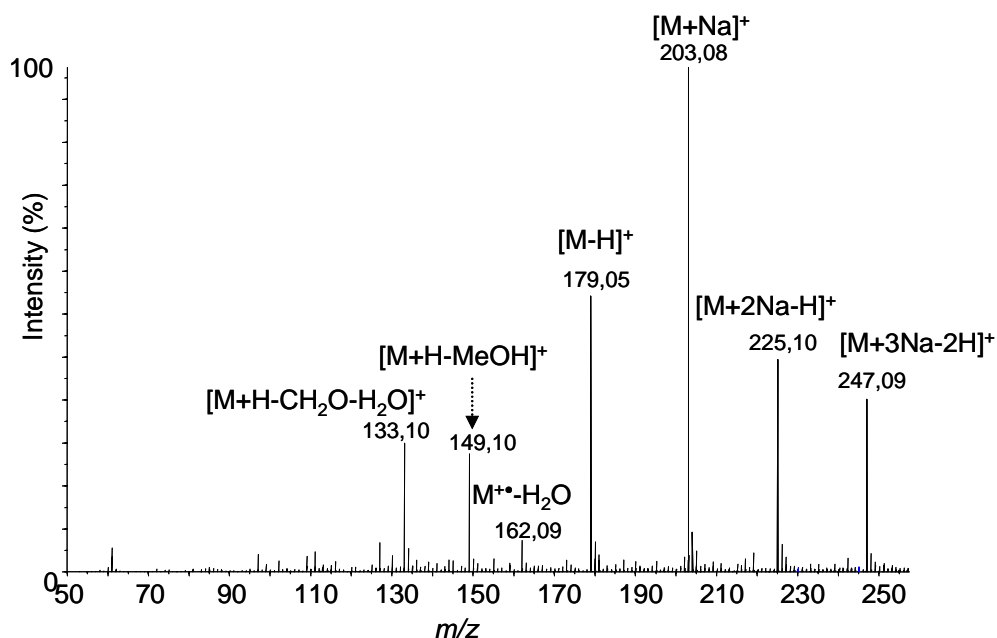


**Figure 7** : Spectres de masse APPI du glucose natif enregistrés dans le système de solvant  $H_2O/MeOH$  (50:50, v/v) en mode positif (a) sans dopant, (b) en infusant du toluène à  $1 \mu L \cdot min^{-1}$  et (c) avec de l'hexafluorobenzène ( $C_6F_6$ ) à  $6 \mu L \cdot min^{-1}$



### III.1.3 Photoionisation du glucose en mode positif dans le chloroforme

La **figure 8** représente le spectre de masse du glucose enregistré dans un autre système de solvant : le chloroforme. Ce spectre fait apparaître des espèces cationisées par le sodium à  $m/z$  203, 225 et 247 relativement abondantes correspondant aux espèces mono, di- et trisodées. Notons aussi la présence d'un pic à  $m/z$  179 correspondant à une espèce  $[M-H]^+$ . Il s'agit de la première observation d'une telle espèce qui n'a jamais été détectée auparavant par les autres techniques classiques d'ionisation. Contrairement au spectre de masse observé en photoionisation sans dopant dans le solvant  $H_2O/MeOH$ , le spectre enregistré dans le chloroforme montre la formation d'ions fragments à  $m/z$  162, 149 et 133. Les espèces à  $m/z$  162 et 149 ont déjà été rencontrées en photoionisation assistée (*cf. figures 7b et 7c*). Par ailleurs, nous détectons ici un ion fragment à  $m/z$  133 correspondant à une déshydratation suivie d'une perte de formaldéhyde sur l'espèce protonée. D'une manière générale, les produits formés ici proviennent de l'espèce protonée ou radicalaire du glucose. Aucun ion fragment détecté ici ne provient des adduits formés avec le sodium.



**Figure 8** : Spectre de masse APPI du glucose natif enregistré dans le chloroforme en mode d'ionisation positif

On peut *à priori* avancer plusieurs explications pour clarifier les fragmentations observées :

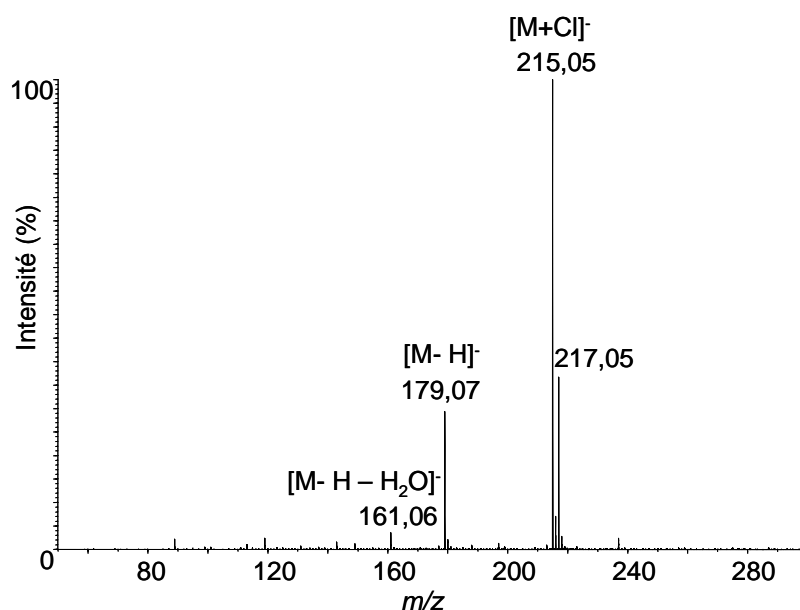
- 1- décomposition thermique et/ou par collisions dans la source
- 2- photoionisation directe du sucre pour former un radical cation instable qui peut alors fragmenter ou capter un atome d'hydrogène pour former une espèce  $[M+H]^+$
- 3- formation simultanée d'espèces  $M^{\bullet+}$  et  $[M+H]^+$ , respectivement par transfert de charge et transfert de proton (selon les réactions classiques de l'APPI)

Comme nous l'avons vu précédemment, on peut d'ores et déjà éliminer la première hypothèse. En effet, en absence de photons ou de dopant, le spectre de masse ne contient pas de fragments. Ceci met bien en évidence le rôle du processus de photoionisation à proprement parler. Par ailleurs, rappelons que nous nous sommes placés dans des conditions les moins activantes possibles pour éviter de faire du CID en source : valeurs des tensions DP et FP les plus basses possible (*cf. tableau 2*).

La formation simultanée d'ions fragments protonés et radicalaires est une hypothèse plausible, d'autant plus que ces deux espèces sont effectivement observées simultanément sur les spectres de masse (*figures 7 et 8*). Par ailleurs même si peu de groupes ont travaillé sur des cations radicalaires de sucres, il a été montré que ces espèces pouvaient aussi fragmenter sous impact électronique [Kochetkov, 1966]. La plus faible abondance d'ions radicalaires formés en présence de toluène, par rapport à ce qu'elle est avec l'hexafluorobenzène, s'explique par la recombinaison d'atomes d'hydrogène  $H^{\bullet}$  à partir du toluène photoionisé et des ions moléculaires  $M^{\bullet+}$  conduisant ainsi à des molécules protonées plus abondantes.

#### *III.1.4 Photoionisation du glucose en mode négatif*

Le spectre de masse du glucose enregistré dans le chloroforme en mode d'ionisation négatif est présenté sur la *figure 9*. On observe un pic de base correspondant à l'adduit chloré  $[M+Cl]^-$  du glucose qui, par perte de HCl, conduit à la formation de l'espèce déprotonée détectée à  $m/z$  179 suivie d'une perte d'eau à  $m/z$  161. Aucune rupture du cycle osidique n'est observée.

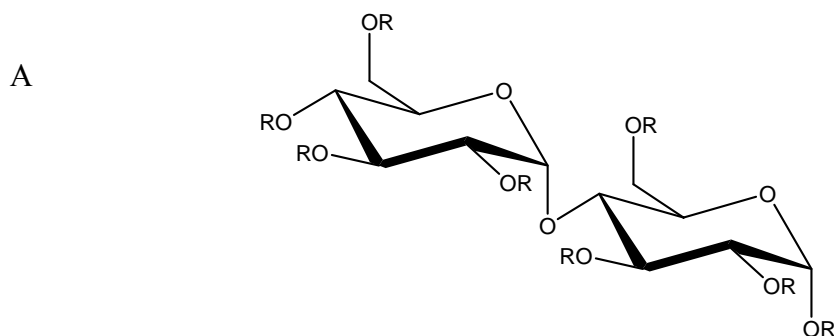


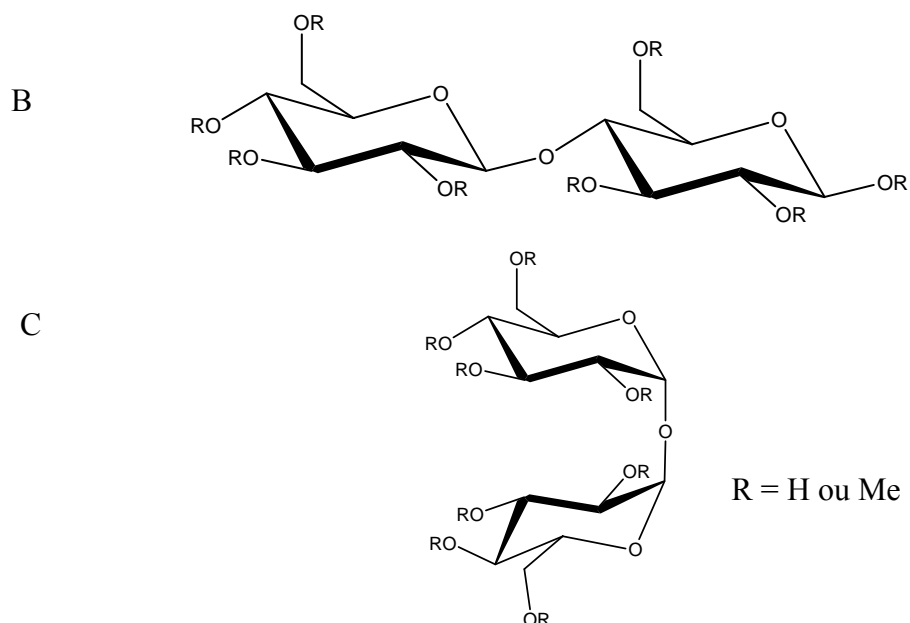
**Figure 9** : Spectre de masse APPI du glucose natif enregistré en mode d'ionisation négatif dans le chloroforme

### III.2 Etude de quelques disaccharides natifs

#### III.2.1 Photoionisation dans le système (H<sub>2</sub>O/MeOH, v/v)

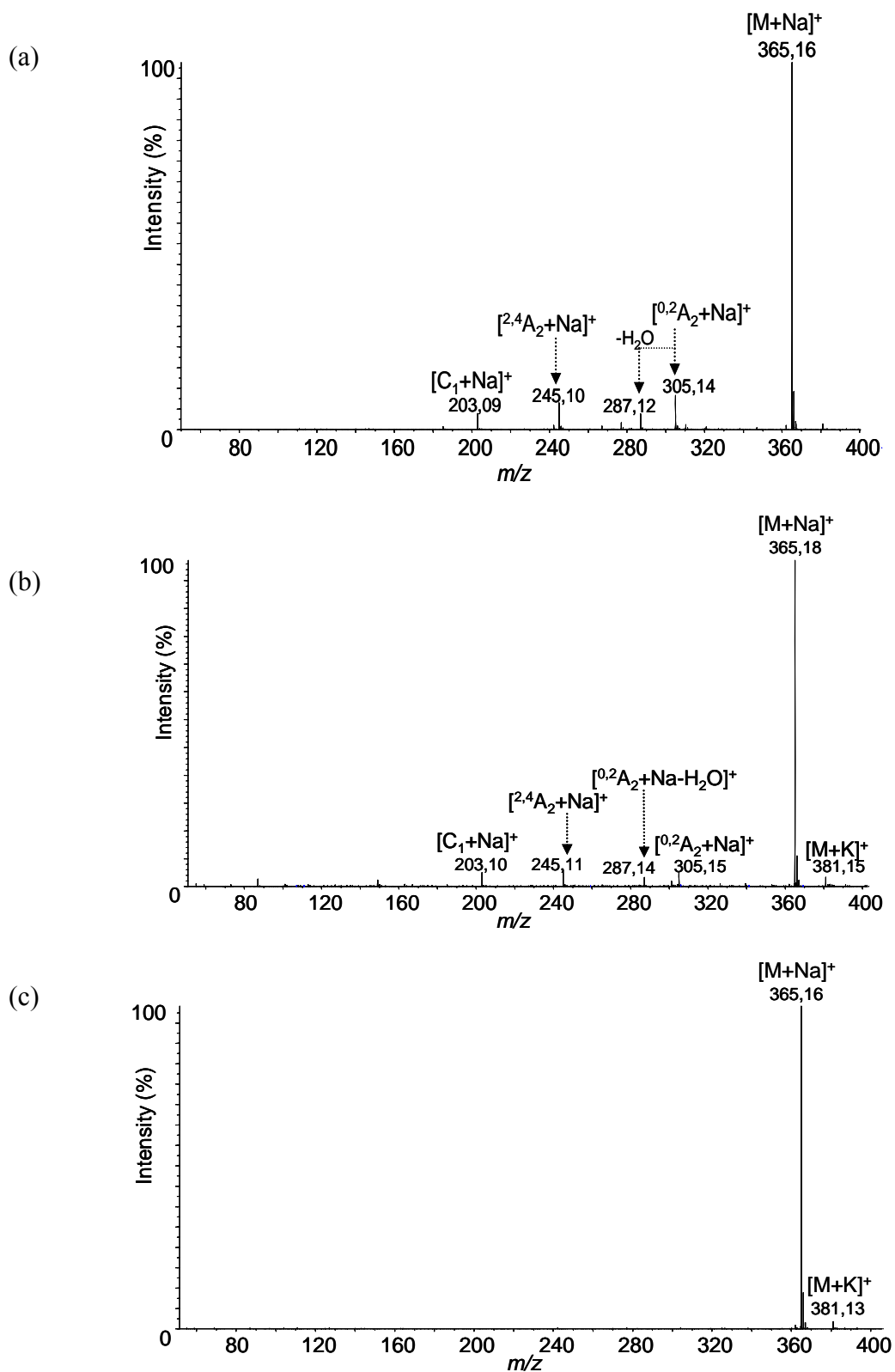
Les structures des disaccharides étudiés sont présentées sur la **figure 10**. Le premier couple de diastéréoisomères est constitué des composés II<sub>α(1-4)</sub> et II<sub>β(1-4)</sub> qui sont les anomères α et β du maltose et du lactose respectivement (structures A et B). Le second comprend les composés II<sub>β(1-4)</sub> et II<sub>β(1-1)</sub> (lactose et tréhalose) correspondant à des isomères de position (structures B et C).





**Figure 10** : Structures des disaccharides étudiés : (A) composé  $\text{II}_{\alpha(1-4)}$  (maltose), (B) composé  $\text{II}_{\beta(1-4)}$  (lactose) et (C) composé  $\text{II}_{\beta(1-1)}$  (tréhalose)

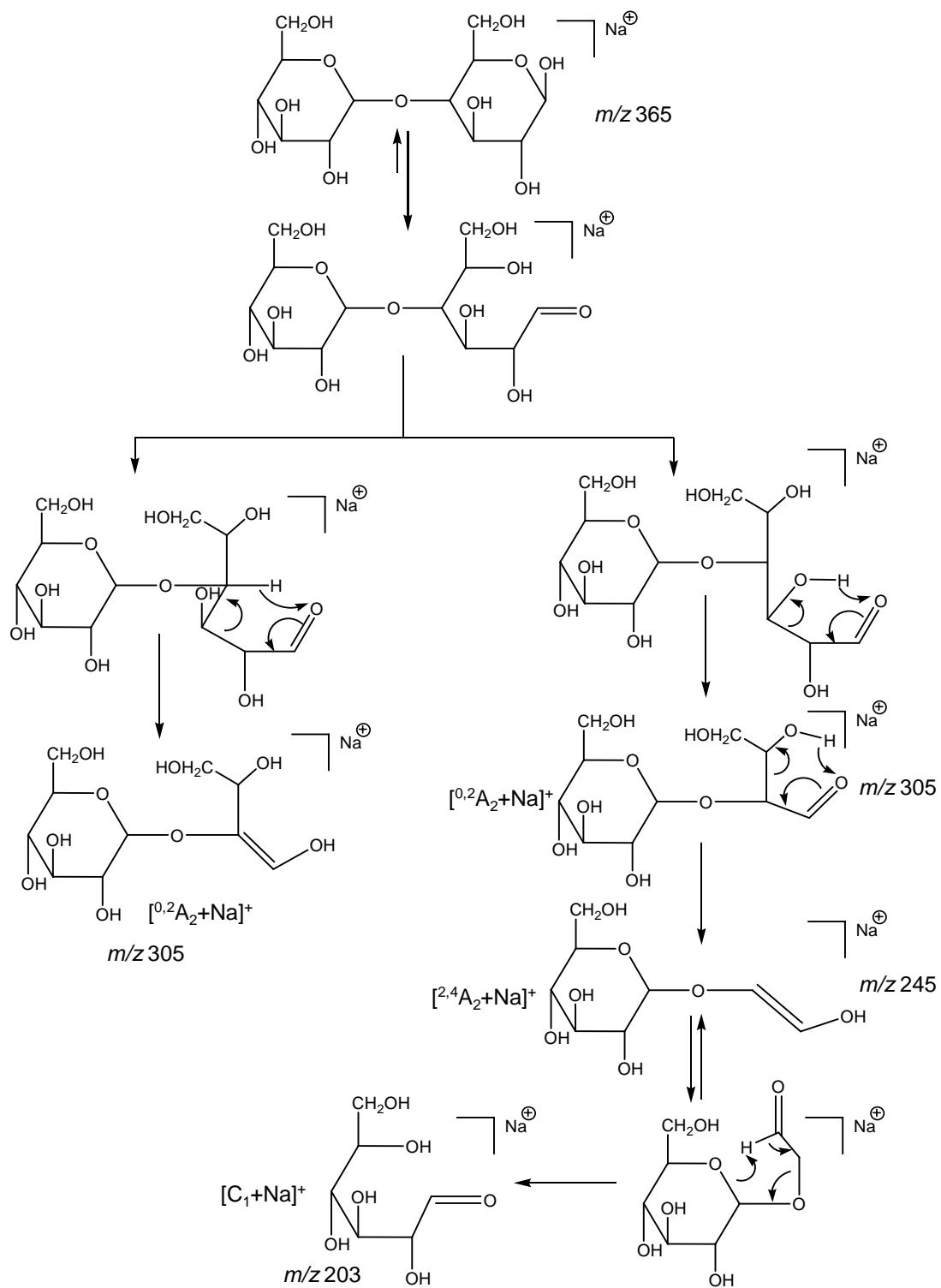
Les spectres de masse APPI des anomères  $\text{II}_{\alpha(1-4)}$  et  $\text{II}_{\beta(1-4)}$  enregistrés dans le système de solvant  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (50:50, v/v) sont présentés sur les **figures 11a** et **11b**. Ces deux anomères montrent une empreinte spectrale parfaitement superposable à 5% près. La totalité des ions observés sur les spectres de masse sont généralement détectés sous forme d'espèces cationisées par le sodium. Deux séries d'ions à nombre pair d'électrons caractérisent les spectres de masse : (i) la première concerne les ions de rapport  $m/z$  305, 287 et 245 correspondant à des ions issus de rupture du cycle glucidique pour conduire à des ions  $A_n$  et (ii) la deuxième série d'ions se traduit par la présence d'un pic de faible intensité à  $m/z$  203 correspondant à une rupture de la liaison glycosidique pour former l'ion  $C_{n-1}$  ( $C_1$  en l'occurrence).



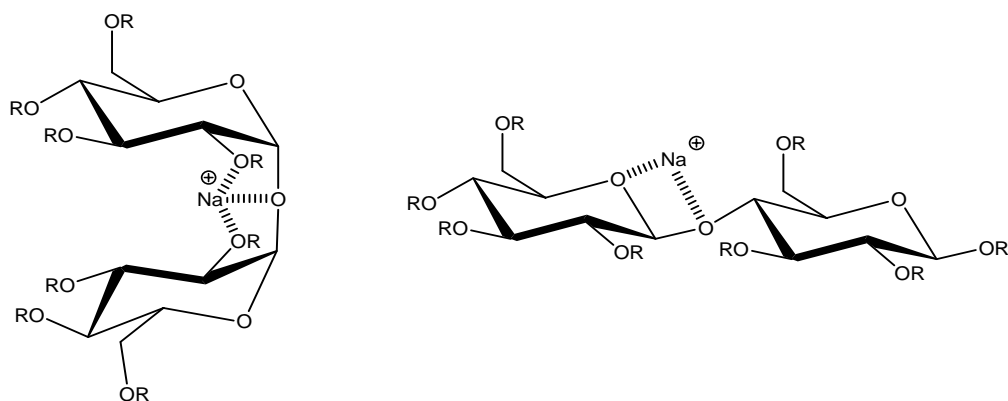
**Figure 11** : Spectres APPI du (a) maltose (b) lactose et (c) tréhalose enregistrés en mode d'ionisation positif dans le solvant H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v)

Un modèle de fragmentation des sucres en APPI est envisagé ici impliquant plusieurs étapes consécutives pour la formation des ions A observés. Notre hypothèse est que la première étape dans le processus de photoionisation des saccharides sous irradiation UV met en jeu une ouverture du cycle osidique au niveau de l'extrémité réductrice. Les sucres natifs (qui ne sont pas dérivés au niveau du groupe hydroxyle du carbone anomérique C<sub>1</sub>) peuvent exister sous leurs formes linéaires et cycliques (il s'agit de la mutarotation). On peut suggérer que l'irradiation UV par les photons et/ou le chauffage de la source d'ions pourrait résulter en une « ouverture thermique » de l'unité réductrice du sucre. Cette suggestion permet d'expliquer les différentes voies de fragmentations conduisant aux ions A observés en APPI (cf. **figure 12**). Sachant que des ruptures simultanées de deux liaisons paraissent difficiles à envisager, un mécanisme à étapes serait donc plus approprié pour expliquer ces réactions [Hofmeister, 1991]. Comme on peut le voir sur la **figure 12**, ces réactions mettent en jeu des réarrangements consécutifs de type Mac Lafferty. Ce mécanisme est confirmé ici par l'absence d'ions A sur les spectres de masse du tréhalose (disaccharide lié en 1-1) (**figure 11**). En effet, l'oxygène anomérique (en C1) est protégé dans ce composé (cf. structure du tréhalose sur la **figure 10c**) empêchant ainsi l'étape d'ouverture du cycle (1<sup>ère</sup> étape du mécanisme de la **figure 12**). Ce mécanisme, aussi proposé par le groupe de Cotter, se produit sous irradiation laser (IR LDMS) d'oligosaccharides. Les spectres obtenus de ces disaccharides (**figures 11a** et **11b**) sont identiques (spectres superposables à 100%) à ceux enregistrés en ionisation par désorption laser infrarouge [Spengler, 1990]. Ce même groupe a aussi montré qu'en FAB, la principale voie de fragmentation des sucres liés en (1-4) était la perte de 60 et 120 unités de masse pour conduire aux ions A observés ici [Martin, 1989].

L'affinité du sodium pour l'isomère (1-1) est beaucoup plus importante que pour l'isomère (1-4). La position de la liaison glycosidique pour le composé II<sub>β(1-1)</sub> semble être à l'origine des différences spectrales observées entre ces deux diastéréoisomères. Une liaison (1-1) chélate beaucoup plus fortement le sodium qu'une liaison (1-4), comme le décrit la **figure 13**. En APPI, les molécules cationisées possédant des liaisons (1-1) seront donc plus stables que les molécules possédant des liaisons (1-4). Cette suggestion est confirmée par l'absence de l'ion C<sub>1</sub> à *m/z* 203 sur le spectre de masse du composé II<sub>β(1-1)</sub> (**figure 11c**).



**Figure 12** : Schéma de fragmentation des disaccharides conduisant à l'obtention de ruptures de cycle observées sur les spectres de masse



**Figure 13** : Chélation du sodium par une liaison (1-1) beaucoup plus facile qu'une liaison (1-4)

### III.2.2 Photoionisation de ces disaccharides dans le chloroforme

Pour mieux comprendre les mécanismes de fragmentation impliqués dans la formation des ions produits en photoionisation en mode positif, nous avons été amenés à étudier ces mêmes molécules dans un autre solvant : le chloroforme. Les spectres de masse de ces disaccharides étudiés dans ce solvant sont présentés sur la **figure 14**. Les spectres de masse des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  des composés  $\text{II}_{(1-4)}$  laissent apparaître une empreinte spectrale dans la région entre  $m/z$  200 et 400 identique à celle obtenue dans l'autre système de solvant (**figure 11**). Néanmoins, ces spectres se différencient des précédents par la présence d'ions fragments dans la région des faibles rapports  $m/z$ . Tout d'abord, notons la présence d'une espèce déprotonée  $[\text{C}_1\text{-H}]^+$  détectée dans les trois cas et générant le pic à  $m/z$  179. Cet ion n'a jamais été reporté antérieurement par les techniques classiques d'ionisation. Par ailleurs, des ions fragments issus de l'ion  $\text{C}_1$  sont observés à  $m/z$  149, 145, 133 et 127 correspondant dans la plupart des cas à des pertes de molécules d'eau à partir de la forme protonée et/ou sodée de l'ion  $\text{C}_1$ . Soulignons la présence d'ions fragments E et E' détectés à  $m/z$  187 et 155 dans le cas de l'anomère  $\alpha$  (**figure 14a**). Selon Viseux et *al.*, le mécanisme de formation de ces ions, provenant d'un ion B (non observé ici), implique d'abord une perte du substituant en position 3 suivi de la perte du groupement en position 4 pour former les ions observés [Viseux, 1997]. La **figure 15** décrit le mécanisme de formation de ces ions selon Viseux *et al.* Le spectre de masse enregistré dans le chloroforme du composé  $\text{II}_{\beta(1-1)}$  est présenté sur la **figure 14c** mettant en évidence une espèce  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  relativement abondante détectée simultanément avec un adduit potassium assez intense. On s'aperçoit rapidement que

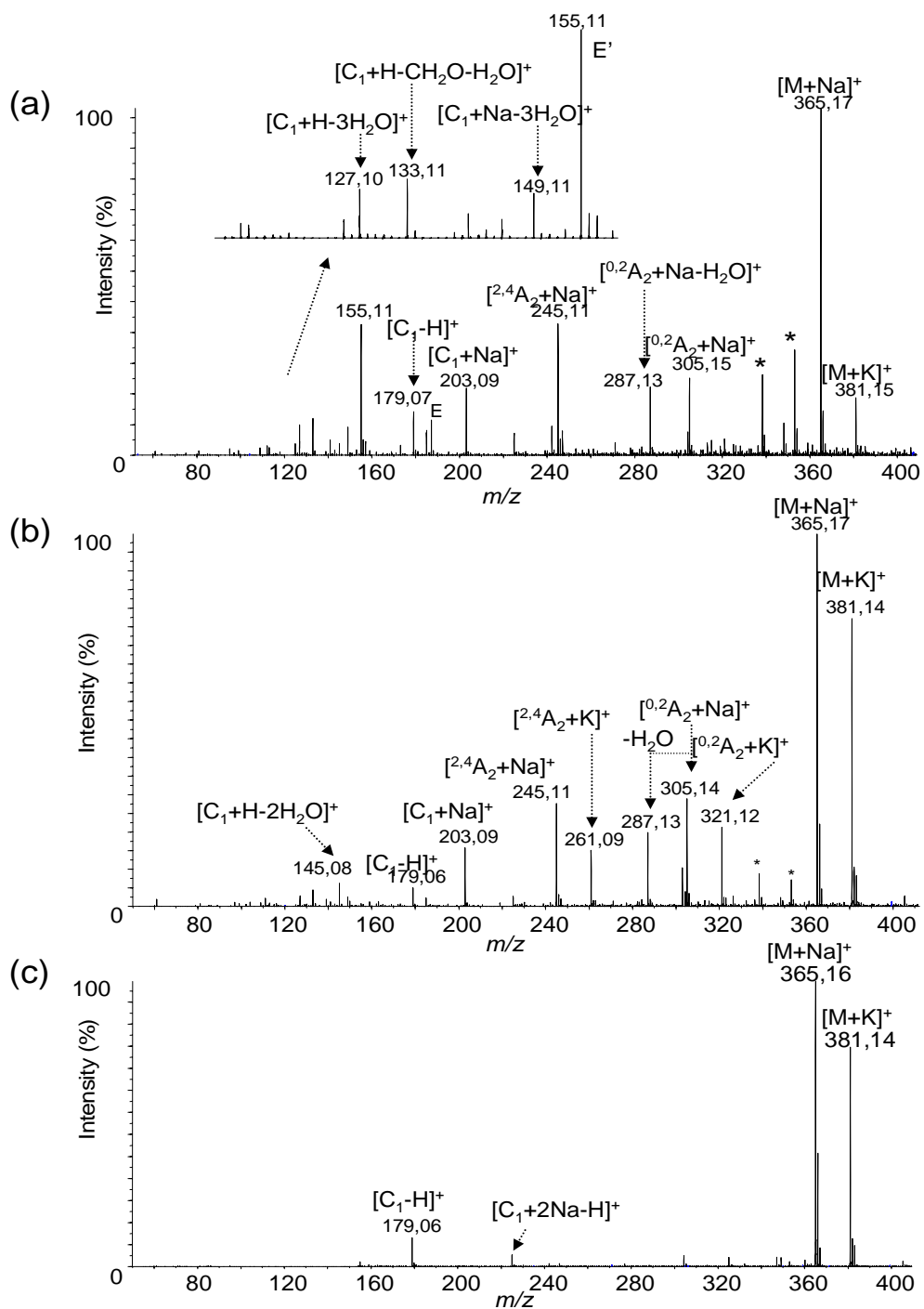


l'isomère de position (1-1), comme dans le solvant H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v), est beaucoup plus stable que l'isomère (1-4) confirmant ainsi la stabilité des liaisons (1-1) par rapport aux liaisons (1-4). Le seul fragment observé ici (et commun aux autres disaccharides) est l'espèce [C<sub>1</sub>-H]<sup>+</sup>, qui d'ailleurs n'a encore jamais été reportée dans la littérature. Cette espèce pourrait provenir d'un transfert de H<sup>•</sup> à partir du cation radical de l'ion C<sub>1</sub>. L'observation de cet ion en APPI confirme encore une fois le caractère «exotique» des ions fragments générés en photoionisation à pression atmosphérique rendant ainsi la compréhension de cette nouvelle chimie en phase gazeuse assez difficile.

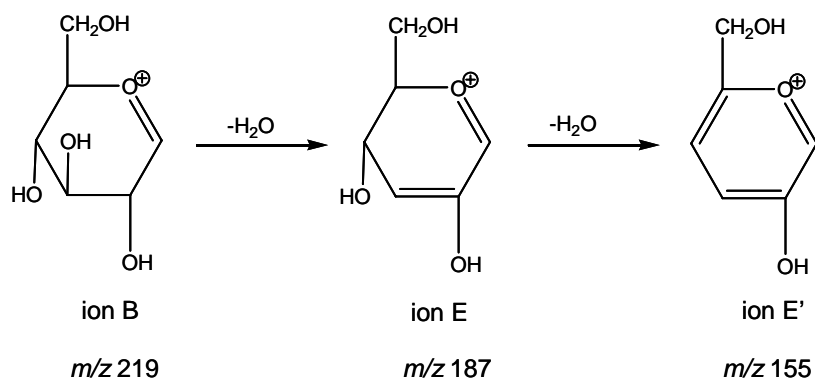
*En résumé, l'analyse des spectres APPI des disaccharides permet de mettre en évidence la présence de nombreuses espèces :*

- *espèces moléculaires du type [M+Na]<sup>+</sup> qui est l'espèce majoritaire dans les deux systèmes de solvants étudiés*
- *fragments issus de rupture de cycle (<sup>0,2</sup>A et <sup>2,4</sup>A uniquement) qui subissent, ou non, une déshydratation*
- *fragments issus de la rupture de la liaison glycosidique pour donner un ion C très peu abondant*
- *quelques fragments issus de l'ion C<sub>1</sub> sont observés uniquement dans le chloroforme*
- *première observation de l'espèce [C-H]<sup>+</sup> dans le chloroforme*

*Remarque : Les différents fragments observés pour les disaccharides dans les deux systèmes de solvants sont résumés dans les **tableaux 3a** et **3b**. Ces tableaux permettent de mettre en évidence l'effet du milieu (solvant) sur le processus de photoionisation.*



**Figure 14** : Spectres de masse APPI enregistrés dans le chloroforme du (a) maltose (b) lactose et (c) tréhalose natifs



**Figure 15** : Schéma de fragmentation conduisant aux ions E et E' détectés en APPI selon Viseux *et al.* [Viseux, 1997]

**Tableau 3a.** Données obtenues dans le solvant H<sub>2</sub>O/MeOH (50 :50, v/v) pour les oligosaccharides natifs étudiés

Substance	<sup>0,2</sup> A <sub>n</sub>	<sup>0,4</sup> A	<sup>2,4</sup> A	C <sub>n-1</sub>	etc	<sup>0,3</sup> A <sub>n</sub>	M- H <sub>2</sub> O	<sup>0,2</sup> A <sub>n</sub> - H <sub>2</sub> O	C <sub>n-1</sub> - H <sub>2</sub> O
Maltose	x	n	n	(x)				x	
Glc[α1→4]Glc									
Lactose	x		x	(x)				x	
Glc[β1→4]Glc									
Tréhalose									
Glc[β1→1]Glc									
Cellotriose	x		x	x	x			x	x
Glc[β1→4]Glc-[β1→4]Glc									
Raffinose									
Gal[α1→6]Glc- [α1→2]Fru									

<sup>a</sup> les parenthèses indiquent que les ions observés sont de faible intensité

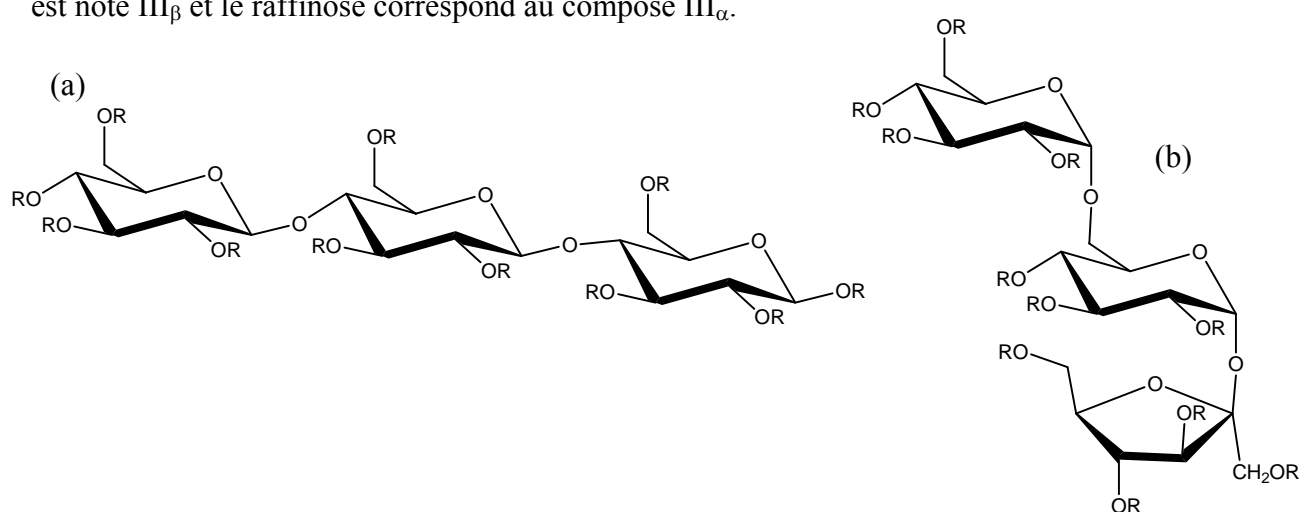
**Tableau 3b.** Données obtenues dans le chloroforme pour les oligosaccharides natifs étudiés

Substance	$^{0,2}A_n$	$^{0,4}A_n$	$^{2,4}A_n$	$C_{n-1}$	$C_{n-1}^-$	et	$^{0,3}A_n$	M- H <sub>2</sub> O	$^{0,2}A_n$ -H <sub>2</sub> O	$C_{n-1}$ - H <sub>2</sub> O
Maltose	x		x	x	x				x	
Glc[ $\alpha$ 1→4]Glc										
Lactose	x		x	x	(x)				x	
Glc[ $\beta$ 1→4]Glc										
Tréhalose				(x)	x					
Glc[ $\beta$ 1→1]Glc										
Cellotriose	x		x	x	x	x			x	x
Glc[ $\beta$ 1→4]Glc- [ $\beta$ 1→4]Glc										
Raffinose			x	x	x	x				
Gal[ $\alpha$ 1→6]Glc- [ $\alpha$ 1→2]Fru										

<sup>a</sup> les parenthèses indiquent que les ions observés sont de faible intensité

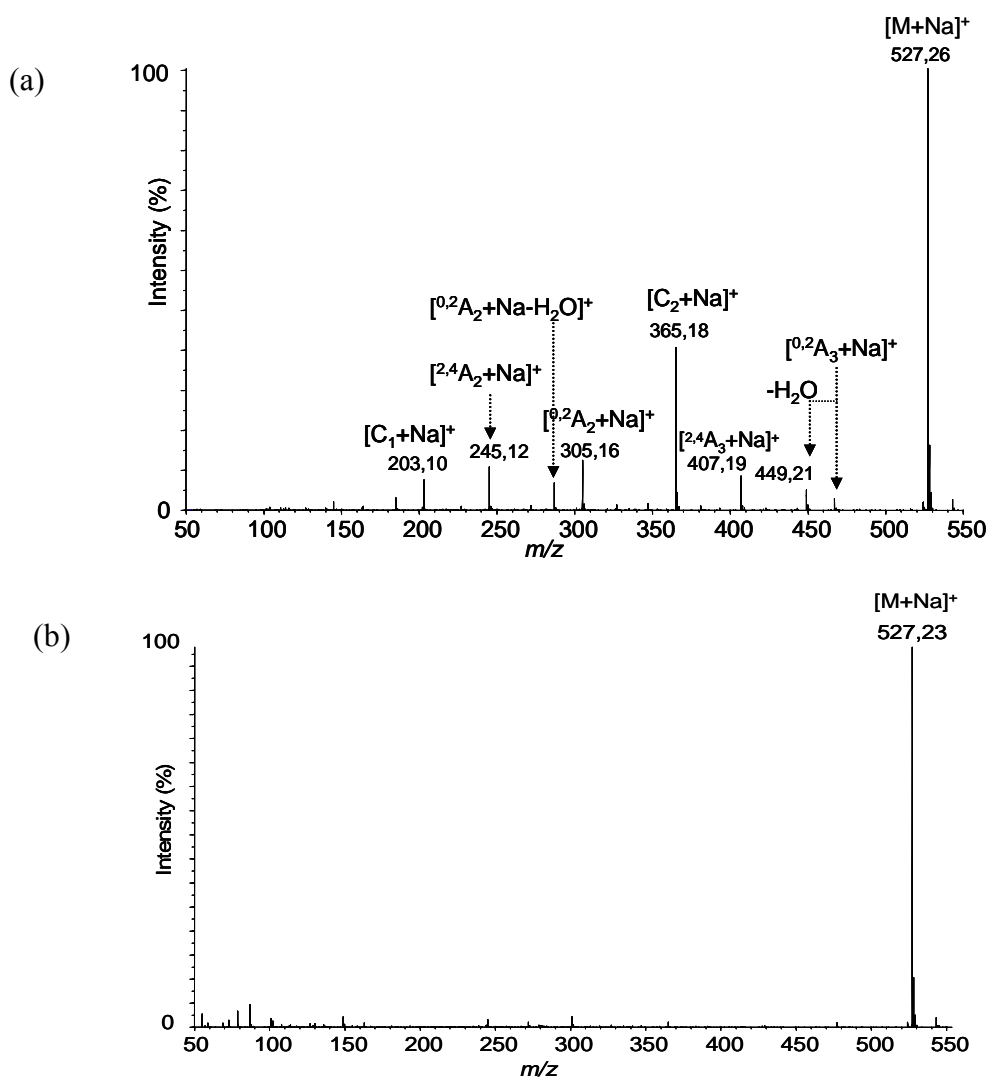
### III.3 Etude de deux trisaccharides

Les structures des trisaccharides étudiés sont présentées sur la *figure 16*. Le cellotriose est noté III <sub>$\beta$</sub>  et le raffinose correspond au composé III <sub>$\alpha$</sub> .



**Figure 16 :** Structure des trisaccharides étudiés au cours de ce travail

La **figure 17a** présente le spectre APPI du composé III<sub>β</sub> enregistré dans le système H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v) mettant en évidence une espèce cationisée [M+Na]<sup>+</sup> majoritaire avec quelques ions fragments. Comme pour les disaccharides, la quasi-totalité de la série des ions A est observée accompagnée de la perte d'une molécule d'eau se produisant sur les ions <sup>0,2</sup>A. Par ailleurs, les ruptures des deux liaisons glycosidiques sont observées, générant ainsi les ions C<sub>2</sub> et C<sub>1</sub> à *m/z* 365 et 203 (cf. **tableau 3a**). Il faut souligner que tous les ions fragments observés contiennent le sodium. Dans la région *m/z* 203-350, ce spectre montre une empreinte spectrale similaire au spectre du disaccharide II<sub>β(1-4)</sub> (**figure 11b**). Enfin la région des hauts rapports *m/z* (entre 350 et 500) correspond à la fragmentation de la troisième unité glucidique du trisaccharide. Ce spectre est identique à celui obtenu en désorption laser infrarouge par Spengler *et al.* (spectres superposables à 100%) [Spengler, 1990]. L'autre trisaccharide (composé III<sub>α</sub>) se différencie du cellotriose par l'absence totale d'ions fragments sur le spectre de photoionisation enregistré dans les mêmes conditions (**figure 17b**). Ce saccharide apparaît être beaucoup plus stable dans ces conditions.



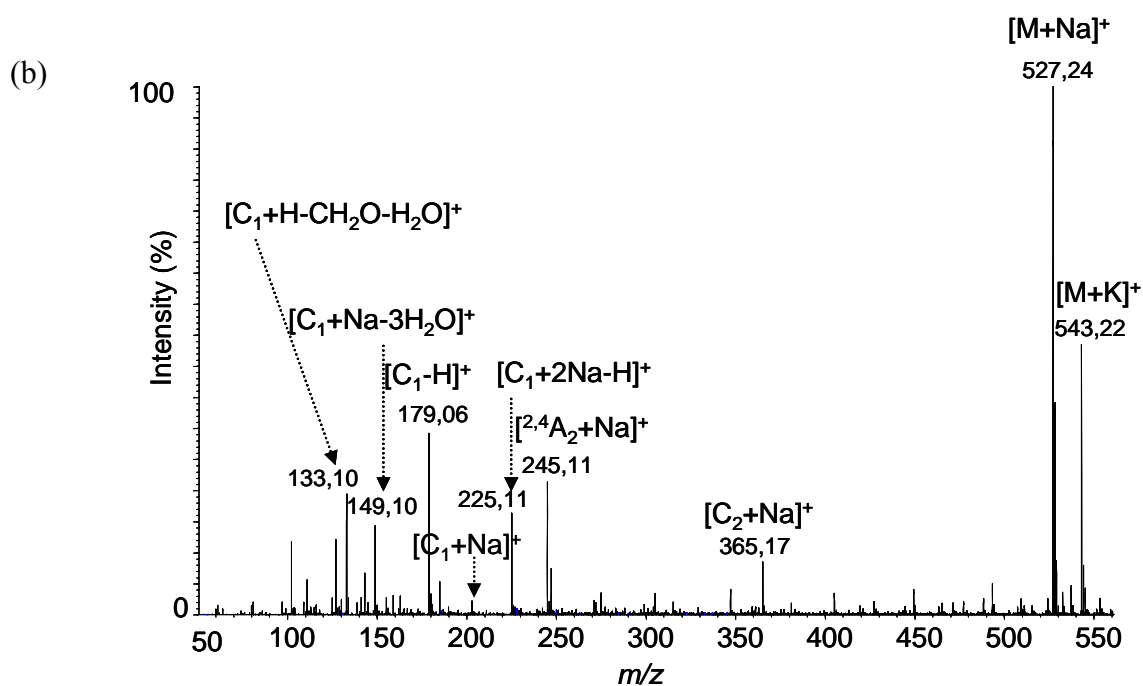
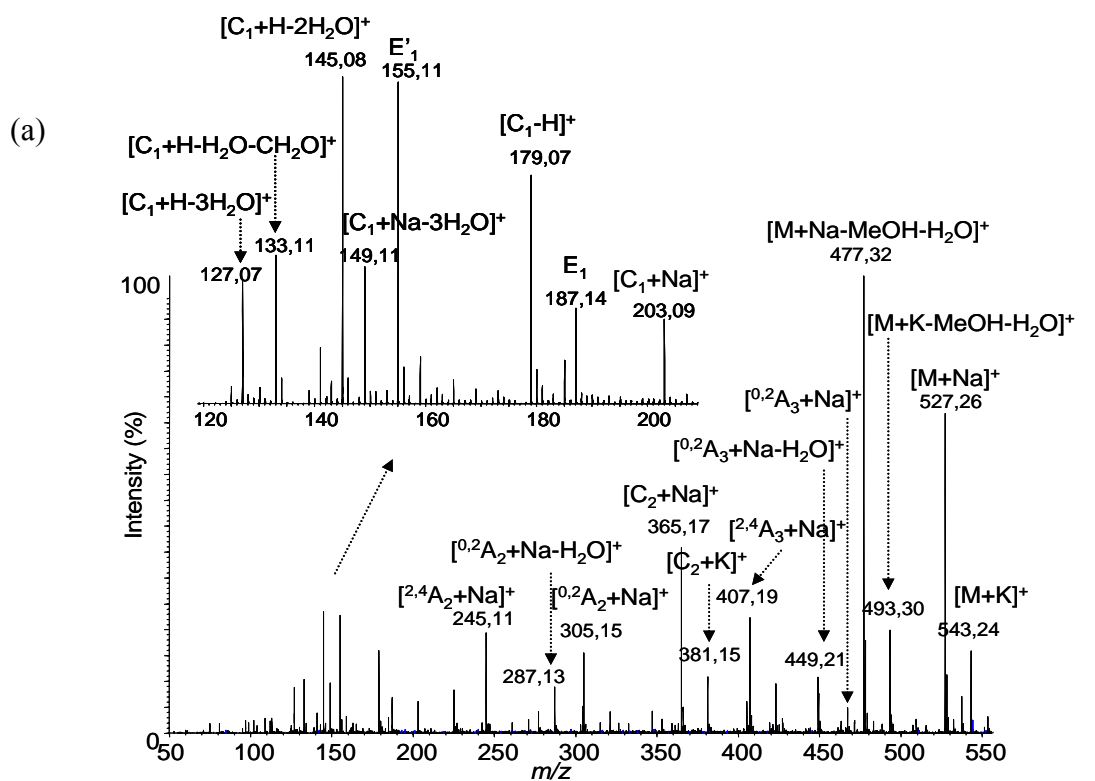
**Figure 17** : Spectres APPI enregistrés dans le système de solvant H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v) du (a) cellotriose (III<sub>β</sub>) et (b) du raffinose (III<sub>α</sub>) natifs

De la même façon que pour les disaccharides, nous avons aussi enregistré des spectres dans le chloroforme. Pour cela, la **figure 18a** présente le spectre APPI du cellotriose ( $\text{III}_\beta$ ) enregistré dans le chloroforme. Deux différences majeures apparaissent par rapport à l'étude précédente (**figure 17a**).

D'une part, on observe un pic de base à  $m/z$  477 correspondant à un fragment de l'espèce sodée ( $[\text{M}+\text{Na}-\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ). Cette fragmentation est originale puisque absente sur les spectres de masse des disaccharides. Par ailleurs, l'adduit potassium de cette espèce est aussi détectée (en faible abondance) sur le spectre de masse du cellotriose (**figure 18a**) à  $m/z$  493.

D'autre part, comme pour les disaccharides, on détecte dans les faibles masses des ions fragments issus de l'ion  $\text{C}_1$  (à  $m/z$  149, 133, 127 ...) ainsi que l'espèce déprotonée  $[\text{C}_1-\text{H}]^+$  à  $m/z$  179. Contrairement au cellotriose, on observe pour le raffinose des ions C exclusivement avec quelques ions fragments issus de l'ion  $\text{C}_1$  et un ion A (à  $m/z$  245). Néanmoins, ces ions restent assez minoritaires sur le spectre de masse. Quand à l'espèce  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  du raffinose (**figure 18b**), elle paraît être beaucoup plus stable que celle du cellotriose.

*D'une manière générale, le comportement des trisaccharides est similaire à celui des disaccharides. La seule différence est la présence d'ions fragments de type  $\text{C}_2$  et  $\text{A}_3$  correspondant à la présence d'une troisième unité glucose. Les tables 3a et 3b résument les ions fragments observés pour ces sucres dans les deux systèmes de solvants étudiés.*



**Figure 18** : Spectres APPI enregistrés dans le chloroforme du (a) cellotriose et (b) du raffinose natifs

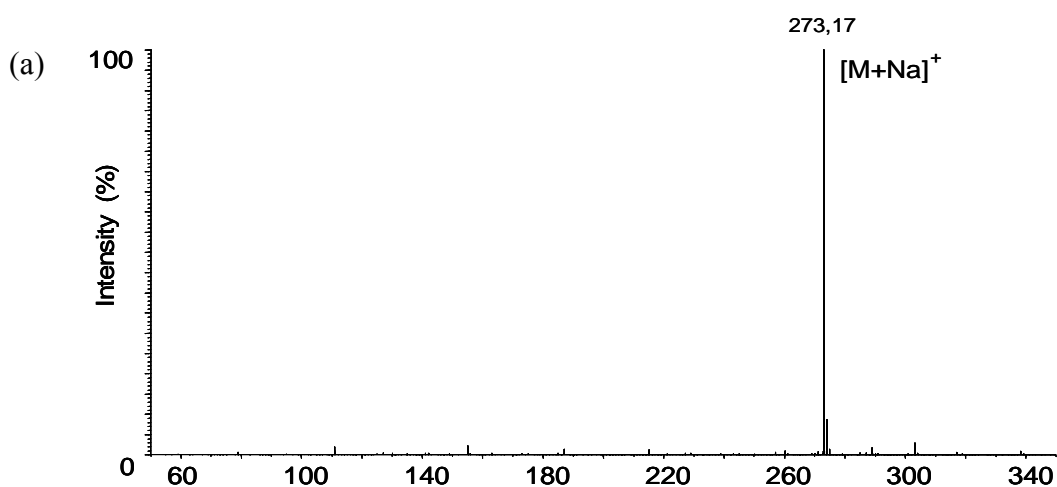
#### IV. ETUDE D'OLIGOSACCHARIDES PERMETHYLES

Convertir les glycanes sous leur forme perméthylée permet d'augmenter leur sensibilité de détection quelque soit la technique d'ionisation utilisée. Les deux plus importants processus de dérivation impliquent soit une peracétylation [Bourne, 1949] soit une perméthylation du sucre [Ciucanu, 1984]. Cette dernière est préférée à la peracétylation puisqu'il en résulte un faible incrément de masse et une meilleure volatilité. Les mêmes conditions d'analyse que pour l'étude des sucres non dérivés ont été utilisées lors de cette étude (*tableau 2*).

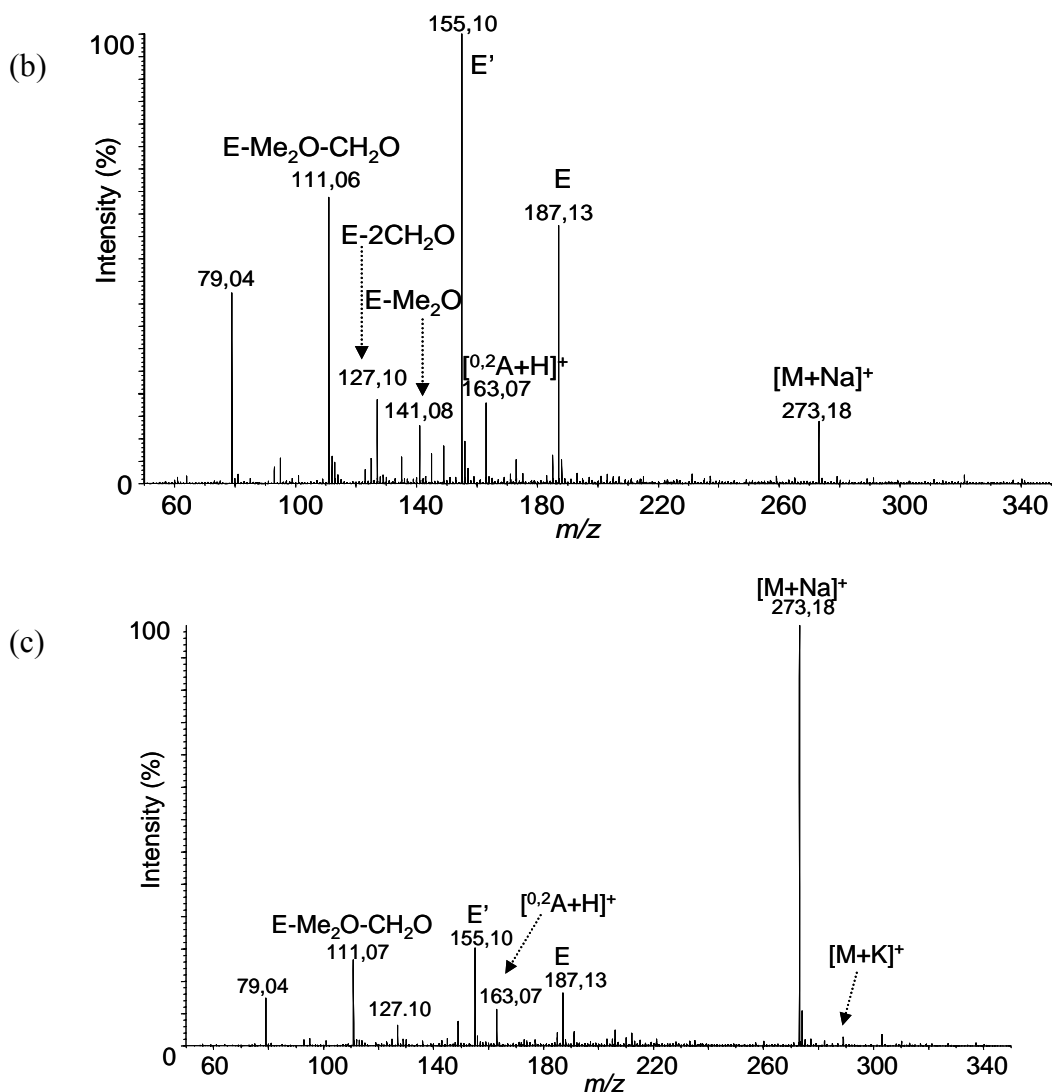
*Remarque : Les structures des sucres perméthylés étudiés ici seront notées par un prime pour les différencier de celles des sucres non dérivés.*

##### IV.1 Etude du glucose perméthylé

En absence de photons UV, seuls les adduits  $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$  sont observés sans aucune fragmentation (spectre non montré). Allumer la lampe ne produit aucun effet sur le spectre APPI enregistré dans  $H_2O/MeOH$  (*figure 19a*). On a ensuite voulu étudier l'influence d'un dopant sur le spectre du glucose perméthylé. La *figure 19b* présente le spectre APPI-DA enregistré en infusant du toluène (à 8  $\mu L/min$ ) et celui de la *figure 19c* avec de l'hexafluorobenzène (à 3  $\mu L/min$ ). Contrairement au spectre obtenu en photoionisation sans dopant, ces spectres montrent la formation d'ions fragments de rapports  $m/z$  impairs d'abondances relatives importantes notamment dans le cas du toluène.







**Figure 19** : Spectres APPI du glucose perméthylé enregistrés dans le système H<sub>2</sub>O/MeOH (50 :50, v/v) (a) sans dopant (b) en présence de toluène à 8  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  et (c) C<sub>6</sub>F<sub>6</sub> à 3  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

- *Formation d'ions fragments via des pertes de molécules de méthanol*

Les ions de rapport  $m/z$  187 et 155 sont issus de pertes consécutives de deux ou trois molécules de méthanol respectivement à partir de l'ion B (absent à  $m/z$  219) et sont notés E et E' selon Viseux *et al.* [Viseux, 1997]. Nous ne détaillerons pas ici le mécanisme de formation de ces ions puisque déjà décrit dans le cas des sucres natifs. Quand aux ions observés à  $m/z$  111, ils proviennent d'une perte de 76 u à partir des ions de rapport  $m/z$  187 plutôt que d'une perte de 44 u à partir des ions de rapport  $m/z$  155. En fait, cet ion correspond à une perte de diméthyléther (Me<sub>2</sub>O) suivie d'une perte de formaldéhyde (CH<sub>2</sub>O) à partir de l'ion E,

observé avec les deux dopants utilisés. L'espèce intermédiaire E-Me<sub>2</sub>O (à  $m/z$  141) est détectée uniquement en présence de toluène (**figure 19b**). Notons qu'une telle transition (perte de Me<sub>2</sub>O) peut correspondre également à des pertes consécutives de radicaux CH<sub>3</sub><sup>•</sup> et CH<sub>3</sub>O<sup>•</sup> comme cela peut être observé par MS/MS à partir de certains ions précurseurs (voir page suivante).

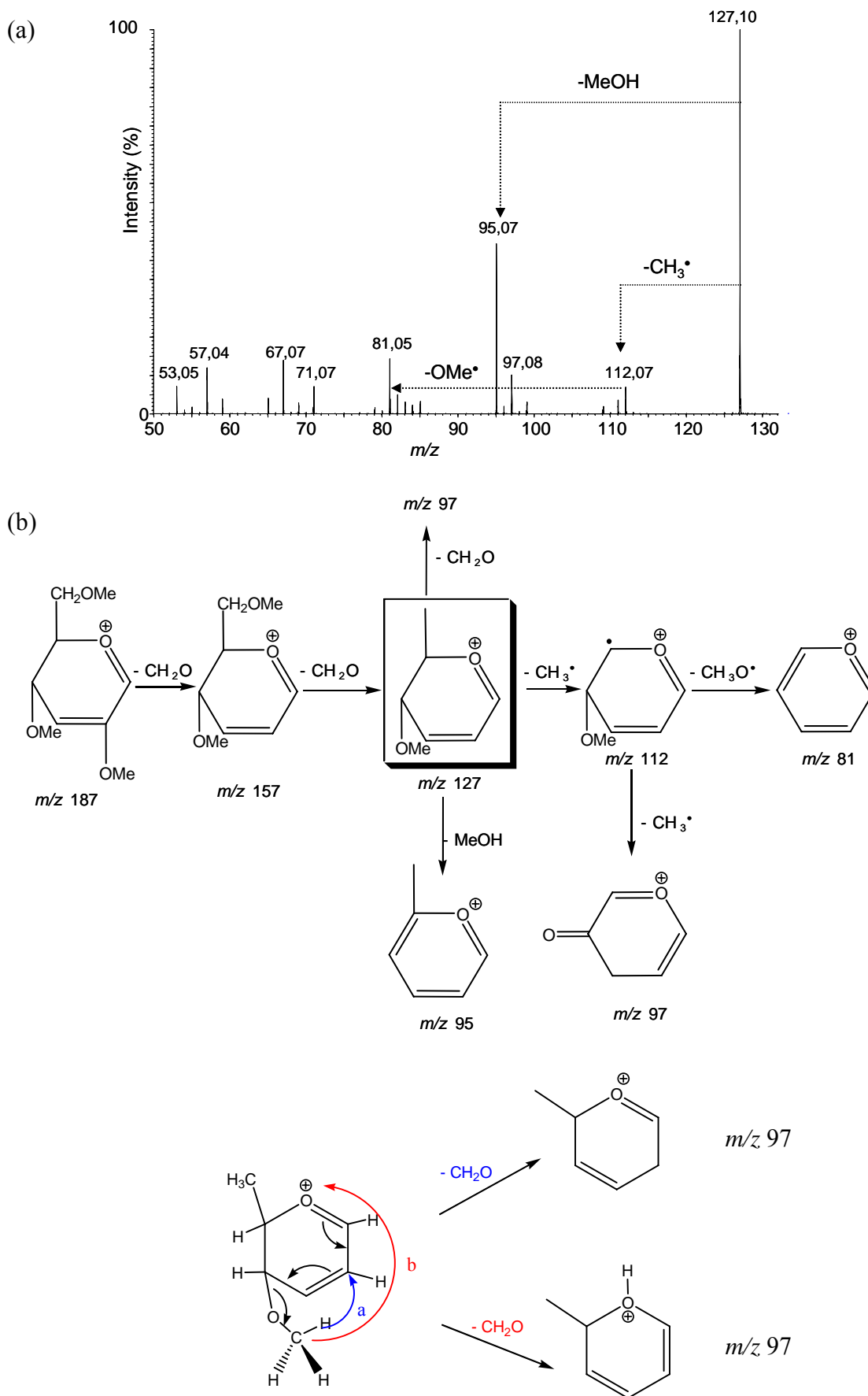
Afin d'établir la structure de l'ion détecté à  $m/z$  127, des expériences de MS/MS ont été effectuées sur cet ion précurseur (**figure 20a**). Le mécanisme hypothétique de fragmentation de cette espèce permettant d'expliquer la présence de certains des ions observés sur le spectre nous a permis d'établir sa structure, décrite sur la **figure 20b**.

- *Formation d'ions par fragmentation de l'hétérocycle*

La formation des ions à  $m/z$  163 est explicitée sur le spectre de masse comme dérivant de la fragmentation de l'hétérocycle pour former des ions de type A selon la nomenclature de Domon et Costello.<sup>10</sup> Il s'agit de l'ion <sup>0,2</sup>A qui est détecté ici sous sa forme protonée. Il est intéressant de souligner qu'il s'agit de la première mise en évidence d'un fragment de type A protoné sur les spectres APPI.

- *Cas particulier de la formation des ions de rapport  $m/z$  79*

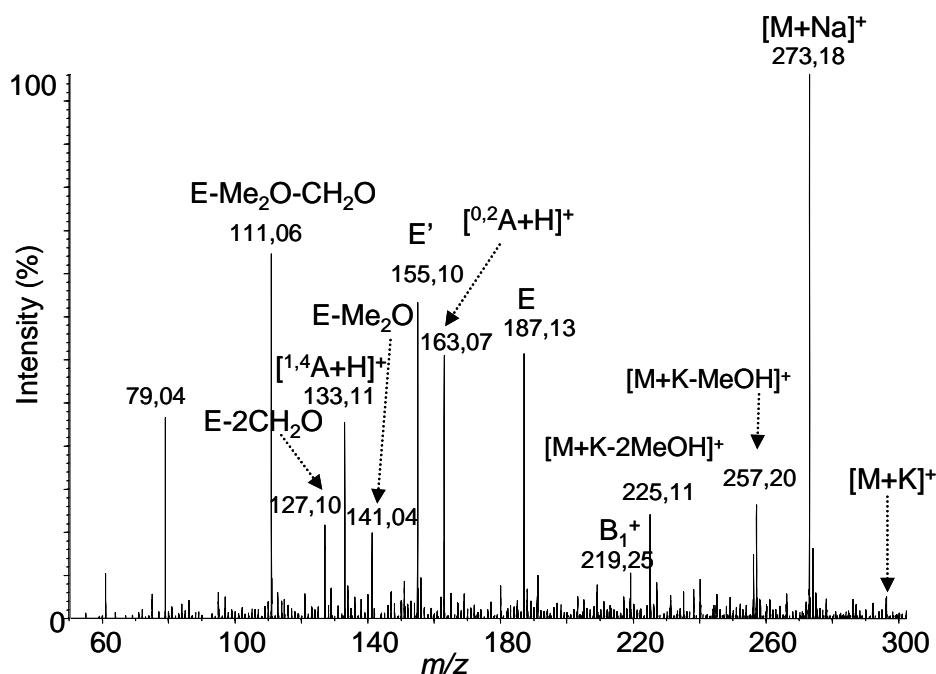
Les ions observés à  $m/z$  79 ne proviennent pas de fragmentations classiques selon la nomenclature de Domon et Costello. Cet ion correspond à une fragmentation du cycle glycosidique conduisant à un ion ayant pour formule C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. On peut proposer une structure de type E-CH<sub>2</sub>O-MeOH-Me<sub>2</sub>O pour cet ion.



**Figure 20** : (a) Spectre MS/MS de l'ion précurseur à  $m/z$  127 (b) Mécanisme hypothétique de fragmentation permettant d'expliquer la présence de certains ions sur le spectre MS/MS (c) Les 2 voies de fragmentation possible conduisant à l'ion à  $m/z$  97

L'espèce  $[M+Na]^+$ , détectée en photoionisation assistée, paraît être beaucoup plus stable dans l'hexafluorobenzène et les ions fragments observés sont moins abondants que dans le toluène. Ces deux spectres peuvent se différencier par la comparaison des rapports d'abondances entre les ions de rapport  $m/z$  187/155 (ions E + E' issus de l'espèce protonée) et  $m/z$  273  $[M+Na]^+$ , qui reflète le rendement de formation des espèces protonées comparé à celui des molécules sodées. Après calcul des rapports d'intensité  $I(E+E')/I[M+Na]^+$ , on obtient un rapport de 10,9 dans le cas du toluène et de 0,38 en infusant de l'hexafluorobenzène. Le rendement de formation des molécules protonées est donc beaucoup plus important dans le cas où le dopant est le toluène, d'où une espèce  $[M+Na]^+$  relativement peu abondante (*figure 19b*).

Un spectre du glucose perméthylé a aussi été enregistré dans un autre système de solvant : le chloroforme (*figure 21*). Ce spectre met en évidence la totalité des ions fragments détectés en photoionisation assistée dans le solvant  $H_2O/MeOH$ . Notons que nous retrouvons ici des espèces cationisées par le potassium à  $m/z$  257 et 225. Ces espèces étaient absentes des spectres précédents et correspondent à une ou deux perte(s) de molécules de méthanol à partir de l'espèce  $[M+K]^+$ . Par ailleurs, on observe la présence de nouveaux pics à  $m/z$  219 et 133 correspondant à des ions  $B_1^+$  et  $[^{1,4}A+H]^+$  respectivement. Notons qu'il s'agit de la première observation de l'ion  $B_1^+$ .



*Figure 21* : Spectre APPI du glucose perméthylé enregistré dans le chloroforme

## IV.2 Etude de disaccharides perméthylés

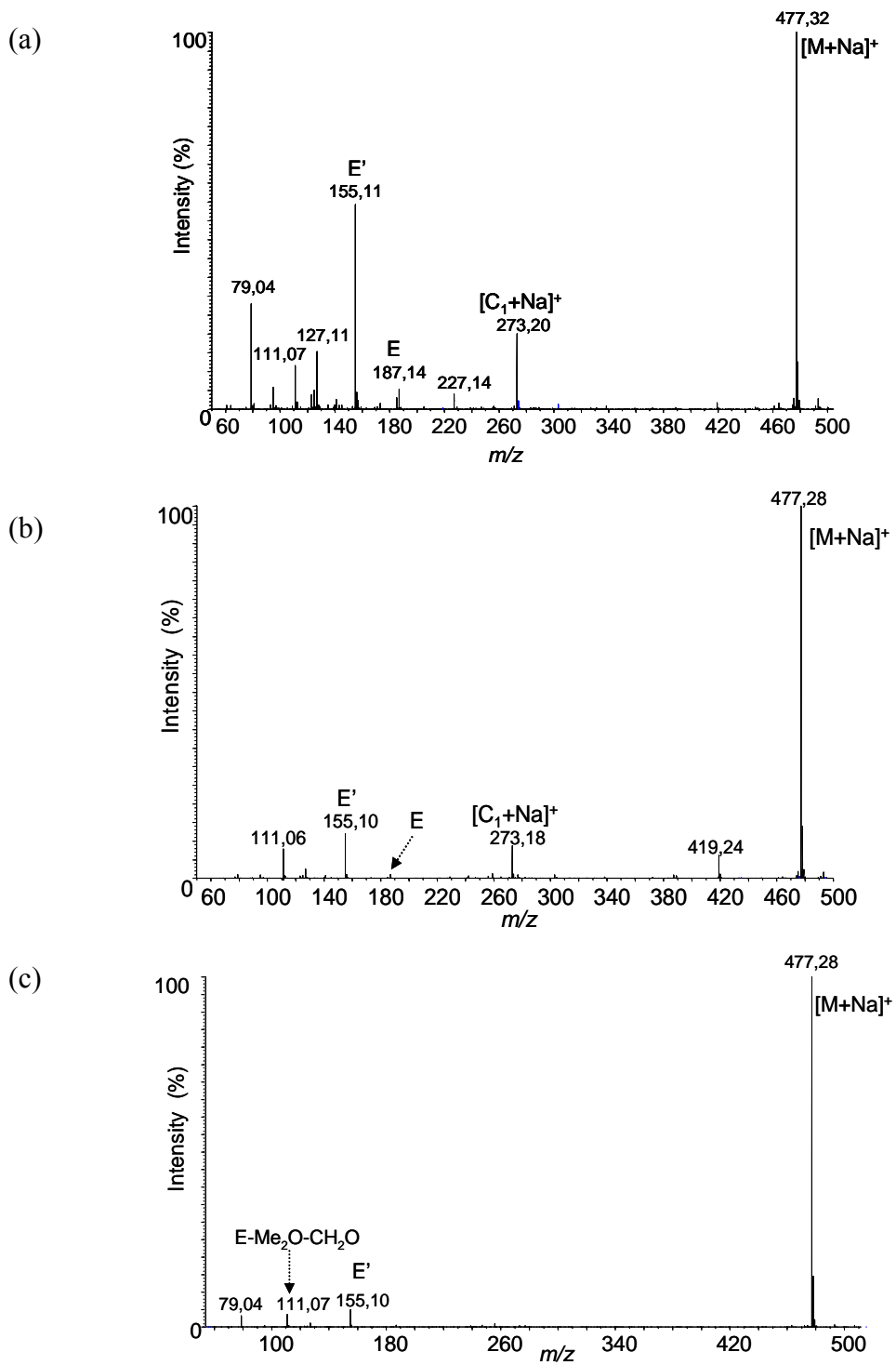
Les structures des disaccharides étudiés ici sont présentées sur la **figure 10** (avec R = CH<sub>3</sub>). Ils seront notés II'<sub>α(1-4)</sub>, II'<sub>β(1-4)</sub> et II'<sub>β(1-1)</sub> dans la suite de l'étude.

### IV.2.1 Etude dans le système de solvant H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v)

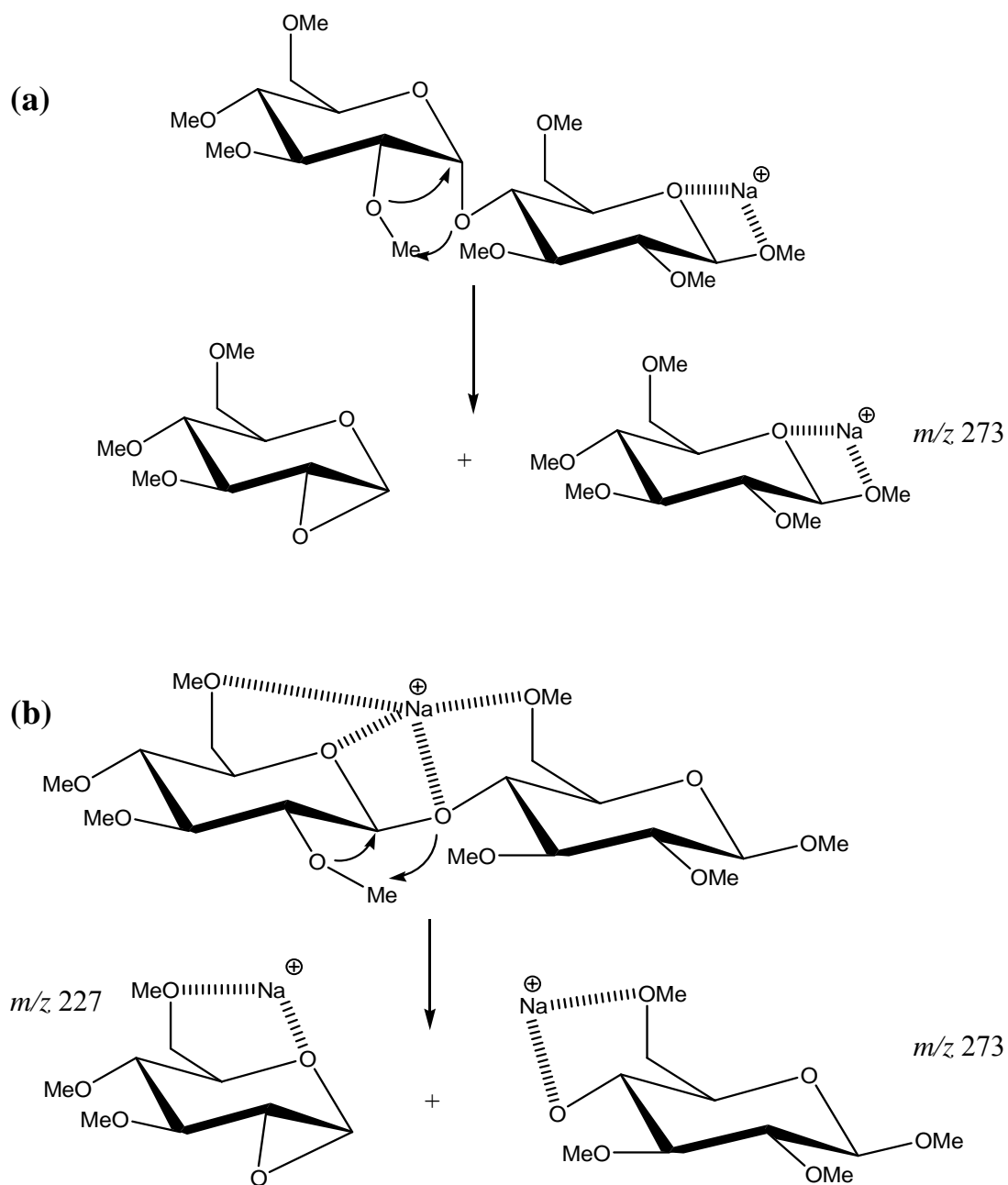
- *Etude des anomères α et β des composés II' (1-4)*

Les spectres de masse APPI obtenus pour les anomères α et β des composés II' (1-4) (**figures 22a** et **22b**) montrent une espèce [M+Na]<sup>+</sup> relativement intense avec quelques ions fragments plus ou moins abondants. Dans les deux cas, on détecte un ion de rapport *m/z* 273 correspondant à la rupture de la liaison glycosidique. Le mécanisme de formation de cet ion C<sub>1</sub> est proposé sur la **figure 23** impliquant un transfert de méthyle. Cependant, on s'aperçoit que ces diastéréoisomères se distinguent par la présence d'un pic à *m/z* 227 pour l'anomère β. Cet ion correspond à la rupture de la liaison glycosidique avec rétention de charge du côté non réducteur (**figure 23b**). La présence simultanée de l'ion C<sub>1</sub> et de sa contrepartie à *m/z* 227 sur le spectre de masse de l'anomère β (**figure 22a**) suggère que dans le cas d'un disaccharide de configuration équatoriale, le site de cationisation n'est pas spécifique (**figure 23b**). Alors que dans le cas de l'anomère α, la charge est localisée au niveau de l'extrémité réductrice du sucre (voie (a) de la **figure 23**).

Par ailleurs, on détecte de nouveau les ions E et E' à *m/z* 187 et 155 mais dans des proportions relativement différentes pour les deux anomères : les ions E étant pratiquement inexistant dans le cas d'une configuration axiale. Notons que ces ions, qui ont déjà été rencontré dans le cas du monosaccharide sous photoionisation assistée par dopant, sont cette fois-ci observés en photoionisation sans dopant. Dans la région des basses masses, on retrouve les ions correspondants aux fragments issus l'ion E déjà décrits précédemment.

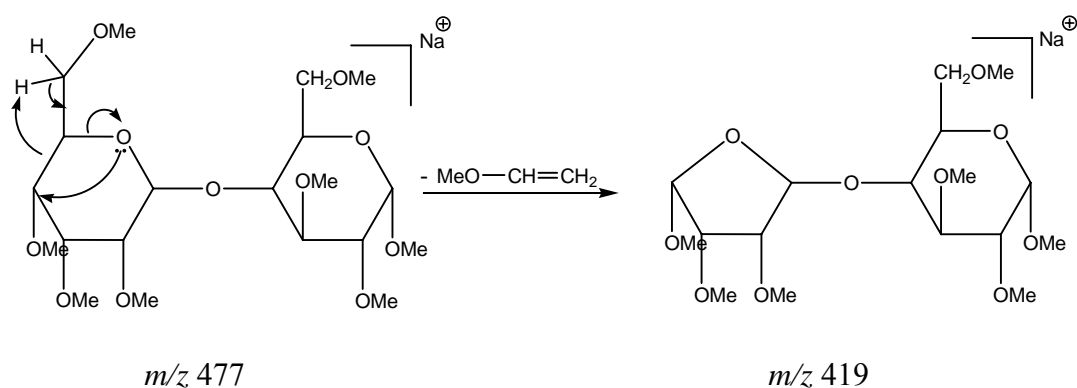


**Figure 22** : Spectres de masse APPI enregistrés dans H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v) du (a) lactose (b) maltose et (c) tréhalose perméthylés



**Figure 23** : Formation de l'ion  $C_1$  dans le cas des anomères (a)  $\alpha$  et (b)  $\beta$

Un ion, relativement peu abondant, est observé à  $m/z$  419 qui correspond à une perte de  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{OMe}$  sur l'espèce cationisée  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Son processus de fragmentation implique un rétrécissement du cycle comme suggéré par le mécanisme décrit sur la **figure 24**.



**Figure 24:** Mécanisme hypothétique de formation de l'ion à  $m/z$  419 à partir de l'espèce sodée  $[M+Na]^+$

En définitive, les spectres de masse de ces diastéréoisomères permettent leur différenciation par les variations d'abondances relatives des ions fragments observés et par la présence de pics supplémentaires d'un diastéréoisomère à l'autre.

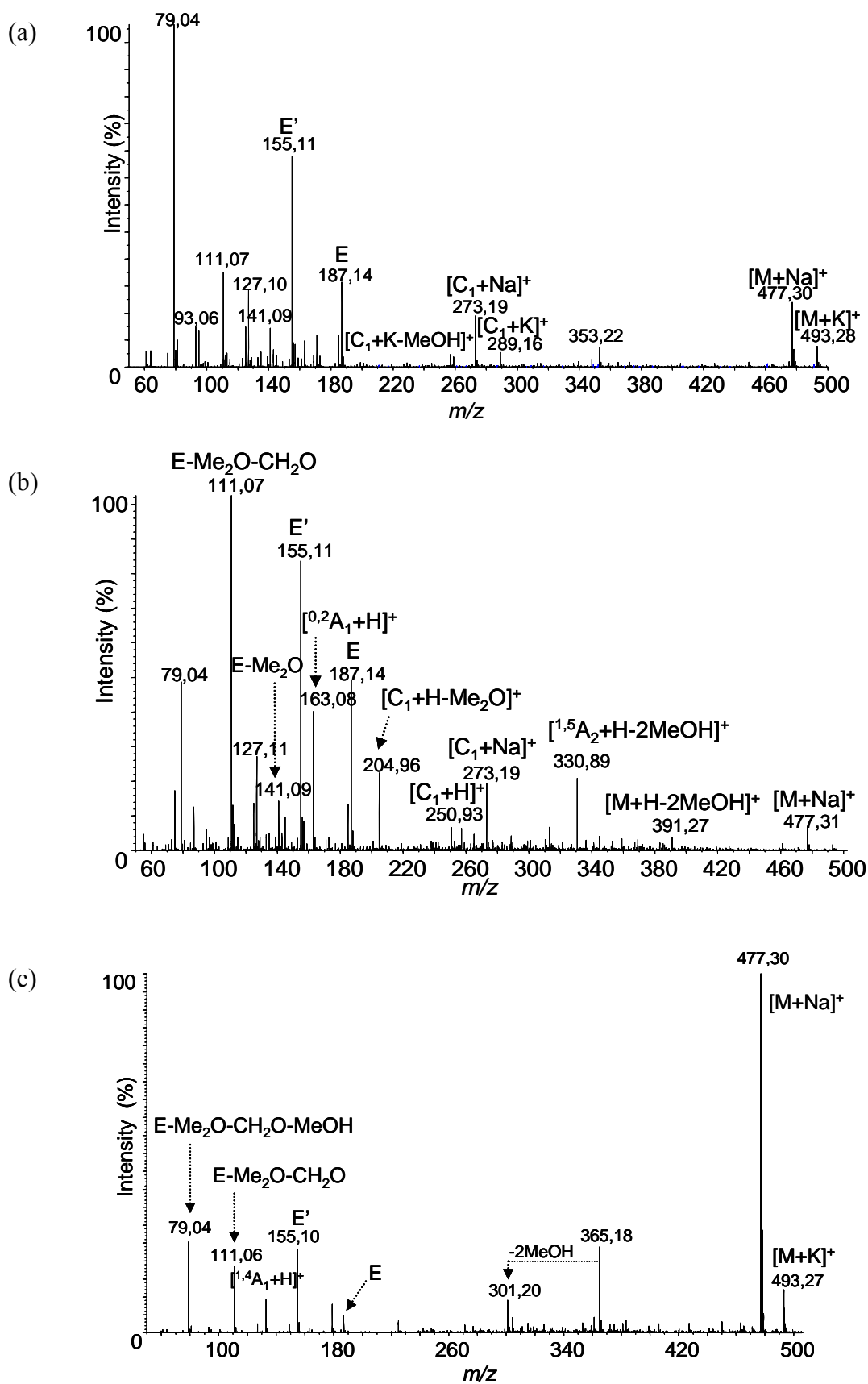
- *Etude des isomères de position des composés II'<sub>β</sub> dans H<sub>2</sub>O/MeOH*

Les spectres APPI des composés II'<sub>β(1-4)</sub> et II'<sub>β(1-1)</sub> sont présentés sur les **figures 22a** et **22c** respectivement. On détecte, dans le cas de l'isomère de position (1-1), une espèce cationisée  $[M+Na]^+$  très abondante avec très peu de fragments. L'abondance relative des ions fragments présents sur le spectre de masse, majoritairement des fragments issus de l'ion E, ne dépasse pas 5% du pic de base. L'absence de l'ion C<sub>1</sub> à  $m/z$  273 indique la plus grande stabilité des liaisons (1-1) que celle des liaisons (1-4). Ces différences spectrales ont déjà observées dans le cas des sucres natifs et ne seront donc pas développées ici.

#### IV.2.2 Etude dans le chloroforme

Lorsque l'on compare les **figures 22a/22b** aux **figures 25a/25b** respectivement, on s'aperçoit que l'on retrouve dans le chloroforme la totalité des ions fragments observés dans le solvant H<sub>2</sub>O/MeOH. Néanmoins, de nombreux ions fragments supplémentaires non décrits auparavant sont détectés ici.





**Figure 25** : Spectres APPI enregistrés dans CHCl<sub>3</sub> en mode positif du (a) lactose (b) maltose et (c) tréhalose perméthylés

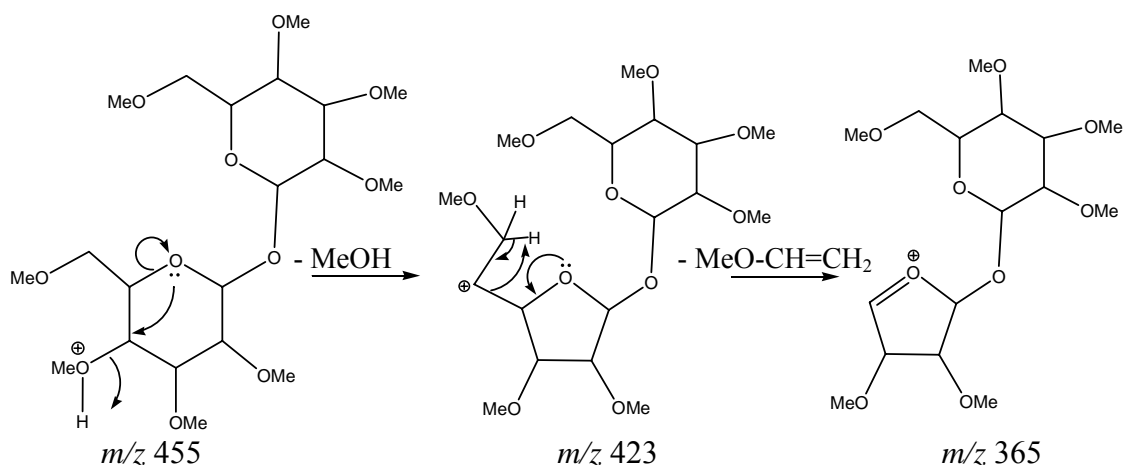
En comparant maintenant les isomères de configuration entre eux, au sein du même système de solvant, on remarque que les spectres sont légèrement différents (**figures 25a** et **25b**), notamment par la présence non négligeable de l'ion  $[M+H-2MeOH]^+$  et d'espèces issues de la rupture glycosidique :  $[C_1+H]^+$  et  $[C_1+H-Me_2O]^+$  à  $m/z$  391, 251 et 205 sur le spectre de l'anomère  $\alpha$  (**figure 25b**). Des ruptures du cycle osidique sont aussi détectées grâce à la présence des ions  $[^{1,5}A_2+H-2MeOH]^+$  et  $[^{0,2}A_1+H]^+$  à  $m/z$  331 et 163 respectivement. Les abondances relatives des ions à  $m/z$  79 et 111 diffèrent de manière significative entre les deux anomères de configuration, constituant ainsi un effet de stéréochimie remarquable permettant leur distinction sans ambiguïté. En effet, le rapport d'intensité (79/111) est de  $\frac{1}{2}$  dans le cas d'une liaison axiale et s'élève à 4 dans le cas d'une liaison équatoriale.

- *Comparaison des spectres des isomères de position dans le chloroforme*

Le spectre du composé  $II'_{\beta(1-1)}$  est présenté sur la **figure 25c**. Ce spectre met en évidence une espèce  $[M+Na]^+$  relativement stable avec quelques fragments minoritaires. Ce spectre est comparable à celui obtenu dans  $H_2O/MeOH$  à l'exception de la présence d'un ion à  $m/z$  133 correspondant à l'espèce  $[^{1,4}A_1+H]^+$ . Par ailleurs, une nouvelle espèce est aussi détectée à  $m/z$  365. Le mécanisme de formation de cet ion est proposé sur la **figure 26**. Celui-ci met en jeu un ion précurseur protoné (non détecté sur le spectre) avec un rétrécissement du cycle par perte d'une molécule de méthanol qui, ensuite par réarrangement et perte d'un neutre, conduit à l'ion de rapport  $m/z$  365. Cette espèce peut à son tour perdre successivement deux molécules de méthanol pour conduire à l'ion à  $m/z$  301.

*En résumé, on observe :*

- *les mêmes tendances en termes d'abondances relatives obtenues dans le système  $H_2O/MeOH$  (50:50, v/v)*
- *les molécules cationisées possédant des liaisons (1-1) seront plus stables que celles possédant des liaisons (1-4)*
- *l'affinité protonique de l'anomère  $\alpha$  est plus élevée que celle de l'anomère  $\beta$*



**Figure 26** : Mécanisme hypothétique de formation de l'ion à  $m/z$  365 à partir de l'espèce protonée  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### IV.3 Etude de trisaccharides perméthylés

Les structures des trisaccharides étudiées ici sont présentées sur la **figure 16**. Les spectres des deux trisaccharides étudiés ( $\text{III}'_\alpha$  et  $\text{III}'_\beta$ ) sont présentés sur les **figures 27** et **28**.

##### IV.3.1 Etude du cellotriose ( $\text{III}'_\beta$ )

La **figure 27a** présente le spectre de masse du composé  $\text{III}'_\beta$  enregistré dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (50:50, v/v) et celui du composé  $\text{III}'_\alpha$  sur la **figure 28a**.

Dans le cas du cellotriose (**figure 27a**), le spectre montre une espèce  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , détectée à  $m/z$  681, quasi inexistante laissant place essentiellement à des ruptures glycosidiques pour donner les ions  $\text{C}_2$  et  $\text{C}_1$  détectés sous leur forme cationisée à  $m/z$  477 et 273 respectivement. Par ailleurs, on observe sur le spectre de masse entre ces deux pics une espèce dichargée à  $m/z$  349 correspondant à l'espèce  $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$ . Enfin, dans les basses masses, les autres ions fragments détectés ont déjà été décrits précédemment et correspondent à des ions secondaires de type E ainsi que des fragments issus de ceux-ci.

Dans le chloroforme (**figure 27b**), le comportement de ce trisaccharide est très différent puisqu'on observe cette fois-ci une espèce  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  très abondante (correspondant au pic de

base) avec une seule rupture de la liaison glycosidique pour donner l'ion  $C_2$  à  $m/z$  477. La seconde différence provient de la présence de fragments issus de rupture du cycle tels que les ions  $^{0,2}A_1$  et  $^{1,4}A_1$  détectés sous leur forme protonée. Ces espèces étaient absentes dans les conditions précédentes. D'une manière générale, l'espèce cationisée du cellotriose est beaucoup plus stable dans le chloroforme.

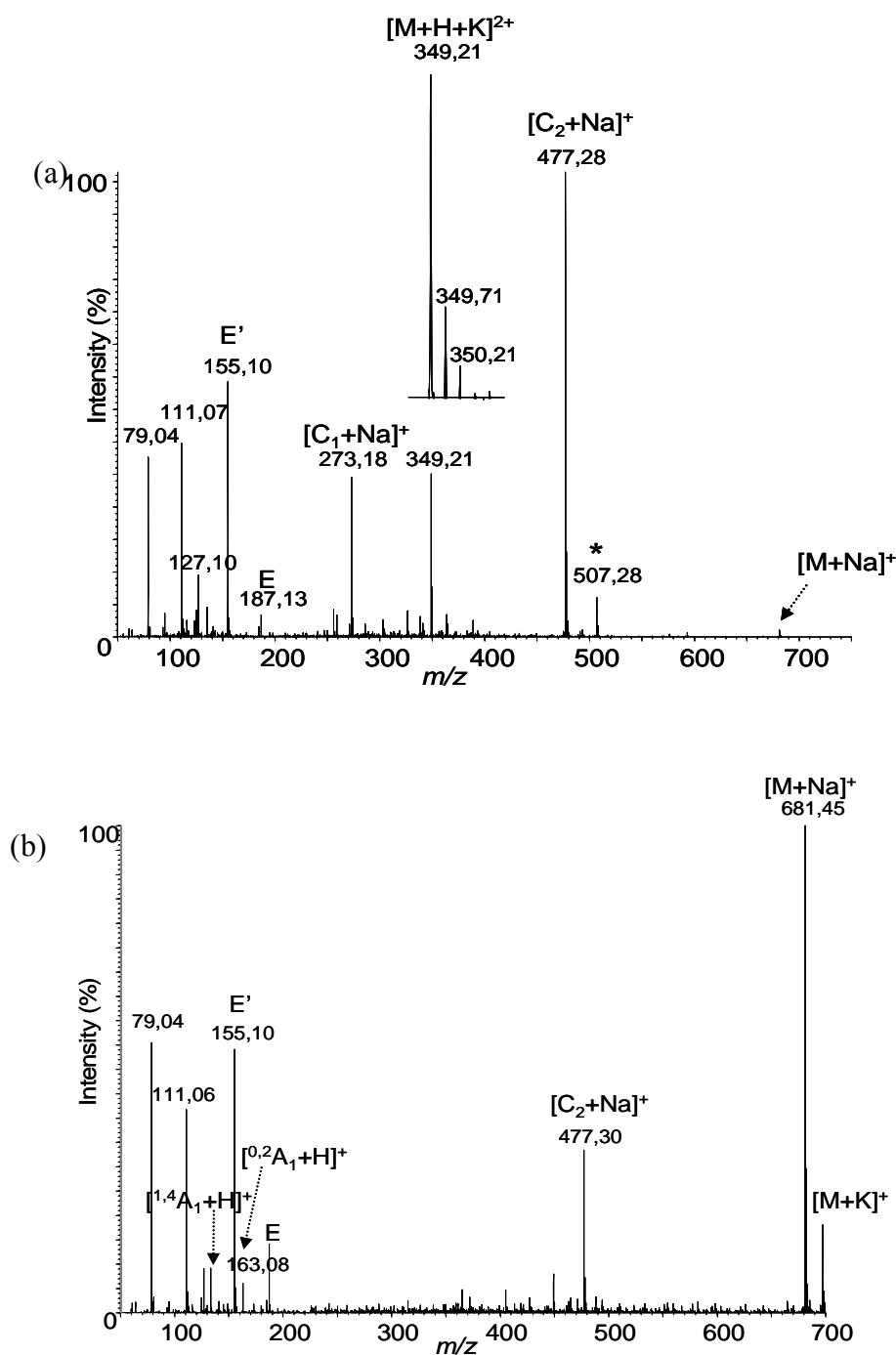
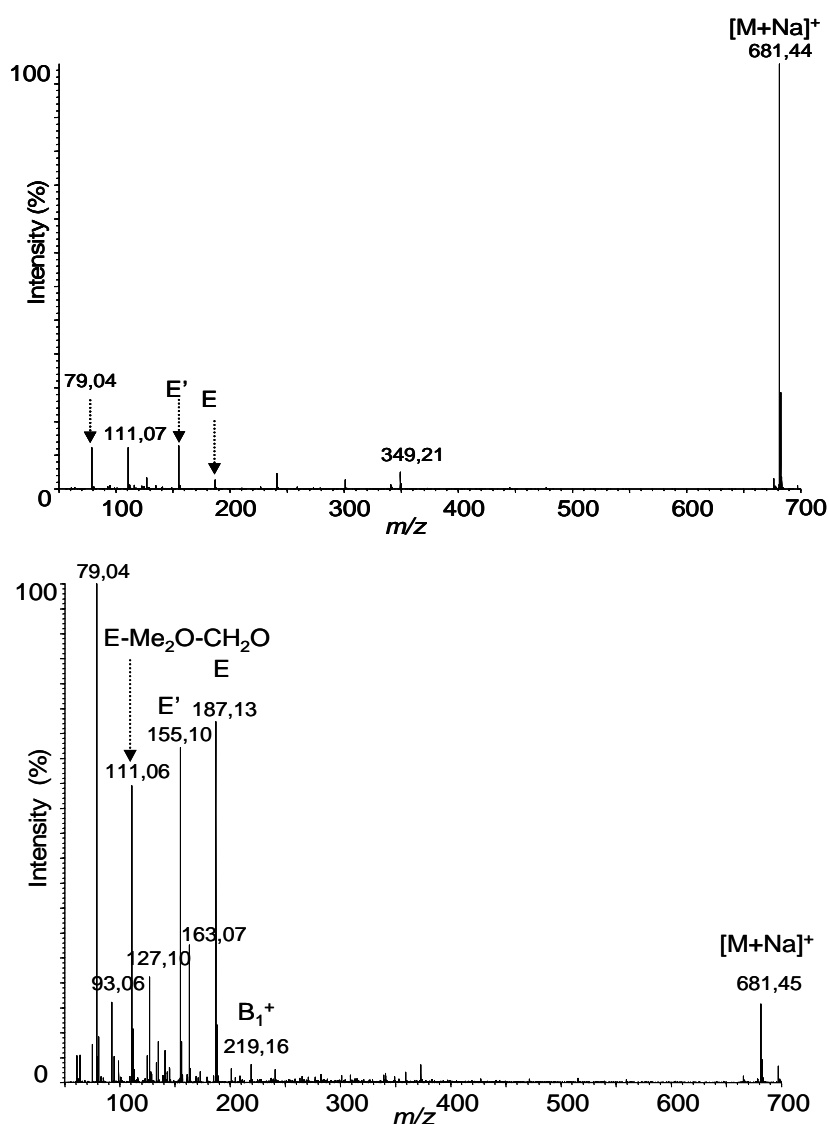


Figure 27 : Spectres APPI du cellotriose perméthylé enregistrés dans (a)  $H_2O/MeOH$   
(b)  $CHCl_3$

### IV.3.2 Etude du raffinose

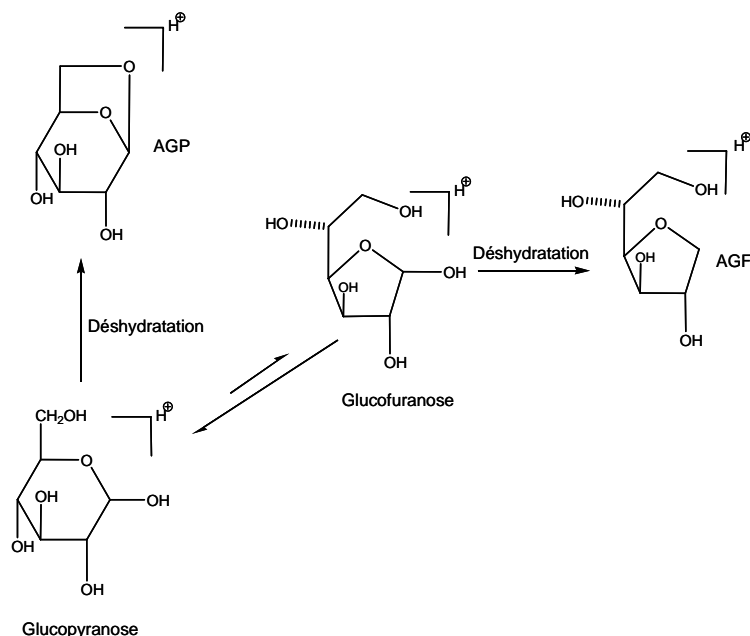
Contrairement au cellotriose, le spectre de masse du raffinose enregistré dans le système H<sub>2</sub>O/MeOH présente une espèce [M+Na]<sup>+</sup> très stable (*figure 28a*). D'ailleurs, le spectre de masse présente que très peu de fragments. Lorsqu'on passe dans le chloroforme (*figure 28b*), on a le phénomène inverse qui se produit cette fois-ci : l'abondance des espèces protonées augmente par rapport aux espèces sodées. Cette suggestion est confirmée par l'abondance relative des ions E et E' sur le spectre de masse enregistré dans le chloroforme (*figure 28b*). Par ailleurs, il est intéressant de souligner la présence de l'ion B<sub>1</sub> détecté pour la première fois à *m/z* 219.



**Figure 28** : Spectres APPI du raffinose perméthylé enregistrés dans (a) H<sub>2</sub>O/MeOH (b) CHCl<sub>3</sub>

## V. CONCLUSIONS GENERALES : COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES AUTRES TECHNIQUES

Récemment, Sasaki *et al.* ont montré qu'il se produisait une transformation thermochimique du glucose en 1,6-anhydroglucose en phase vapeur dans l'eau à haute température et à pression atmosphérique [Sasaki, 2008]. Ceci n'est valable que dans le cas du sucre non dérivés comme le décrit la **figure 29**. Nos résultats confirment cette observation. En effet, le pic de base sur les spectres de masse du glucose natif enregistré en photoionisation assistée dans H<sub>2</sub>O/MeOH correspond à l'ion à  $m/z$  163 (**figure 7b et 7c**) correspondant à l'espèce protonée de l'anhydroglucopyranose (AGP) ou de l'anhydroglucofuranose (AGF). Cette observation justifie l'absence de cet ion sur le spectre de masse enregistré dans le chloroforme (**figure 8**).



**Figure 29** : Principaux chemins réactionnels de la transformation du glucose dans un spray à haute température

Les résultats obtenus en APPI concernant les disaccharides étudiés natifs et perméthylés permettent de mettre en évidence plusieurs faits :

- une espèce cationisée  $[M+Na]^+$  dans tous les cas
- des ions fragments issus de rupture de cycle majoritaire de type  $^{0,2}A_2$  et  $^{2,4}A_2$
- un ion issu de la rupture de la liaison glycosidique  $C_1$  minoritaire

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus en CID basse énergie [Lemoine, 1993] effectués sur un triple quadropole où l'on retrouve principalement :

- des fragments glycosidiques (C et Y)
- avec des ruptures peu abondantes au niveau de l'hétérocycle pour donner des ions minoritaire de type A ou X

-

*Remarque* : En CID haute énergie, on a aussi production de fragments issus de rupture glycosidique et osidique. Ces derniers étant plus importants lorsque l'énergie du gaz de collision augmente, plus particulièrement lorsqu'on remplace l'hélium par l'argon.

Quand aux spectres de sucres perméthylés obtenus en MADI TOF-TOF, ils mettent en évidence généralement des ions B et Y abondants avec quelques ions A et X [Morelle, 2004]. Mechref *et al.*, ont montré que dans certains cas les ions issus de rupture de cycle pouvaient être plus intenses que les ions B et Y [Mechref, 1998].

Les spectres FAB d'oligosaccharides en mode d'ionisation positif mettent en évidence des ruptures glycosidiques avec des ions de type A rarement observés [Domon, 1988]. Ce résultat diffère de ceux obtenus en APPI.

## REFERENCES VII

### *B*

[Bahr, 1997] U. Bahr, A. Pfenninger, M. Karas et B. Stahl, High sensitivity analysis of neutral underivatized oligosaccharides by nanoelectrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 69, 1997, 4530-4535

[Björndal, 1967] H. Björndal, B. Lindberg et S. Svensson, Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates, *Carb. Res.*, 5, 1967, 433-440

[Bourne, 1949] E J Bourne, M Stacey, J C Tatlow et J M Tedder, *J. Chem. Soc.*, 1949, 2976-2979

### *C*

[Ciucanu, 1984] I Ciucanu et F Kerek, A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, *Carbohydrate Research*, 131, 1984, 209-217

[Ciucanu, 2003] I Ciucanu et C E Costello, Elimination of oxidative degradation during the per-*O*-methylation of carbohydrates, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2003, 16213-16219

### *D*

[Dell, 1990] A. Dell, *Methods in Enzymology*, vol 193, edited by McCloskey J.A., Academic Press, New York, 1990, pp 647-660

[Domon, 1988] B Domon et C E Costello, A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate J*, 5, 1988, 397-409

### *H*

[Hellerqvist, 1990] C.G. Hellerqvist, *Methods in Enzymology*, vol 193, edited by McCloskey J.A., Academic Press, New York, 1990, pp 554-573



[Hofmeister, 1991] G E Hofmeister, Z Zhou et J A Leary, Linkage position determination in lithium-cationized disaccharides: tandem mass spectrometry and semiempirical calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1991, 5964-5970

## $\mathcal{K}$

[Kochetkov, 1966] N K Kochetkov et O S Chizhov, Mass spectrometry of carbohydrate derivatives, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 21, 1966, 39-92

[König, 1998] S König et J A Leary, Evidence for linkage position determination in cobalt coordinated pentasaccharides using ion trap mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11, 1998, 1125-1134

## $\mathcal{L}$

[Lemoine, 1993] J Lemoine, B Fournet, D Despeyroux, K R Jennings, R Rosenberg et E de Hoffmann, Collision-induced dissociation of alkali metal cationized and permethylated oligosaccharides: influence of the collision energy and of the collision gas for the assignment of linkage position, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 4, 1993, 197-203

## $\mathcal{M}$

[Martin, 1989] W B Martin, L Silly, C M Murphy, T J Raley, R J Cotter et M F Bean, Fragmentation of carbohydrates in laser Desorption, plasma Desorption and fast atom bombardment mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 92, 1989, 243-265

[Mechref, 1998] Y. Mechref et M.V. Novotny, Mass spectrometry mapping and sequencing of N-linked oligosaccharides derived from submicrogram amounts of glycoproteins, *Anal. Chem.*, 1998, 3, 455-463

[Merkle, 1994] R.K. Merkle et I. Poppe, *Methods in Enzymology*, vol 230, edited by Lennarz J.K. et Hart G.W., Academic Press, New York, 1994, pp 1-15

[Morelle, 2004] W. Morelle, M-C. Slomianny, H. Diemer, C. Shaeffer, A. van Dorsselaer et J. C. Michalski, Fragmentation characteristics of Permethylated oligosaccharides using a matrix

assisted laser desorption/ionization two stage time of flight (TOF/TOF) tandem mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18, 2637-2649

## S

[Sasaki, 2008] M. Sasaki, K. Takahashi, Y. Haneda, H. Satoh, A. Sasaki, A. Narumi, T. Satoh, T. Kakuchi et H. Kaga, Thermochemical transformation of glucose to 1,6-anhydroglucose in high temperature steam, *Carbohydr. Res.*, 343, 2008, 848-854

[Spengler, 1990] B Spengler, J W Dolce et R J Cotter, Infrared laser Desorption mass spectrometry of oligosaccharides: fragmentation mechanisms and isomer analysis, *Anal. Chem.*, 62, 1990, 1731-1737

## V

[Viseux, 1997] N Viseux, E de Hoffmann et B Domon, Structural analysis of permethylated oligosaccharides by electrospray tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 69, 1997, 3193-3198

[Viseux, 1998] N Viseux, E de Hoffmann et B Domon, Structural assignment of permethylated oligosaccharide subunits using sequential tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 23, 1998, 4951-4959

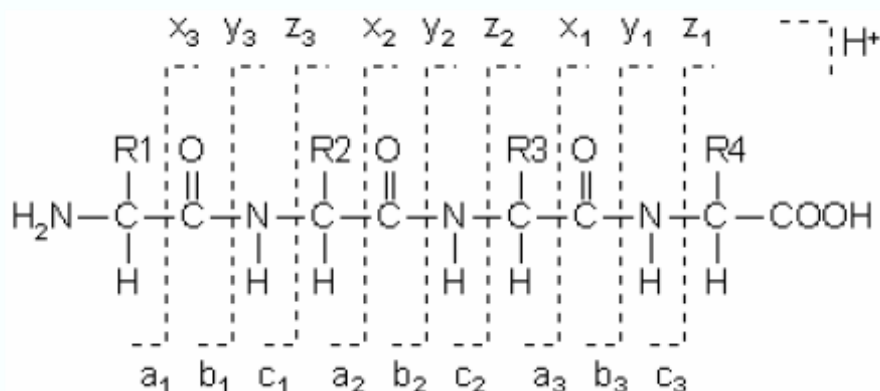
*Chapitre 8 :*  
*Etude de peptides*

### I. INTRODUCTION GENERALE

I.1 Nomenclature de la fragmentation des peptides et mécanismes de formation des ions

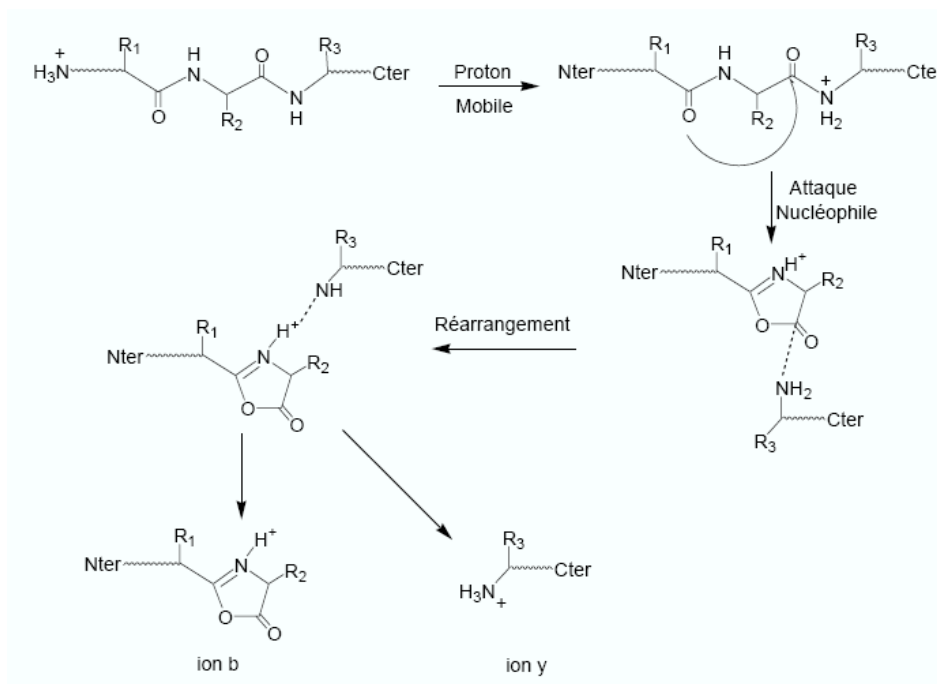
#### *I.1.1 Nomenclature pour le mode positif*

La nomenclature adoptée pour la fragmentation des peptides est celle proposée par Biemann [Biemann, 1987] et modifiée par Roepstorff et Fohlman en 1984 [Roepstorff, 1984] (*figure 1*).



**Figure 1** : Nomenclature pour la fragmentation des peptides

Les ions sont notés  $a_i$ ,  $b_i$  ou  $c_i$  s'ils comportent l'extrémité N-terminale et  $x_i$ ,  $y_i$  ou  $z_i$  s'ils portent l'extrémité C-terminale. Le numéro indique le nombre d'acides aminés que contient l'ion. La rupture de la liaison peptidique conduit aux ions  $b$  et  $y$ . Une revue récente de Paizs et Suhai fait le point sur les mécanismes réactionnels (proposés sur la base de calculs de chimie quantique et d'expériences) permettant d'expliquer principalement la formation des ions  $b$  et  $y$  [Paizs, 2005]. Ils montrent notamment que la formation de ces ions, par des collisions de basse énergie peut être expliquée par un mécanisme à plusieurs étapes (*figure 2*).

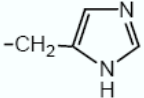
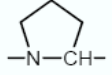
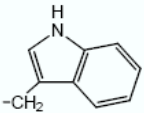
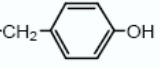


**Figure 2** : Mécanisme de formation des ions *y* et *b* selon [Paizs, 2005]

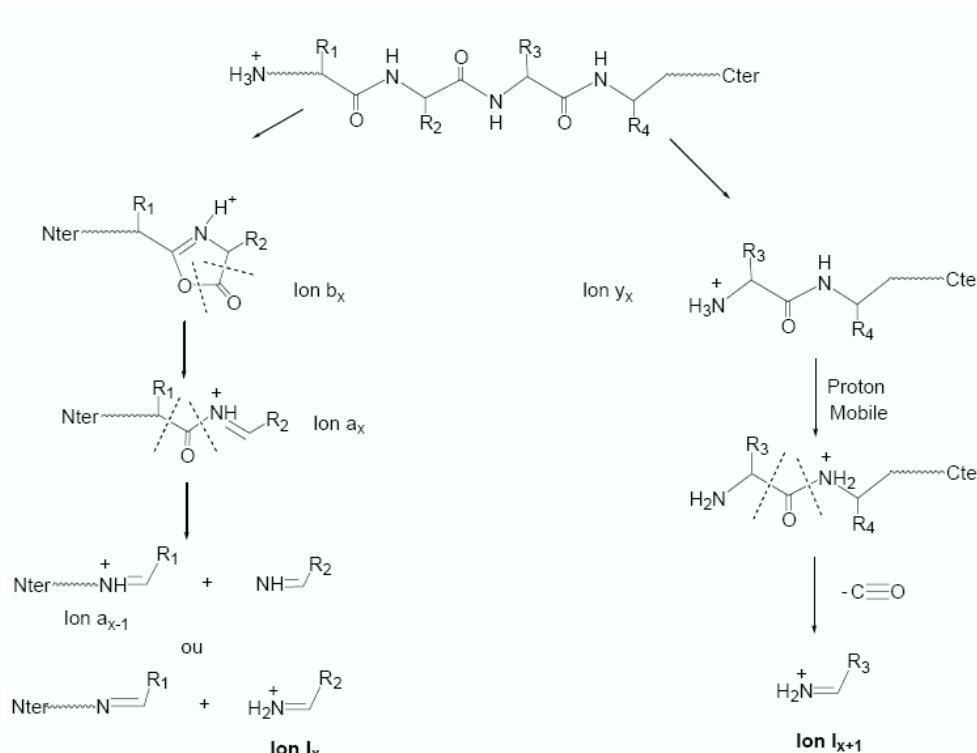
La première étape est le transfert de proton mobile situé sur l'extrémité *N*-terminale vers l'azote d'un amide d'une liaison peptidique. Cette étape est suivie d'une attaque nucléophile de l'oxygène du carbonyle de l'acide aminé du côté *N*-terminal sur le carbone du carbonyle de l'acide aminé activé par la protonation. Cette attaque conduit, après réarrangement des différents constituants du complexe, à la formation d'une oxazolone protonée si le proton reste du côté *N*-terminal (ions *b*) et d'un peptide tronqué protoné si le proton reste du côté *C*-terminal (ions *y*). Bien que d'autres chemins de fragmentation existent pour former des ions *y* et *b* (attaque nucléophile des chaînes latérales, formation de dicétopipérazines ou d'aziridinones, etc.), le mécanisme proposé ci-dessus est celui qui est applicable dans la majorité des cas.

Pour les spectres de fragmentation comportant plusieurs ions *y* ou *b* consécutifs, la séquence primaire devient facilement lisible puisque la différence de masse entre deux ions *y* ou deux ions *b* consécutifs correspond exactement à la masse d'un résidu d'acide aminé (**tableau 1**).

**Tableau 1** : Les 20 acides aminés naturels les plus courants

Nom	Code 1 lettre	Code 3 lettres	Masse monoisotopique (Da)	Acide aminé (NH-CHR-CO) R=
Alanine	A	Ala	71,0371	-CH <sub>3</sub>
Arginine	R	Arg	156,1011	-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHC(NH <sub>2</sub> )=NH
Asparagine	N	Asn	114,0429	-CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub>
Aspartate	D	Asp	115,0269	-CH <sub>2</sub> -COOH
Cystéine	C	Cys	103,0092	-CH <sub>2</sub> -SH
Glutamate	E	Glu	129,0426	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
Glutamine	Q	Gln	128,0586	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub>
Glycine	G	Gly	57,0215	-H
Histidine	H	His	137,0589	
Isoleucine	I	Ile	113,0841	-CH (CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
Leucine	L	Leu	113,0841	-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Lysine	K	Lys	128,0950	-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>
Méthionine	M	Met	131,0405	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>
Phénylalanine	F	Phe	147,0684	-CH <sub>2</sub> -Ph
Proline	P	Pro	97,0528	
Sérine	S	Ser	87,0320	-CH <sub>2</sub> -OH
Thréonine	T	Thr	101,0477	-CH(OH)CH <sub>3</sub>
Tryptophane	W	Trp	186,0793	
Tyrosine	Y	Tyr	163,0633	-CH <sub>2</sub> - 
Valine	V	Val	99,0684	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

Les ions immoniums (*figure 3*) représentent un autre type d'ions très intéressant d'un point de vue analytique. Contrairement aux séries *y* et *b*, les immoniums ne donnent pas d'information sur l'enchaînement des acides aminés dans la séquence primaire du peptide mais permettent d'obtenir des informations sur la nature des acides aminés présents dans la séquence, quelle que soit leur position.



**Figure 3** : Mécanismes de formation des ions immoniums d'après [Paizs, 2005]

### 1.1.2 Etude de peptides en mode d'ionisation négatif

L'importance de la spectrométrie de masse et des techniques associées pour le séquençage de peptides et de protéines est reconnue et est, de loin, la plus grande application de cette technique analytique. Cependant, la plupart des efforts se sont consacrés au mode d'ionisation positif. Néanmoins, quelques groupes [Bowie, 2002, Ewing, 2000 et Harrison, 2000] ont montré que les dissociations induites par collision de peptides déprotonés produisent souvent autant, et dans certains cas plus, d'information de séquence que les expériences de CID sur des peptides protonés. La fragmentation de peptides déprotonés paraît être complexe et selon Bowie *et al.* : “ La plupart des ions fragments de séquence détectés en mode d'ionisation négatif ne possèdent pas d'analogues dans le mode positif.” [Bowie, 2002]. Ainsi, Bowie *et al.* et d'autres groupes ont choisi de ne pas adapter la terminologie des ions positifs pour la fragmentation des ions en mode négatif. A côté de cela et par opposition, d'autres groupes [Ewing, 2000 et Harrison, 2000] ont adapté la nomenclature de Biemann [Biemann, 1987] pour décrire les ions fragments obtenus en mode négatif.

Dans la suite de ce travail, nous nous appuyons sur la nomenclature proposée par Ewing et Cassady [Ewing, 2000] qui elle même est basée sur la nomenclature de Biemann pour le mode positif, permettant ainsi une comparaison directe entre le mode positif et le mode négatif. En fait, la nomenclature utilisée par Ewing et Cassady est basée sur la forme hypothétique de l'espèce neutre alors qu'au cours de cette étude, nous avons choisi de référencer la totalité des ions fragments obtenus par rapport à l'ion positif. Le **tableau 2** ci-dessous précise la structure des ions fragments selon la nomenclature utilisée au cours de ce travail.

**Tableau 2** : Nomenclature et structure des ions fragments employées dans cette étude

Ions	Mode positif	Mode négatif
$a_n$	$\text{H}-(\text{HN}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\overset{\oplus}{\text{N}}=\text{CH}-\text{R}_n$	$\left[ \text{H}-(\text{HN}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{NH}-\underset{\text{H}}{\text{C}}-\text{R}_n \quad -(j-1)\text{H} \right]^{j-}$
$b_n$	$\text{H}-(\text{HN}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{NH}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}_n}{\text{C}}}-\overset{\oplus}{\text{C}}=\text{O}$	$\left[ \text{H}-(\text{HN}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{NH}-\underset{\text{R}_n}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{CO} \quad -(j-1)\text{H} \text{ ou } \cdot(j+1)\text{H} \right]^{j-}$
$c_n$	$\text{H}-(\text{HN}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{NH}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}_n}{\text{C}}}-\text{CO}-\overset{\oplus}{\text{N}}\text{H}_3$	$\left[ \text{H}-(\text{HN}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{NH}-\underset{\text{R}_n}{\overset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{CO}-\text{NH} \quad -(j-1)\text{H} \right]^{j-}$
$x_n$	$\overset{\oplus}{\text{O}}\text{C}-\text{HN}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}_n}{\text{C}}}-\text{CO}-(\text{NH}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{O}$	$\left[ \text{O}\text{C}-\text{HN}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}_n}{\text{C}}}-\text{CO}-(\text{NH}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{O}\text{H} \quad -(j-1)\text{H} \text{ ou } \cdot j\text{H} \right]^j$
$y_n$	$\overset{\oplus}{\text{H}_3}\text{N}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}_n}{\text{C}}}-\text{CO}-(\text{NH}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{O}\text{H}$	$\left[ \text{H}\text{N}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}_n}{\text{C}}}-\text{CO}-(\text{NH}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{O}\text{H} \quad -(j-1)\text{H} \right]^{j-}$
$z_n$	$\text{H}^{\oplus} \left[ \begin{array}{c} \text{R}_n \\   \\ \text{H}\text{C}-\text{CO}-(\text{NH}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{O}\text{H} \end{array} \right]$	$\left[ \begin{array}{c} \text{R}_n \\   \\ \text{H}\text{C}-\text{O}\text{C}-(\text{NH}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{R}}{\text{C}}}-\text{CO})_{n-1}-\text{O}\text{H} \quad -(j-1)\text{H} \end{array} \right]^{j-}$



Lorsqu'on compare les spectres CID de peptides déprotonés à ceux des protonés, on s'aperçoit immédiatement de la grande variété des ions fragments générés en mode d'ionisation négatif. En effet, les spectres CID des peptides protonés conduisent généralement à des ions de séquence de type  $b$  et  $y$  alors que pour les peptides déprotonés, ce sont les ions  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $x$  qui sont formés majoritairement accompagnés de pertes de neutres de 15 ( $\text{CH}_3$ ), 17 ( $\text{NH}_3$ ), 18 ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 35 ( $\text{NH}_3+\text{H}_2\text{O}$ ), 44 ( $\text{CO}_2$ ) ou 61 unités ( $\text{CO}_2+\text{NH}_3$ ) par exemple. Harrison a rapporté que les fragmentations  $b_n$  et  $y_n$  sont les plus abondantes dans le cas de peptides de petite taille et a suggéré que pour des peptides de plus haut poids moléculaires, les spectres de masse sont dominés par des ions de type  $c_n$  et  $y_n$ .

## I.2 Brève revue de la littérature partant sur les mécanismes observés en ECD

Les ions immoniums sont issus de plusieurs ruptures dans le squelette polypeptidique. Notons également qu'en collision de faible énergie, il est possible d'observer des ions de type  $a$ . Ils découlent principalement de la perte d'une molécule de monoxyde de carbone par les ions  $b$  bien que d'autres mécanismes permettent également de les former. D'autres fragmentations, résultant de la perte de molécules neutres ( $-\text{NH}_3$  ou  $-\text{H}_2\text{O}$ ), sont couramment observées et dépendent de la nature des acides aminés présents dans le peptide. Enfin, des fragmentations internes peuvent aussi être présentes en faibles intensités dans les spectres. Les autres types d'ions ne sont pas (ou peu) observés en MS/MS de faible énergie.

Des ions caractéristiques de la chaîne latérale sont en revanche observés dans les spectres de fragmentation haute énergie (ions  $w$  et  $v$ ) et peuvent se révéler utiles pour distinguer des isomères leucine/isoleucine par exemple. Les spectres de fragmentation des peptides à haute énergie sont très complexes car on peut en fait observer à peu près tous les types d'ions fragments et notamment l'apparition de cations radicaux.

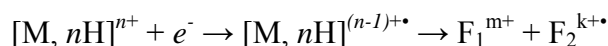
Si la fragmentation par collision permet d'obtenir des informations très intéressantes sur la structure primaire d'un peptide, voire dans certains cas reconstruire totalement sa séquence, elle n'est pas particulièrement bien adaptée pour les peptides portant des modifications post-traductionnelles labiles (glycosylations, phosphorylations...). En effet, dans ces cas particuliers, la liaison la plus faible devient celle liant la modification et le squelette peptidique. De ce fait, c'est souvent la première liaison qui se rompt lorsque l'on apporte de l'énergie au système, rendant très difficile la localisation de la modification dans la séquence

peptidique. Des techniques émergentes comme la capture (ou le transfert) d'électrons dissociatif (ECD ou ETD) permettent de contourner ce problème.

Les réactions et les dissociations induites par capture électronique sur des peptides (ou protéines) multichargé(e)s peuvent être considérées comme une technique de spectrométrie de masse tandem possédant des capacités uniques.

### *1.2.1 Principe de base de l'ECD*

La capture d'électron dissociative (ECD pour *Electron Capture Dissociation*) est une méthode d'activation récente permettant d'accéder à des types de fragmentations différents de ceux observées par les méthodes classiques de MS/MS par collisions avec un gaz inerte. Les premières expériences d'ECD ont été menées par Zubarev dans l'équipe de Mc Lafferty en 1998 [Zubarev, 1998]. Ils ont notamment observé qu'une protéine multiprotonée irradiée par un faisceau d'électrons thermiques (ou de faible énergie) était capable de capturer un électron pour former un cation radical conduisant à des ions fragments de type *c* et *z* selon :



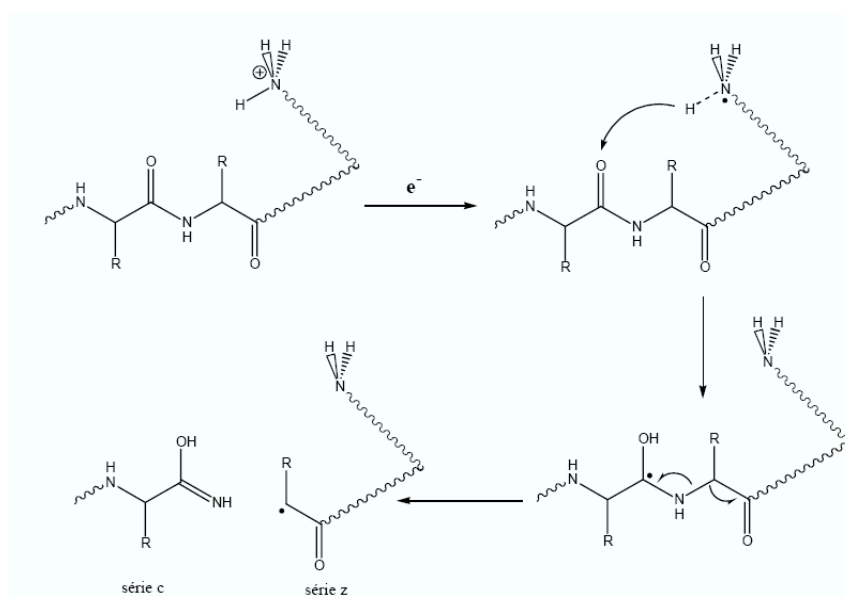
Cette technique de dissociation se distingue particulièrement des autres techniques puisqu'elle ne conduit pas au clivage de la liaison peptidique mais à celui de la liaison N-C $\alpha$  du peptide en laissant intactes toutes les chaînes latérales. Ainsi, les modifications post-traductionnelles labiles (phosphorylation, O-glycosylation, N-glycosylation,...) restent attachées au squelette ce qui permet leur localisation et leur identification.

Un autre avantage de cette technique est que la fragmentation dépend assez peu de la séquence du peptide fragmenté puisque ce n'est pas un proton mobile qui induit la fragmentation en s'échantillonnant sur le squelette peptidique. En revanche, un point important, du point de vue des applications, est que l'ECD ne permet pas d'observer la rupture de la liaison Xxx-Pro en raison de la structure cyclique de la proline.

### *1.2.2 Mécanismes proposés*

Le phénomène de base de la capture d'électron dissociative (ECD) est un mécanisme de recombinaison dissociative suivi d'une capture d'un électron libre sur un peptide multichargé isolé en phase gazeuse. Une grande quantité d'énergie déposée sur l'ion conduit à

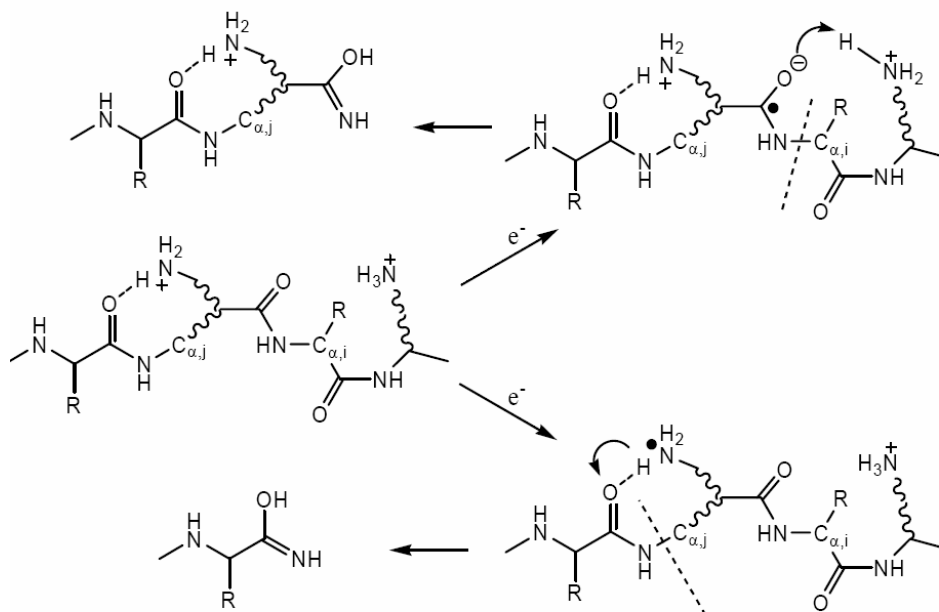
des ions de type *c* et *z* selon que la charge résiduelle réside du côté N-terminal ou C-terminal respectivement. Ce processus conduisant à des ruptures de la liaison N-C<sub>α</sub> est à l'heure actuelle sujet à controverse [Zubarev, 1998, 1999 et 2002 ; Kruger, 1999 ; McLafferty, 2001 ; Syrstad, 2001 et 2003 ; Takayama, 2001a ; Tureček, 2003a et 2003b]. Le premier mécanisme proposé implique une capture d'électron sur un azote protoné suivie d'un transfert d'atome d'hydrogène sur le carbonyle [Zubarev, 1998]. L'espèce radicalaire formée se dissocie alors par une rupture de la liaison N-C<sub>α</sub> comme représenté dans la **figure 4**.



**Figure 4** : Mécanisme de l'ECD proposé par Zubarev et Mc Lafferty [Zubarev, 1998]

Syrstad et Tureček [Syrstad, 2005] ont complété ce schéma en considérant une capture électronique sur le carbonyle. La « super base » amide résultante extrait un proton sur un site accessible menant la rupture de la liaison N-C<sub>α</sub>. Ce mécanisme permet d'expliquer une telle dissociation des peptides portant des charges autres que l'azote protoné [Chamot-Rooke, 2005].

Récemment, une variante de ce mécanisme a été proposée [Patriksson, 2006], dans laquelle la capture d'électron a lieu sur une liaison hydrogène neutre entre un azote d'un amide et un groupement carbonyle. Un site anionique est formé au niveau de l'azote de l'amide et un atome d'hydrogène est transféré au carbonyle pour former un radical aminocétyle qui évolue vers une rupture de la liaison N-C<sub>α</sub> (**figure 5**).



**Figure 5** : Mécanisme de l'ECD revu par Syrstad et Tureček [Syrstad, 2005]

L'un des avantages majeur de l'ECD est sa capacité à retenir les modifications post-traductionnelles et à rompre les ponts disulfures [Zubarev, 1999 et 2002]. L'intérêt de la méthode est en effet grand : en MS/MS classique, les modifications post-traductionnelles ne peuvent en général pas être observées, puisque les groupes fonctionnels concernés sont très labiles, et se dissocient avant les liaisons du squelette peptidique. En ECD par contre, on peut observer une série d'ions fragments de type c ou z' qui contiennent encore la modification. C'est donc un apport extrêmement important pour l'analyse des biomolécules, puisque ces modifications ont un rôle biologique capital, et que leur étude était jusqu'alors très complexe. A l'heure actuelle, c'est sans doute l'analyse de ces modifications qui constitue le domaine d'application le plus important de l'ECD. Dans le même ordre d'idée, l'ECD favorise la détection de l'oxydation des méthionines [Guan, 2003]. La réactivité particulière des liaisons S-S permet aussi l'étude de composés liés via un groupe thiol aux protéines, tels que certains antibiotiques [Fagerquist, 2003].

A la place de délivrer des électrons à partir d'un faisceau d'électrons, il a été démontré que des anions sélectionnés peuvent transférer les électrons de manière efficace sur les peptides multichargés [Coon, 2004 et Syka, 2004]. De telles réactions ion/ion mènent aux mêmes ions fragments de type c- et z-, identiques à ceux détectés en ECD, ont été expliqués par un mécanisme de type ETD (transfert dissociatif d'électron) [Syka, 2004 et Misharin, 2005].

L'ECD et l'ETD sont des techniques qui présentent des propriétés similaires. En effet, ces deux techniques conduisent à la formation d'ions de type  $c/z$  avec une contribution mineure pour les ions  $b/y$  [Cooper, 2005 et Pitteri, 2005] et aussi à la perte de molécules neutres telles que  $H_2O$  et  $NH_3$  [Cooper, 2003 et Leymarie, 2003]. De récents travaux ont démontré que la température a une influence sur les spectres de masse ETD et ECD [Pitteri, 2005 et Leymarie 2003] pour lesquels on observe très peu de fragmentations à basse température. Des ruptures de la liaison  $N-C_\alpha$  ont aussi été observées sous FAB [Misharin, 2005 et Berkout, 2006]. Ce phénomène a été attribué à un transfert d'électron à partir d'un atome métastable sur le peptide multichargé en passant par la formation d'un complexe de collision. Cette technique est appelée dissociation d'ions induite par des atomes métastables (MIDI) [Berkout, 2006]. Par ailleurs, il a été montré que la fragmentation en source de peptides en MALDI produit des ions  $c$  et  $z$  selon le choix de la matrice [Takayama, 2001b et Köcher, 2005]. Récemment, il a été montré que ces fragmentations ont pour origine un transfert d'atome d'hydrogène à partir de la matrice suivant des réactions photochimiques [Köcher, 2005 et Takayama, 2001a]. Par conséquent, il apparaît que les peptides multiprotonés peuvent capter des électrons provenant de diverses sources pour produire des ions de séquence de type  $c$ -et  $z$ -.

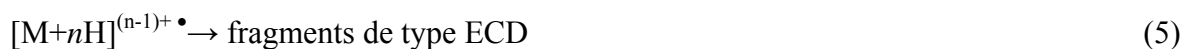
### I.3 Rappel des travaux antérieurs obtenus en photoionisation

Des études antérieures ont rapporté la formation d'ions fragments de type  $c$  sur des peptides hydrophobes en photoionisation à pression atmosphérique [Delobel, 2003]. La présence de ces fragments peu communs en mode d'ionisation positif et plus couramment rencontrés en MS/MS de haute énergie ou en ECD, est particulièrement remarquable.

Ces études ont notamment montré que la formation d'ions  $c$  en APPI en mode positif est possible sur de nombreux peptides [Delobel, 2003]. La comparaison des spectres de masse obtenus en *thermospray* avec les spectres de masse en APPI (en présence de dopant) montre une disparition ou une forte diminution de l'abondance des espèces doublement protonées concomitante avec l'apparition des fragments  $c$ . L'abondance des fragments augmente avec la quantité de dopant infusée et celle des ions multiprotonés diminue. La formation d'ions  $c$  ne semble pas être dépendante de la nature du dopant. Plusieurs dopants de propriétés physico-chimiques différentes ont été comparés et il apparaît que lorsque la section efficace de

photoionisation de ces dopants est prise en compte, tous les dopants ont le même effet sur la disparition des ions multiprotonés. Ces observations indiquent que la disparition des ions multiprotonés est reliée à la libération de photoélectrons dans le milieu lors de la photoionisation du dopant (équation 1). Ainsi, une espèce multiprotonée existante en solution serait le précurseur pour la formation des ions *c*.

La capture (équation 4) ou le transfert d'un photoélectron porté par un cluster de cosolvant par exemple (équations 2 et 3) à cette espèce multichargée produit une espèce à charge réduite de façon similaire aux mécanismes d'ECD et d'ETD.



La formation d'ions *c* a aussi été observée sur un peptide acétylé monoprotone. Cette observation n'est pas compatible avec le schéma ci-dessus. Un second mécanisme a été proposé. Il fait intervenir un transfert d'atome d'hydrogène (équation 7) par un cluster d'eau chargé négativement (équation 6). Cette réaction produit une espèce similaire chimiquement aux ions à charge réduite et pourrait donc se fragmenter selon le même schéma.



Ces travaux sont très prometteurs, et ont déjà montré les possibilités de cette source d'ions. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires à la meilleure compréhension des processus de fragmentation observés. Par exemple, l'étude de la fragmentation de peptides sous photoionisation en mode négatif n'a pas encore été entreprise. L'observation des ions

fragments de type *c* et *z* en mode d'ionisation négatif pourrait jeter un éclairage nouveau sur les mécanismes proposés [Debois, 2006]. C'est ce que nous allons essayer de voir au cours de cette partie.

#### I.4 Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail est d'étudier les motifs de fragmentation d'un même peptide se produisant en source en photoionisation dans les deux modes d'ionisation. Jusqu'ici l'étude de peptides en APPI s'est limitée au simple mode positif. Dans la suite de cette étude, nous porterons notre attention sur le mode négatif. Pour cela, nous étudierons un peptide basique contenant 15 acides aminés et sera noté DF8. La comparaison des motifs de fragmentation dans les deux modes d'ionisation et le contrôle de celles-ci avec la quantité de dopant infusé dans la source d'ions nous permettent de mieux comprendre et maîtriser les phénomènes entrant en jeu.

## II. ETUDE DU PEPTIDE NATIF DANS LES DEUX MODES D'IONISATION

### II.1 Conditions expérimentales

#### *II.1.1 Peptide étudié*

L'objectif de ce travail est d'étudier un peptide en mode d'ionisation négatif. Pour cela, le choix du peptide doit être stratégique car il doit posséder des sites de déprotonation. Le peptide étudié a été synthétisé par *Genepep Prestations* (Montpellier) avec une pureté HPLC de 96 %. Ce peptide est amidé en *C*-terminal et acétylé en *N*-terminal et basé sur la séquence du *Human platelet factor 4* (PF4) correspondant aux résidus 56 à 70 (supposé être le site liant de l'héparine) [Montserret, 2000].

La structure cristallographique de la protéine PF4 est présentée sur la *figure 6*. Le peptide DF8 (à droite de la *figure 6*), aussi appelé peptide « basique », est un peptide modèle possédant une structure hélicoïdale. La séquence de ce peptide justifie la dénomination de ce

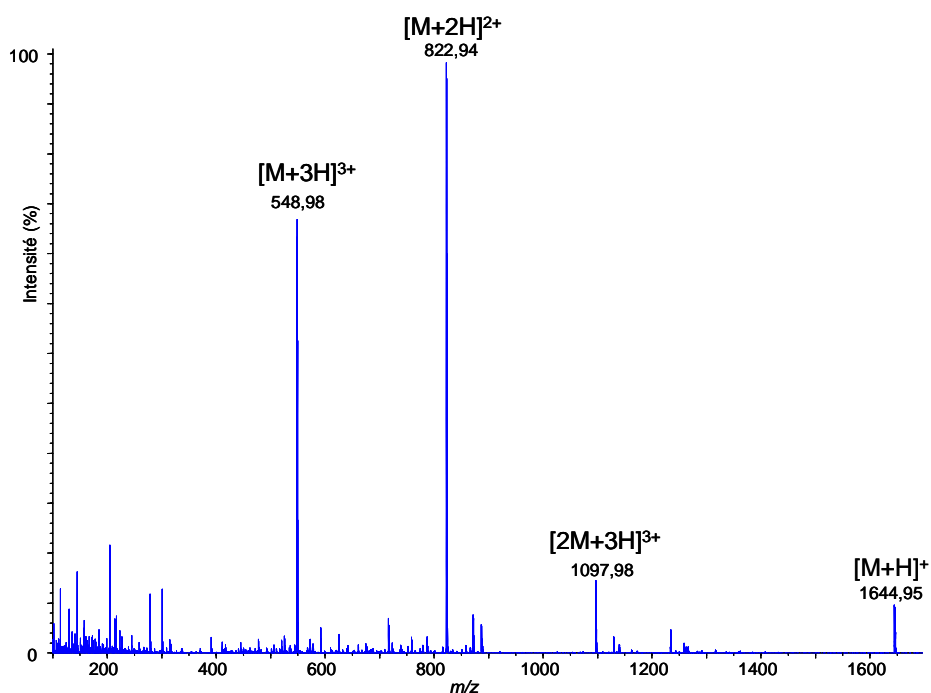
peptide par la présence de quatre résidus basiques: QAPAY**KKAAKK**LAES. La valeur de la masse monoisotopique de ce peptide est de 1643.85 Da. Le pI de ce peptide est de 9.81.



**Figure 6** : Structure cristallographique du monomère la protéine PF4 (gauche), les structures RMN des peptides hélicoïdaux DF8 (droite) homologues à l'hélice  $\alpha$  présente dans la protéine PF4

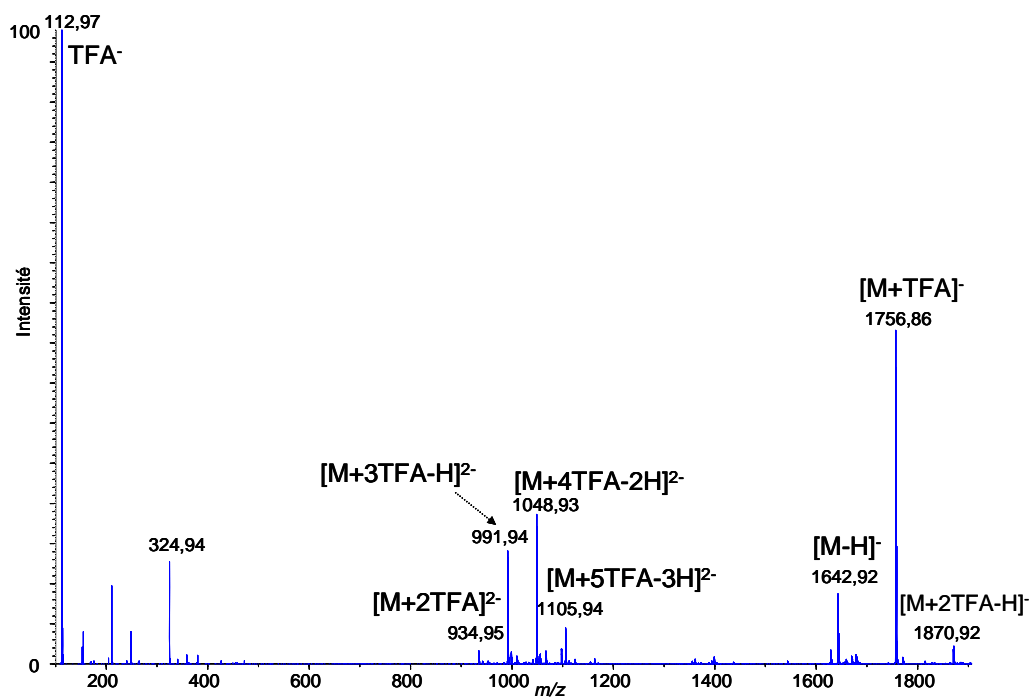
Dès la réception du peptide, nous avons voulu nous assurer de sa pureté en enregistrant un spectre ESI dans les deux modes d'ionisations. Le spectre du peptide enregistré en mode positif (**figure 7**) met en évidence la présence des espèces mono, di- et trichargée du peptide détectées à  $m/z$  1644.9, 822.9 et 548.9 respectivement. Par ailleurs, on voit apparaître un pic correspondant au dimère du peptide qui est observé sous sa forme trichargée à  $m/z$  1097,98. Aucune impureté n'est détectée sur le spectre de masse.





**Figure 7** : Spectre de masse *electrospray* du peptide DF8 enregistré dans l'isopropanol en mode d'ionisation positif

Le spectre de masse *electrospray* enregistré en mode négatif est présenté sur la **figure 8**. On s'aperçoit rapidement que l'espèce déprotonée est minoritaire laissant place à un ensemble de pics correspondant à des adduits de molécules de TFA (acide trifluoroacétique) sur le peptide. On observe jusqu'à quatre adduits de molécules d'acide (à  $m/z$  1048.9 correspondant à l'espèce  $[M+4TFA-2H]^-$ ). Le pic de base du spectre correspond au TFA déprotoné, détecté à  $m/z$  112.9.



**Figure 8** : Spectre de masse *electrospray* du peptide DF8 enregistré dans l’isopropanol en mode d’ionisation négatif

Après avoir contacté la société *Genepep*, l’origine de la présence du TFA est expliquée par la dernière étape de la synthèse peptidique qui est une étape de déprotection nécessitant un lavage au TFA.

A partir de ces observations, il a été nécessaire de purifier ce peptide afin de déloger la totalité du TFA présent qui compliquerait les spectres en mode négatif. Dans ce cadre, notre travail a consisté à mettre au point des conditions de purification du peptide pour déplacer le TFA présent.

Dans un premier temps, nous avons dissout notre peptide dans un milieu alcalin en basifiant le milieu avec de la soude. L’objectif ici est d’obtenir un peptide déprotoné avec libération dans le milieu du sel  $\text{TFA}^-/\text{Na}^+$ . Le mélange contenant le peptide est alors lyophilisé pendant une nuit puis solubilisé dans de l’isopropanol. Malheureusement, le spectre enregistré en *electrospray* en mode négatif présente toujours des adduits TFA.

Par la suite, nous avons essayé de dessaler le peptide en utilisant des billes d’amberlite. Le peptide est lavé par le passage sur des billes d’amberlite puis analysé en *electrospray*. Ce dessalage a une influence sur la qualité du spectre mais aussi sur le type

d'espèces observées. En effet, on observe une dégradation de la qualité du spectre de masse avec une disparition de l'espèce déprotonée.

Devant les problèmes rencontrés dans les différentes stratégies décrites ci-dessus, nous avons remis en question notre approche. C'est pourquoi, en tenant compte de la valeur du pKa du TFA (pKa = 0,3) et du pI du peptide en question (pI = 9,81), nous avons mis au point des conditions de purification par chromatographie en milieu basique assez atypique. Pour ce faire, il est nécessaire de se placer à un pH > pI. Nous avons donc utilisé un tampon phosphate possédant un pKa<sub>3</sub> de 12,3. Il existe très peu de colonne chromatographique stable à ces valeurs de pH. Nous avons donc choisi une colonne de type Gemini C<sub>18</sub> (Phenomenex) qui répond à cette spécificité. Les *tableaux 3 et 4* ci-dessous présentent les conditions chromatographiques utilisées pour cette purification.

**Tableau 3** : Conditions utilisées pour la purification chromatographique du peptide DF8

Chaîne HPLC	Dionex Ultimate 3000
Colonne	Gemini 3 µm C <sub>18</sub>
Dimension	100 x 2 mm
Phase mobile	A = 20 mM tampon phosphate pH 11,8 B = Acétonitrile
Débit	200 µL.min <sup>-1</sup>
Température	25 °C
Détection	UV à 214 et 220 nm
Quantité injectée	20 µL à 6.10 <sup>-4</sup> M

**Tableau 4** : Gradient utilisé pour la purification chromatographique du peptide DF8

Temps (min)	% A
0	95
2	95
20	5
23	5
25	95

Plusieurs purifications ont été effectuées. Les différentes fractions sont récupérées puis évaporées au *SpeedVac* et ensuite solubilisées dans de l'isopropanol. Le spectre est ensuite enregistré en *electrospray* en mode négatif. Ce spectre met en évidence une absence de l'espèce  $[M+TFA]^-$ . Néanmoins, le spectre de masse est très sensible aux sels induisant une perte de sensibilité et de précision de mesure. Pour ce faire, nous avons enregistré un spectre APPI en mode négatif sur ce peptide et on observe une meilleure tolérance aux sels avec un bruit de fond nettement inférieur à celui du spectre *electrospray*. C'est un bon exemple qui démontre que la photoionisation à pression atmosphérique est une technique qui est peu sensible aux sels. Le spectre APPI du peptide "natif" sera présenté par la suite de ce travail.

### II.1.2 Optimisation des paramètres de la source

Les spectres de masse photospray de DF8 ont été obtenus en infusant à  $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  une solution du peptide dans l'isopropanol. Dans ces conditions, il n'est pas nécessaire d'ajouter de dopant, l'isopropanol remplissant lui-même ce rôle. Les paramètres instrumentaux utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le **tableau 5** ci-dessous :

**Tableau 5** : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse du peptide

Quantité injectée :	$5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ d'une solution à $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Solvant LC :	iPrOH à $150 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

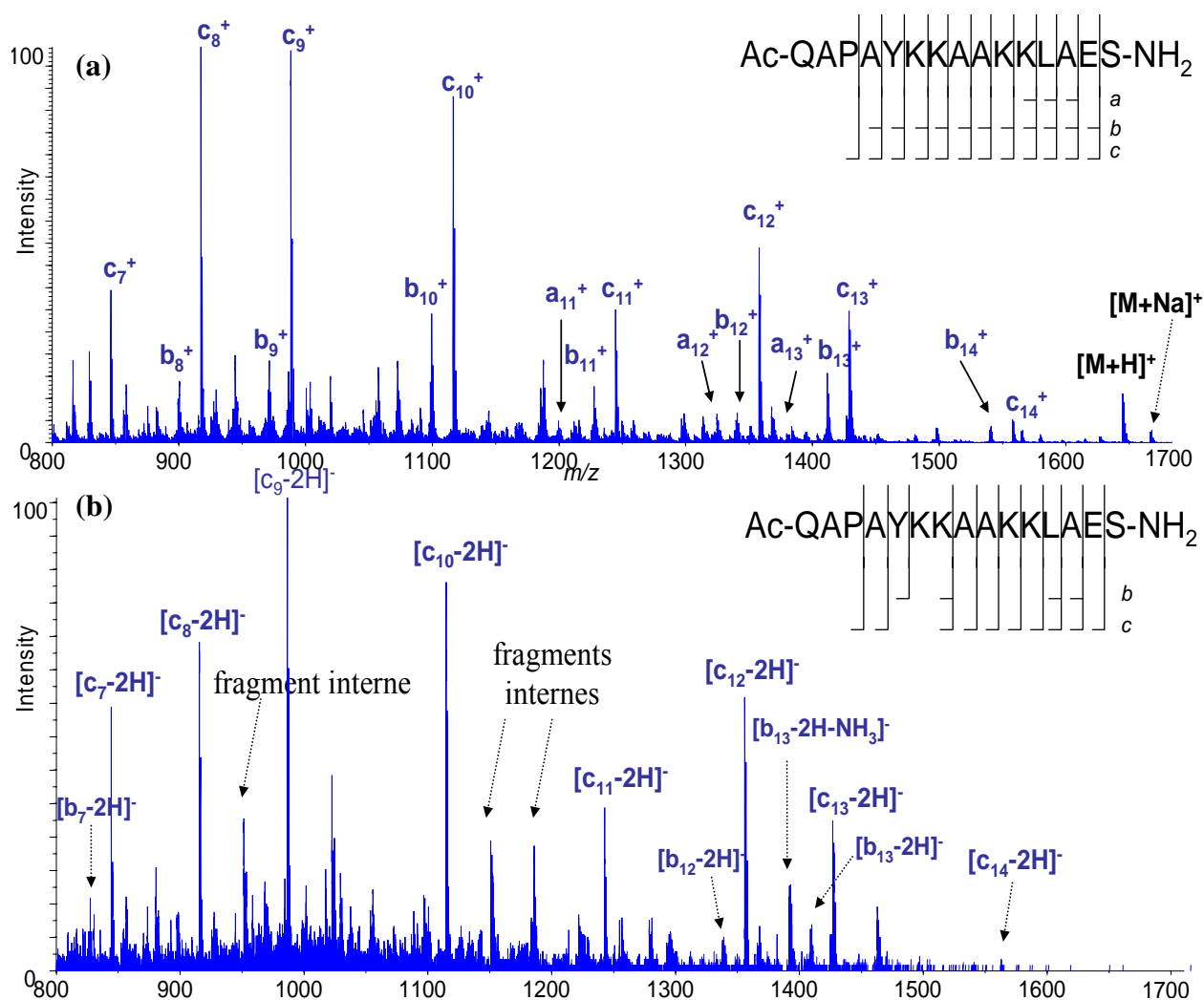
GS1	GS2	CUR	TEMP	CAD	IS	DP	FP	DP2	IE1	MCP
50	20	25	450	3	1200	10	50	15	2	2100

Comme on peut le voir sur ce tableau, les paramètres instrumentaux du spectromètre de masse ont été ajustés de telle façon à obtenir un rapport signal/bruit satisfaisant tout en évitant de faire du CID en source. Nous nous plaçons ainsi dans des conditions d'analyse les moins activantes possible. Lors de cette étude, la calibration est très importante et est effectuée à l'aide de solutions standard de PPG.

*Remarque* : Contrairement aux études précédentes, les gaz de source (GS1 et GS2) utilisés ici sont de l'azote pur provenant d'un générateur avec seulement 40 à 50 ppm d'oxygène.

## II.2 Comparaison du mode positif et mode négatif

On rappelle la séquence du peptide DF8 qui est : Ac-QAPAYKKAACKLAES-NH<sub>2</sub>. Ce peptide basique contient 15 résidus fournissant une masse monoisotopique théorique pour l'espèce [M+H]<sup>+</sup> de 1644.94 et de 1642.93 pour l'espèce [M-H]<sup>-</sup>. Par souci de clarté, seule la région des hautes valeurs de  $m/z$  sera présentée dans la suite de ce travail, sachant que la région des basses masses est très pauvre en fragments de séquence spécifique. Ainsi, la **figure 9** compare les spectres APPI dans la région des  $m/z$  800-1700 enregistrés dans l'isopropanol en mode d'ionisation positif (**figure 9a**) et en mode négatif (**figure 9b**).



**Figure 9** : Spectres APPI du peptide DF8 enregistrés dans l'isopropanol (a) en mode positif  
(b) en mode négatif

L'énergie d'ionisation de l'isopropanol est de 10.17 eV [NIST Webbook]. Le solvant peut donc être ionisé par les photons émis par la lampe à 10.6 eV. Dans ce cas, le solvant agit comme dopant, on parle de “*self doping effect*”. Les **tableaux 6 et 7** résument la totalité des ions de séquence observés dans les deux modes d'ionisation.

**Tableau 6** : Liste des fragments détectés en mode positif

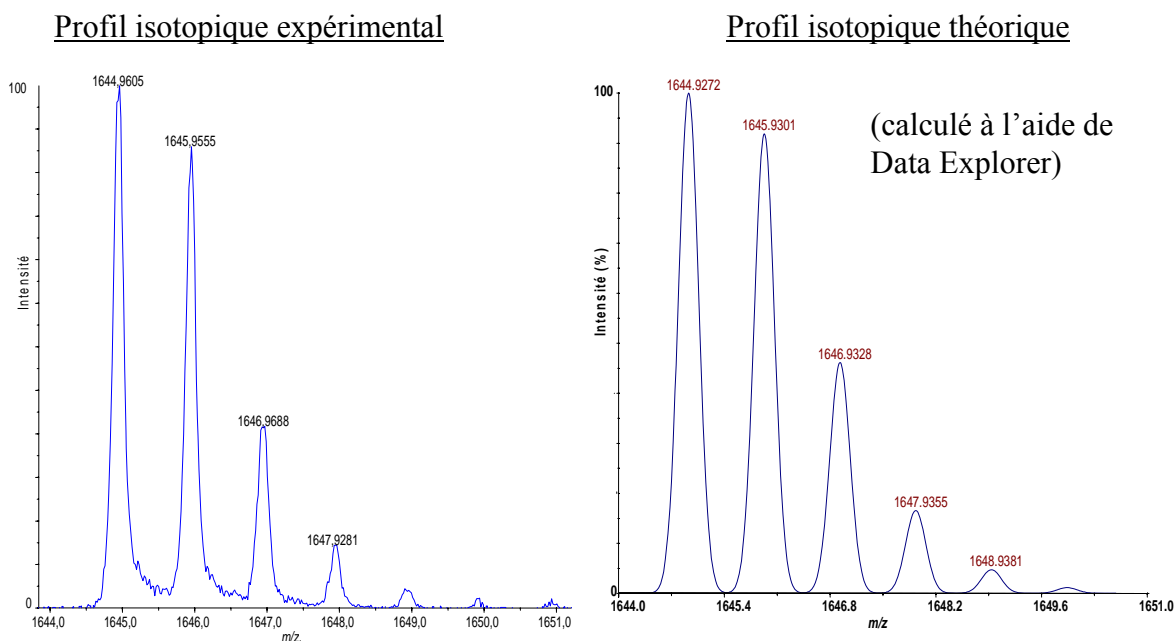
<b>Fragments</b>	<b><i>m/z</i> théorique</b>	<b><i>m/z</i> mesuré</b>	<b><i>Δm/ppm</i></b>
[M+H] <sup>+</sup>	1644.9438	1644.9458	1.2
c <sub>14</sub> <sup>+</sup>	1557.9111	1557.9303	12.0
b <sub>14</sub> <sup>+</sup>	1540.8846	1540.8895	3.2
c <sub>13</sub> <sup>+</sup>	1428.8685	1428.8721	2.5
b <sub>13</sub> <sup>+</sup>	1411.8420	1411.8604	13
a <sub>13</sub> <sup>+</sup>	1383.8471	1383.8335	9.8
c <sub>12</sub> <sup>+</sup>	1357.8314	1357.8405	6.7
b <sub>12</sub> <sup>+</sup>	1340.8049	1340.7928	9.0
a <sub>12</sub> <sup>+</sup>	1312.8100	1312.8052	3.6
c <sub>11</sub> <sup>+</sup>	1244.7474	1244.7587	9.0
b <sub>11</sub> <sup>+</sup>	1227.7208	1227.737	13.1
a <sub>11</sub> <sup>+</sup>	1199.7259	1199.7567	25.6
c <sub>10</sub> <sup>+</sup>	1116.6524	1116.6619	8.5
b <sub>10</sub> <sup>+</sup>	1099.6259	1099.6207	4.7
c <sub>9</sub> <sup>+</sup>	988.5574	988.5500	7.5
b <sub>9</sub> <sup>+</sup>	971.5309	971.5301	0.8
c <sub>8</sub> <sup>+</sup>	917.5203	917.5038	17.9
b <sub>8</sub> <sup>+</sup>	900.4938	900.4880	6.4
c <sub>7</sub> <sup>+</sup>	846.4832	846.4722	12.9
b <sub>7</sub> <sup>+</sup>	829.4567	829.4436	15.7
b <sub>6</sub> <sup>+</sup>	701.3617	701.3878	37.2
b <sub>5</sub> <sup>+</sup>	573.2667	573.2752	14.8
b <sub>4</sub> <sup>+</sup>	410.2034	410.205	3.9

**Tableau 7:** Liste des fragments détectés en mode négatif

Fragments	<i>m/z</i> théorique	<i>m/z</i> mesuré	$\Delta m/ppm$
(c <sub>14</sub> -2H) <sup>-</sup>	1555.8954	1555.9520	36.3
(c <sub>13</sub> -2H) <sup>-</sup>	1426.8529	1426.8880	24.5
(c <sub>12</sub> -2H) <sup>-</sup>	1355.8158	1355.8505	2.5
(c <sub>11</sub> -2H) <sup>-</sup>	1242.7318	1242.7441	9.8
(c <sub>10</sub> -2H) <sup>-</sup>	1114.6367	1114.6266	9.0
(c <sub>9</sub> -2H) <sup>-</sup>	986.5417	986.5049	37.3
(b <sub>9</sub> -2H) <sup>-</sup>	969.5152	969.4213	96
(c <sub>8</sub> -2H) <sup>-</sup>	915.5046	915.4345	76.5
(c <sub>7</sub> -2H) <sup>-</sup>	844.4675	844.5013	40.0

Tout d'abord, des travaux antérieurs ont montré que la dégradation thermique des peptides est dans la plupart des cas extrêmement mineure et ne doit pas être prise en compte pour la compréhension des mécanismes proposés [Debois, 2006]. D'autant plus que les paramètres de la source d'ions et de l'interface ont été choisis de telle façon à éviter de faire du CID en source (**tableau 2**). Par ailleurs, on sait que, lorsque le solvant est ionisé par le rayonnement VUV, le phénomène de photoabsorption directe par l'analyte est négligeable (*cf. chapitre 3*).

Le spectre de masse obtenu en mode d'ionisation positif est représenté à la **figure 9a**. On observe (entre autres) un pic à *m/z* 1644.95 correspondant à l'ion [M+H]<sup>+</sup> (valeur théorique calculée : 1644.94, *cf. tableau 6*). La nature de cette espèce [M+H]<sup>+</sup> est confirmée sans ambiguïté par le profil isotopique du pic (**figure 10**), qui permet d'affirmer par ailleurs qu'on ne forme pas d'espèce M<sup>+</sup> en source (ou tout du moins que si elle est formée, elle fragmente immédiatement et complètement).



**Figure 10** : Comparaison entre les massifs isotopiques expérimentaux et théoriques de l'espèce  $[M+H]^+$  du peptide DF8

Aucune espèce doublement chargée n'est formée. Ce spectre met en évidence, outre la formation de l'espèce protonée, des ions de type *c* très abondants ainsi que certains ions de type *b* (provenant probablement de la perte d'ammoniac sur les ions *c*) et de type *a*. La totalité de ces ions sont répertoriés dans le **tableau 6**.

Lorsqu'on s'intéresse aux ions de basse masse, on obtient un spectre très complexe, difficilement interprétable, contenant notamment des ions *b*, de nombreux fragments internes et des ions immoniums.

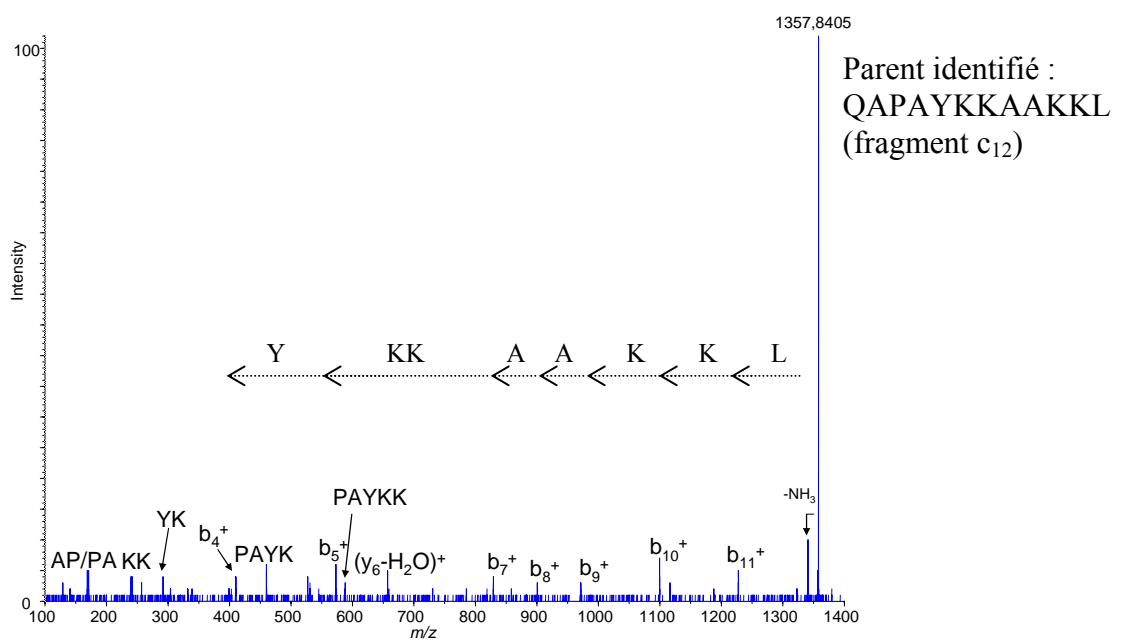
En mode d'ionisation négatif, l'espèce déprotonée  $[M-H]^-$  est très minoritaire voire quasi inexistante sur le spectre de masse. Néanmoins, on peut observer d'abondants ions fragments de type *c* avec une distribution assez similaire au mode positif (**figure 11b**). Certains ions *b* sont aussi détectés sur le spectre de masse.

L'obtention d'ions de type *c* étant peu courante, nous avons voulu nous assurer que nous avions bien affaire à ce type d'ions. Pour cela, nous avons effectué des spectres MS/MS des différents ions observés dans les deux modes d'ionisation.

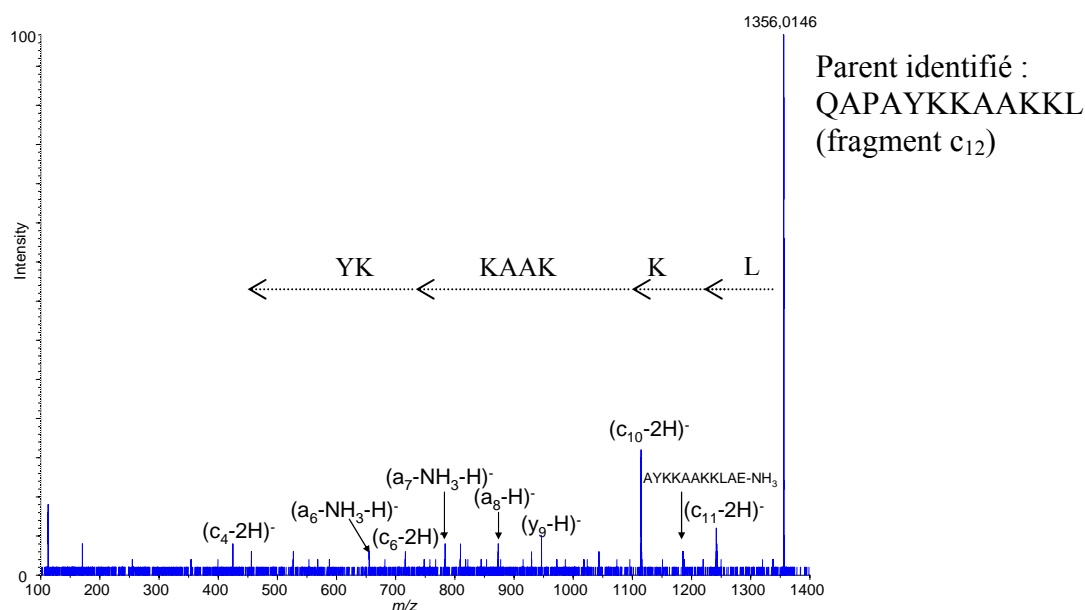


### II.3 Spectres MS/MS de DF8 dans iPrOH

Pour confirmer la nature des ions fragments observés sur les spectres de masse de DF8, nous avons réalisé les spectres MS/MS de plusieurs ions  $c$  dans les deux modes d'ionisation. Nous ne présenterons ici que les spectres des ions  $c_{12}$  en mode positif et négatif (*figures 9 et 10*). Les spectres obtenus mettent en évidence une série complète d'ions fragments de type  $b$  et  $a$  (essentiellement pour le mode négatif), qui permettent d'identifier sans ambiguïté les ions parents comme étant les fragments  $c_{12}$  du peptide DF8.



**Figure 11** : Spectre MS/MS de l'ion  $c_{12}^+$  à  $m/z$  1357.8 obtenue avec une énergie de collision de 60 eV



**Figure 12** : Spectre MS/MS de l'ion (c<sub>12</sub>-2H)<sup>-</sup> à  $m/z$  1356 obtenue avec une énergie de collision de - 60 eV

#### II.4 Spécificité de formation des ions de type *c*

L'obtention d'ions de type *c* est très rare. Peu de publications décrivent les processus de fragmentation menant à ce type d'ions. Parmi celles-ci, on peut noter les premiers travaux de Downard et Biemann [Downard, 1993] et celle de van Dongen *et al.* [van Dongen, 1993]. Ces études ont été menées en FAB sur les instruments magnétiques, sous un régime de collisions de haute énergie, et les deux groupes aboutissent sensiblement au même résultat.

En mode positif, les ions *c* sont formés préférentiellement lorsqu'un acide aminé basique se situe du côté *N*-terminal du site de clivage (de manière à fixer un proton et diriger la fragmentation) et qu'un atome d'hydrogène situé du côté *C*-terminal peut être transféré pour former l'ion *c*. Il se trouve que les ions *c* observés sur les spectres de masse APPI du peptide DF8 correspondent globalement aux résultats décrits par Biemann. Néanmoins, nous nous trouvons ici dans des conditions très différentes de celles utilisées dans les deux publications citées ci-dessus. Si on suppose par contre que l'on a un mécanisme radicalaire du même type que celui proposé pour l'ECD [Tureček, 2003b], on peut expliquer la formation des ions *c* en mode positif.

Par conséquent, comme pour les précédentes études en photoionisation [Debois, 2006], on peut expliquer la formation des ions *c* en mode positif par un phénomène de capture

d'électrons par une espèce polyprotonée qui n'est pas observée sur le spectre de masse car pas assez stable pour être détectée ou bien par un transfert d'hydrogène par un cluster d'isopropanol négativement chargé.

En revanche, la formation d'ions *c* en mode négatif ne peut être expliquée que par un autre mécanisme. En effet, lorsque la lampe UV est éteinte, aucun spectre de masse ne peut être enregistré, contrairement au mode positif.

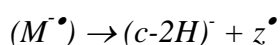
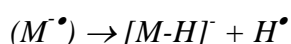
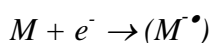
Le transfert d'atome d'hydrogène fait nécessairement intervenir une espèce chargée pour être détectée et doit donc être écarté.

La capture (ou le transfert) d'électron par un précurseur multiprotoné est exclue car elle produit une espèce chargée positivement.

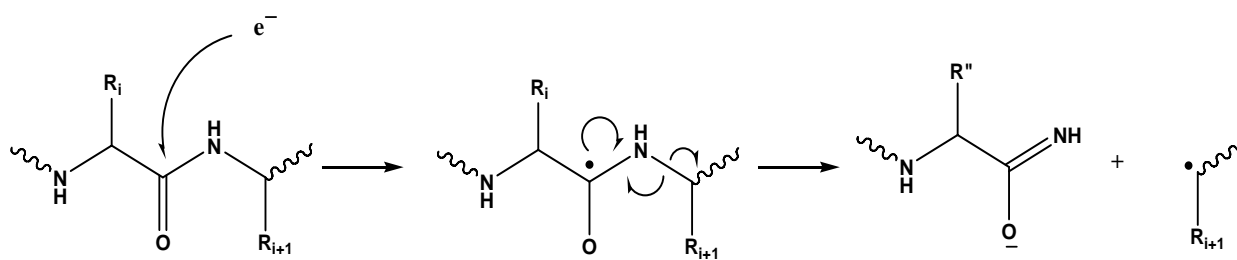
En revanche, un ion précurseur monoprotone pourrait capturer un électron et former un ion fragment neutre. Ce dernier pourrait être déprotoné par une des espèces actives (voir tableau 6 du chapitre 3).

La capture d'électron sur un précurseur déprotoné peut paraître impossible *a priori* pour des raisons de répulsion coulombienne.

Ainsi, il nous apparaît que le précurseur le plus probable pour expliquer la formation des ions *c* en mode négatif est la molécule neutre. Cette réaction donnerait un anion temporaire négatif non détecté, lequel évoluerait selon deux voies : la perte d'un atome d'hydrogène pour donner la molécule déprotonée (de faible abondance) ou bien une fragmentation de la liaison N-C<sub>α</sub> pour former un ion (c-2H)<sup>-</sup> comme expliqué par les équations suivantes :



D'un point de vue mécanistique, la fragmentation en ion *c* peut s'envisager comme suit à la **figure 13**.



**Figure 13** : Mécanisme proposé pour expliquer la formation des ions [c-2H]<sup>-</sup>

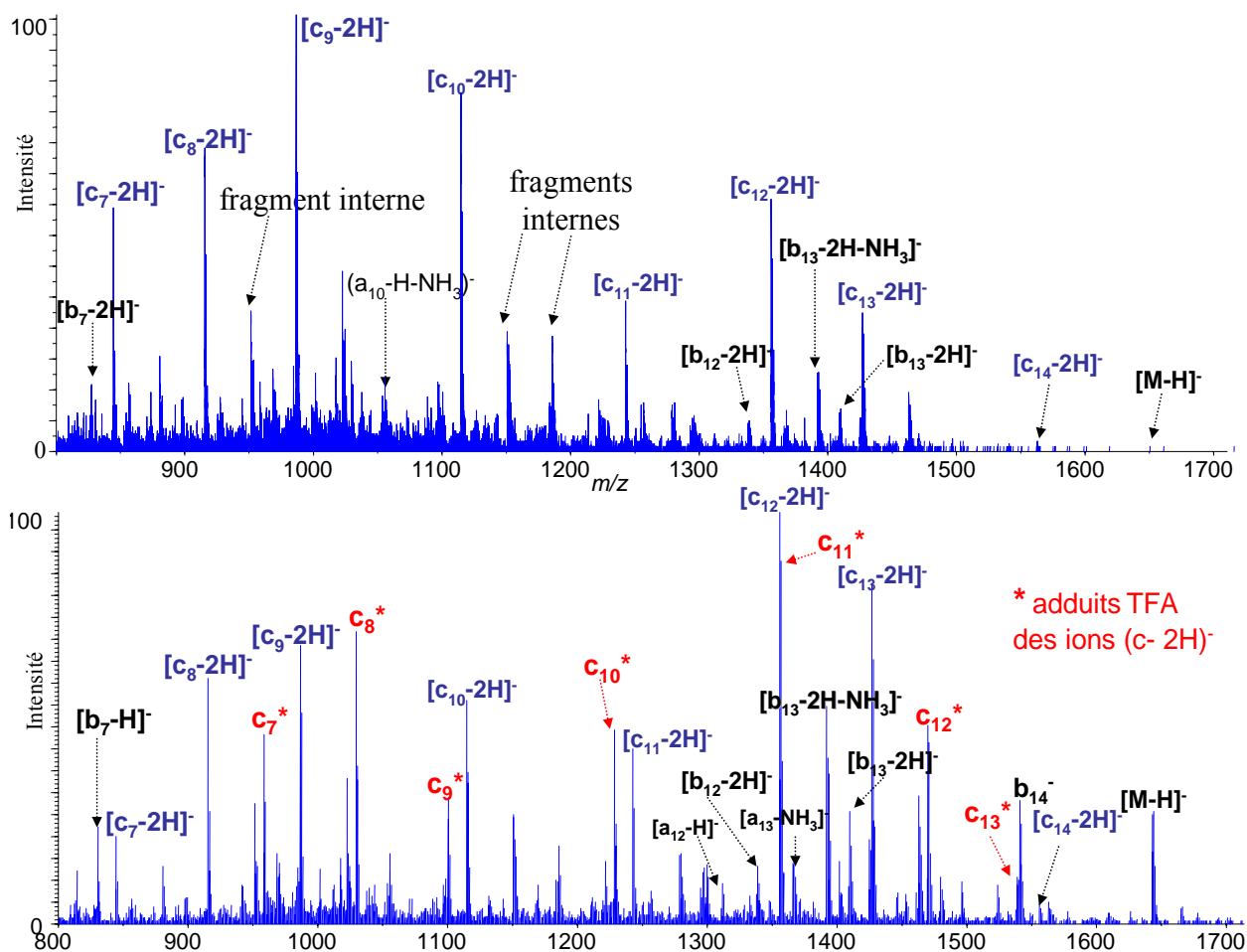
Ce mécanisme est basé sur la capture d'un électron de façon similaire à Tureček *et al.* [Syrstad, 2005] repris à la **figure 5** pour donner la super base amide. Mais contrairement à cette **figure 5**, il n'y a pas abstraction d'un proton d'un centre donneur à proximité mais une dissociation directe avec formation d'un ion  $[c-2H]^-$ .

### III. ETUDE DU PEPTIDE DANS DES CONDITIONS ACIDES

#### III.1 Comparaison avec le peptide natif (*ie* en solution non-acidifiée)

Lorsque la solution du peptide est acidifiée en utilisant de l'acide trifluoroacétique (TFA), les spectres de masse obtenus en mode d'ionisation positif sont identiques à ceux obtenus dans le cas de solution de peptide natif sans ajout d'acide.

En ce qui concerne le mode négatif, des différences importantes sont observées lorsqu'on compare les spectres de masse avec et sans ajout d'acide. La **figure 14** compare les spectres de masse APPI du peptide DF8 enregistrés en mode d'ionisation négatif en absence et en présence d'acide. Lorsqu'on introduit de l'acide, on s'aperçoit immédiatement que la contribution de l'espèce déprotonée  $[M-H]^-$  augmente (**figure 14b**) et est détectée avec un rapport signal/bruit assez satisfaisant et meilleur qu'en absence de TFA. La quasi-totalité des ions  $(c-2H)^-$  est présente sur le spectre de masse enregistré en présence de TFA. Néanmoins, la distribution de ces ions paraît être relativement différente de celle obtenue pour le peptide natif (**figure 14a**). En effet, la distribution semble être plutôt de type bimodale. Le plus surprenant sur ce spectre de masse c'est la formation d'adduits TFA sur les ions *c* uniquement (**figure 14b**). Par ailleurs, on peut détecter quelques ions de type *a* ou *b* assez minoritaires. Le **tableau 8** répertorie la totalité des ions de séquence spécifique détectés en présence de TFA dans le milieu. On note une bonne corrélation entre les masses mesurées et les masses théoriques.



**Figure 14** : Spectres APPI du peptide DF8 enregistrés en mode négatif dans l’isopropanol (a) dans des conditions natives (b) en présence d’acide

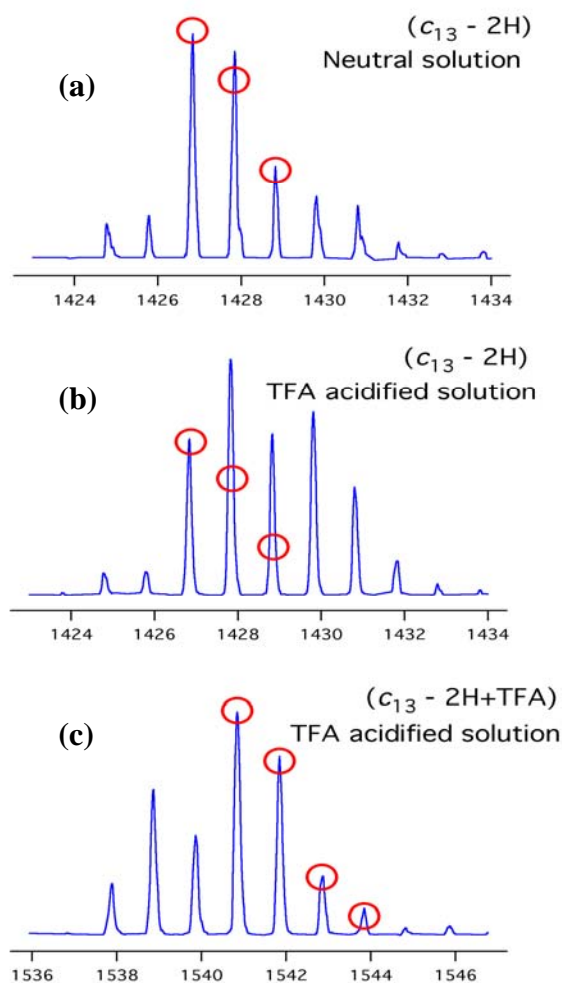
**Tableau 8**: Liste des fragments détectés en mode négatif en présence d’acide dans le milieu

Fragments	$m/z$ théorique	$m/z$ mesuré	$\Delta m/ppm$
$[M+Na-2H]^-$	1664.9101	1664.9003	5.8
$[M-H]^-$	1642.9282	1642.9282	0
$[M-H-H_2O]^-$	1624.9176	1624.9143	2.0
$(c_{14}-2H)^-$	1555.8954	1555.8941	0.8
$b_{14}^-$	1540.8846	1540.8645	13.1
$(c_{13}-2H+TFA)^-$	1540.8457	1540.8645	12.2
$(b_{14}-NH_3)^-$	1523.8580	1523.8131	29.4
$(a_{14}-NH_3)^-$	1495.8631	1495.8503	8.5

$(c_{12}-2H+TFA)^-$	1469.8086	1469.7876	14.2
$(c_{13}-2H)^-$	1426.8529	1426.8420	7.6
$(b_{13}-2H)^-$	1409.8263	1409.8069	13.7
$(c_{12}-2H)^-$	1355.8158	1355.7834	23.8
$(c_{11}-2H)^-$	1242.7318	1242.6934	30.9
$(c_{10}-2H+TFA)^-$	1228.6296	1228.6257	3.2
$(c_{10}-2H)^-$	1114.6367	1114.6394	2.4
$(a_{10}-H)^-$	1070.6230	1070.5889	31.8
$(c_8-2H+TFA)^-$	1029.4975	1029.4148	80.3
$(c_9-2H)^-$	986.5417	986.4559	86.9

### III.2 Etude des massifs isotopiques des ions de séquence *c*

Les divers spectres mesurés à partir de solution de peptide dans le iPrOH acidifié au TFA mettent en évidence des distributions isotopiques anormales de certains ions *c*. En effet, on observe une augmentation de la distribution des ions pour les hautes valeurs de *m/z*. La **figure 15** présente l'exemple de l'ion  $c_{13}$ .

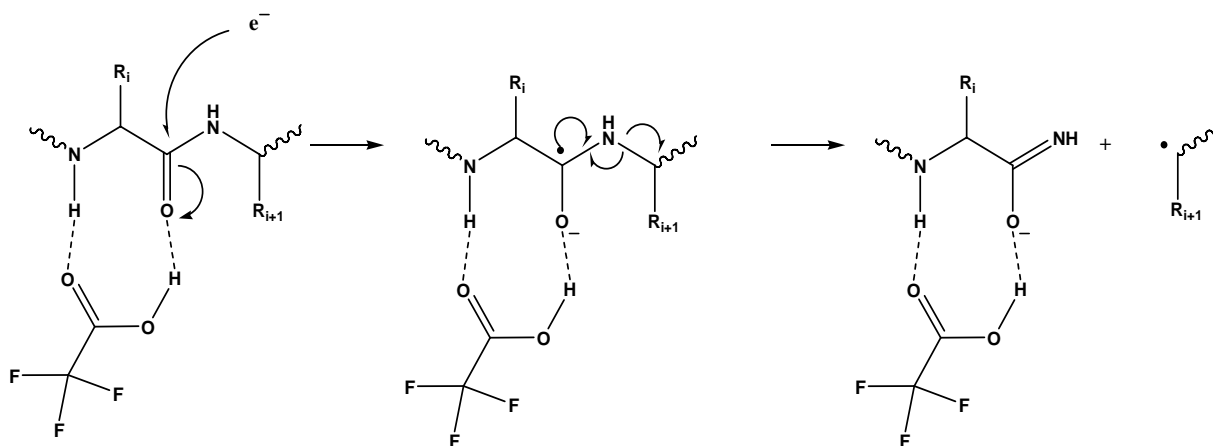


**Figure 15** : Distribution isotopique de l'ion  $(c_{13}-2H)^-$  dans le cas du peptide DF8 (a) en solution non acidifiée (b) en solution acidifiée (c) de l'adduit TFA de l'ion  $c_{13}$ . Les cercles en rouge indiquent la distribution théorique pour ce fragment

Les **figures 15a** et **15b** comparent les distributions isotopiques de l'ion  $(c_{13}-2H)^-$  dans le cas d'une solution avec et sans acide. La contribution isotopique pour la solution de peptide sans acide corrèle parfaitement avec la distribution théorique labellisée par les ronds rouges. La distribution isotopique du même ion mais provenant du peptide en solution contenant du TFA présente une contribution notable à des hautes valeurs de  $m/z$ . Une telle distribution semble indiquer un phénomène de transfert d'atome d'hydrogène.

### III.3 Origine des ions $c$ en présence d'acide

Nous proposons un mécanisme de fragmentation permettant d'expliquer la formation d'adduits TFA sur les ions  $c$  en mode négatif basé sur une capture initiale d'un électron sur le carbonyle du peptide complexé conduisant à la rupture de la liaison N- $C_{\alpha}$  comme indiqué par la **figure 16**.

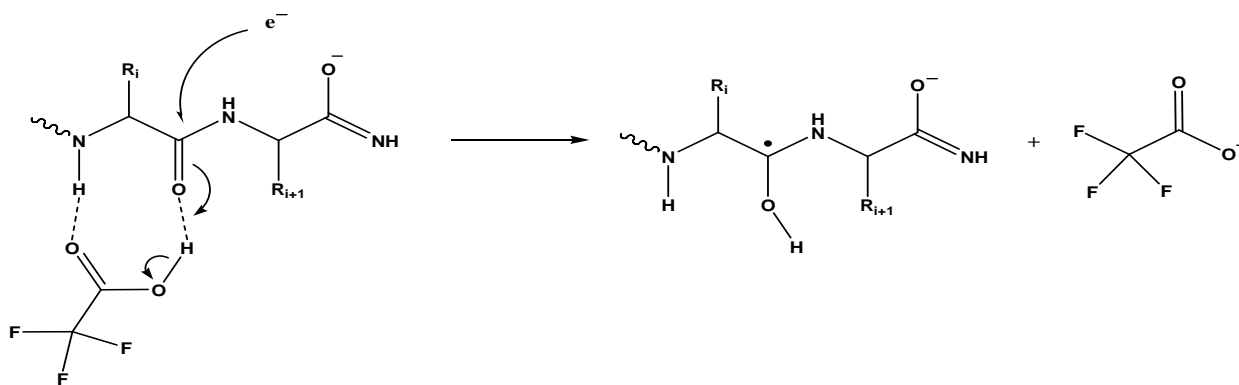


**Figure 16** : Mécanisme proposé pour expliquer la formation des ions  $(c-2H+TFA)^-$

Les massifs isotopiques anormaux observés pour des ions  $c$  formés aux départs d'échantillons en solution acidifiée sont vraisemblablement dues à des réactions de transfert d'hydrogène. Le fait que ces massifs ne soient observés qu'en présence de TFA laisse penser que cette molécule est impliquée dans le processus de fragmentation.

Une interprétation possible pour tenter d'expliquer les distributions isotopiques anormales (**figure 15b**) serait le mécanisme décrit par la **figure 17** ci-dessous. Comme on peut le voir sur ce mécanisme, on observe toujours une capture d'électron sur le carbonyle du peptide mais au lieu de produire une rupture de la liaison N- $C_{\alpha}$ , cette capture mène à un transfert d'atome d'hydrogène à partir du TFA présent dans le milieu.





**Figure 17** : Mécanisme possible à l'origine des massifs isotopiques anormaux observé sur des ions *c* en présence formés à partir du peptide en solution acidifiée par TFA dans le milieu

Il faut noter que ce dernier mécanisme fait intervenir deux captures d'électrons successives. En effet, une première capture fragmente le peptide pour former un ion *c* lié avec une molécule de TFA comme indiqué à la **figure 14**. La seconde capture qui provoque le transfert d'hydrogène de la **figure 15** a lieu sur une espèce déjà chargée négativement.

#### IV. CONCLUSION

La photoionisation à pression atmosphérique a permis d'augmenter les possibilités d'analyse par spectrométrie de masse en mode négatif des peptides. La combinaison des modes d'ionisation positif et négatif permet l'obtention d'informations sur les espèces présentes dans le milieu et leur structure.

D'intenses fragmentations du peptide ont été observées dans les deux modes d'ionisation étudiés. Les distributions de séquence observées pour ce peptide sont quasiment similaires dans les deux modes (légèrement meilleure dans le cas du mode positif). En mode d'ionisation négatif, les fragmentations en source du peptide produisent majoritairement des ions de type *c*, ce qui n'est pas le cas du mode positif pour lequel de nombreux et abondants fragments *b* sont observés (figure 5). D'un point de vue analytique, cette particularité pourrait être avantageuse pour le séquençage de peptides inconnus. La totalité des ions fragments rencontrés correspondent à des fragments attendus classiquement pour les peptides. La présence de fragments peu communs tels que les ions fragments de type *c*, espèces plus

couramment rencontrées en MS/MS de haute énergie ou en ECD, est particulièrement remarquable. L'obtention d'ions de type *c* est donc peu courante. En photoionisation à pression atmosphérique, la formation de ce type d'ions en mode positif a été expliquée par un processus de capture d'électron dissociative (ECD) sur une espèce multichargée. Dans le cas du mode négatif, on détecte toujours ces ions *c* qui sont, d'ailleurs, très abondants sur les spectres de masse. Nos résultats ont permis d'expliquer la formation de ces ions par un processus de capture d'électron mais sur une espèce neutre. Il s'agit là de la première observation d'un tel mécanisme rapporté dans le mode négatif. Ce mode d'ionisation ouvre ainsi de nouvelles voies pour l'identification de peptides.

Dans le cas des résultats obtenus en milieu acide, les phénomènes observés permettent d'étudier l'effet du milieu sur le mécanisme de formation des ions sous irradiation UV. En effet, on a mis en évidence l'implication du TFA dans les mécanismes de formations des ions *c*. Il serait intéressant de comparer ces résultats avec un autre acide organique (par exemple l'acide acétique).

## REFERENCES VIII

### B

[Biemann, 1987] K. Biemann et S.A. Martin, Mass spectrometric determination of the amino acid sequence of peptides and proteins, *Mass Spectrom. Rev.*, 6, 1987, 1-76

[Bowie, 2002] J. H Bowie, C.S. Brinkworth et S. Dua, Collision induced fragmentations of the  $[M-H]^-$  parent anions of underivatized peptides : an aid to structure determination and some unusual negative ion cleavages, *Mass Spectrom. Rev.*, 21, 2002, 87-107

[Berkout, 2006] V.D. Berkout, Fragmentation of protonated peptide ions via interaction with metastable atoms, *Anal. Chem.*, 78, 2006, 3055-3061

### C

[Chamot-Rooke, 2005] J. Chamot-Rooke, G. van der Rest, J.P. Lecaer, S. Bay et J. Lemaire, Characterization of glycosylated and phosphorylated peptides : chemical derivatisation vs electron capture dissociation, *Proceedings of the 53th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Antonio, TX, 2005

[Coon, 2004] J.J. Coon, J.E.P. Syka, J.C. Schwartz, J. Shabanowitz et D.F. Hunt, Anion dependence in the partitioning between proton and electron transfer in ion/ion reactions. *Int. J. Mass Spectrom.*, 236, 2004, 33-42

[Cooper, 2003] H.J. Cooper, R.R. Hudgins, K. Håkansson et A.G. Marshall, Secondary fragmentation of linear peptides in electron capture dissociation, *Int. J. Mass Spectrom.*, 228, 2003, 723-728

[Cooper, 2005] H.J. Cooper, Investigation of the presence of b ions in electron capture dissociation mass spectra, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16, 2005, 1932-1940

## D

[Debois, 2006] D. Debois, A. Giuliani et O. Laprévotte, Fragmentation induced in atmospheric pressure photoionization of peptides, *J. Mass Spectrom.*, 41, 2006, 1554-1560

[Delobel, 2003] A. Delobel, F. Halgand, B. Laffranchisse-Gosse, H. Snijders et O. Laprévotte, Characterization of hydrophobic peptides by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 75, 2003, 5961-5968

[Downard, 1993] K.M. Downard et K. Biemann, Amino acid sequence prerequisites for the formation of  $c_n$  ions, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 4, 1993, 874-881

## E

[Ewing, 2000] N.P. Ewing et C.J. Cassady, Dissociation of multiply charged negative ions for hirudin (54-65), fibrinopeptide B and insulin A (oxidized), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 2000, 105-116

## F

[Fagerquist, 2003] C.K. Fagerquist, R.R. Hudgins, M.R. Emmett, K. Håkansson et A.G. Marshall, An antibiotic linked to peptides and proteins is released by electron capture dissociation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14, 2003, 302-310

## G

[Guan, 2003] Z. Guan, N.A. Yates et R. Bakhtiar, Detection and characterization of methionine oxydation in peptides by collision induced dissociation and electron capture dissociation, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14, 2003, 605-613

## H

[Harrison, 2000] A.G. Harrison, Sequence-specific fragmentation of deprotonated peptides containing H or alkyl side chains, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 2000, 1-13

## $\mathcal{K}$

[Köcher, 2005] T. Köcher, A. Engström et R. A. Zubarev, Fragmentation of peptides in MALDI in-source decay mediated by hydrogen radicals, *Anal. Chem.*, 77, 2005, 172-177

[Kruger, 1999] N.A. Kruger, R.A. Zubarev, B.K. Carpenter, N.L. Kelleher, D.M. Horn et F.W. McLafferty, Electron capture versus energetic dissociation of protein ions, *Int. J. Mass Spectrom.*, 1999, 1, 182-183

## $\mathcal{L}$

[Leymarie, 2003] N. Leymarie, C.E. Costello et P.B. O'Connor, Electron capture dissociation initiates a free radical reaction cascade, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2003, 8949-8958

## $\mathcal{M}$

[McLafferty, 2001] F.W. McLafferty, D.M. Horn, K. Breuker, Y. Ge, M.A. Lewis, B. Cerda, R.A. Zubarev et B.K. Carpenter, Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by Fourier-transform ion cyclotron resonance, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 2001, 245-249

[Misharin, 2005] A.S. Misharin, O.A. Silivra, F. Kjeldsen et R.A. Zubarev, Dissociation of peptide ions by fast atom bombardment in a quadrupole ion trap, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 2005, 2163-2171

[Montserret, 2000] R. Montserret, M.J. McLeish, A. Böckmann, C. Geourjon et F. Penin, Involvement of electrostatic interactions in the mechanism of peptide folding induced by sodium dodecyl sulfate binding, *Biochemistry*, 39, 2000, 8362-8373

## $\mathcal{P}$

[Paizs, 2005] B. Paizs et S. Suhai, Fragmentation pathways of protonated peptides, *Mass Spectrom. Rev.*, 24, 2005, 508-548

[Patriksson, 2006] A. Patriksson, C. Adams, F. Kjeldsen, J. Raber, D. van der Spoel et R.A. Zubarev, Prediction of N-C $\alpha$  bond cleavage frequencies in electron capture dissociation of

Trp-cage dications by force field molecular dynamics simulations, *Int. J. Mass Spectrom.*, 248, 2006, 124-135

[Pitteri, 2005] S.J. Pitteri, P.A. Chrisman et S.A. McLuckey, Electron transfer ion/ion reactions of doubly protonated peptides: effect of elevated bath gas temperature, *Anal. Chem.*, 77, 2005, 5662-5669

## R

[Roepstorff, 1984] P. Roepstorff et J. Fohlman, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *J. Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 1984, 601-

## S

[Syka, 2004] J.E.P. Syka, J.J. Coon, M.J. Schroeder, J. Shabanowitz et D.F. Hunt, Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 2004, 9528-95

[Syrstad, 2001] E.A. Syrstad et F. Tureček, Hydrogen atom adducts to the amide bond. Generation and energetics of the amino(hydroxyl)methyl radical in the gas phase, *J. Phys. Chem. A*, 105, 2001, 11144-11155

[Syrstad, 2003] E.A. Syrstad, D.D. Stephens et F. Tureček, Hydrogen atom adducts to the amide bond. Generation and energetics of amide radicals in the gas phase, *J. Phys. Chem. A*, 107, 2003, 115-126

[Syrstad, 2005] E.A. Syrstad et F. Tureček, Toward a general mechanism of electron capture dissociation, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16, 2005, 208-224

## T

[Takayama, 2001a] M. Takayama, N-C<sub>α</sub> cleavage of the peptide backbone via hydrogen abstraction, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 2001, 1044-1049

[Takayama, 2001b] M. Takayama, In-source decay characteristics of peptides in matrix assisted laser Desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 2001, 420-427

[Tureček, 2003a] F. Tureček, Bond dissociation energies and kinetics in amide and peptide radicals. Is the dissociation a non ergodic process ? *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2003, 5954-5963

[Tureček, 2003b] F. Tureček, et E.A. Syrstad, Mechanism and energetics of intramolecular hydrogen transfer in amide and peptide radicals and cation radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2003, 3353-3369

## V

[van Dongen, 1993] W.D. van Dongen, C.G. de Koster, W. Heerma et J. Haverkamp, Sequence ion studies in peptides : the generation of c'' ions, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 7, 1993, 241-244

## Z

[Zubarev, 1998] R.A Zubarev, N.L. Kelleher et F.W. McLafferty, Electron capture dissociation of multiply charged proteins cations. A nonergodic process, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 1998, 3265-3266

[Zubarev, 1999] R.A Zubarev, N.A Kruger, K.E. Fridriksson, M.A. Lewis, D.M Horn, B.K. Carpenter et F.W. McLafferty, Electron capture dissociation of gaseous multiply charged proteins is favored at disulfide bonds and other sites of high hydrogen atom atom affinity, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1999, 2857-2862

[Zubarev, 2002] R.A Zubarev, K.F. Haselmann, B. Budnik, F. Kjeldsen et F. Jensen, Towards an understanding of the mechanism of electron capture dissociation : a historical prespective and modern ideas, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 8, 2002, 337-349

# *Quatrième partie*

## *Perspectives*



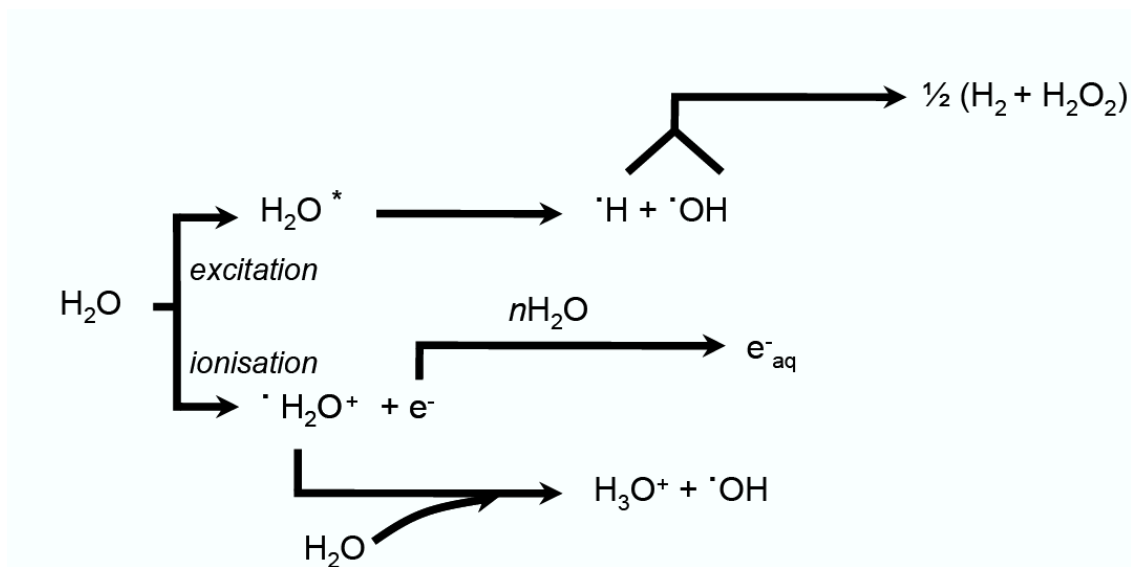
***Chapitre 9 :***  
***Dégâts des radiations ionisantes***

## CHAPITRE 9 : DEGATS DES RADIATIONS IONISANTES

### I. INTRODUCTION GENERALE

#### I.1 Importance des dégâts des radiations sur les systèmes vivants

Les effets biologiques des rayonnements ionisants sur les organismes vivants s'expliquent principalement par l'altération des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) consécutivement au dépôt d'énergie laissé par le passage de la particule primaire (électron primaire, ion) et de son cortège d'électrons secondaires. Les processus d'ionisation et d'excitation de l'ADN et des molécules d'eau liées représentent respectivement les effets directs et quasi-directs de l'action du rayonnement ionisant. Toutefois, 60% des effets moléculaires des radiations ionisantes sur l'ADN de cellule eucaryote ont une origine indirecte qui fait intervenir la radiolyse des molécules d'eau un peu plus distantes [Chapman, 1973 et Roots, 1975]. Il en résulte la production du radical hydroxyle et d'espèces réductrices (électron, atome d'hydrogène) qui sont susceptible de réagir avec les constituants de l'ADN (*figure 1*).



*Figure 1* : Schéma de la radiolyse de l'eau

Ainsi, diverses catégories de modifications de l'ADN sont formées parmi lesquelles on note les cassures simple et double brin d'ADN, les modifications de bases, les sites abasiques

et les pontages ADN-protéines [Goodhead, 1994 et Cadet, 1997]. Il est important de préciser que l'action du rayonnement ionisant ne peut pas se résumer à la seule contribution d'événements radicalaires aléatoires donnant naissance à des modifications isolées. La notion d'événements multiples dont l'importance quantitative augmente avec la valeur du transfert d'énergie linéique (TEL) du rayonnement est à prendre en considération [Goodhead, 1994 et Ward, 1994]. La formation de cassures double brin est l'illustration de la participation de réactions radio-induites qui ont lieu de manière indépendante sur chacun des deux brins d'ADN à une distance inférieure à dix paires de bases. Il est aussi possible d'envisager la formation d'autres types de lésions multiples associant deux ou éventuellement trois dommages (cassures, bases modifiées) sur le même brin ou sur les deux brins opposés [Cadet, 1997]. Les modifications simples des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN constituent des événements radio induits importants quantitativement. On note aussi que les cassures simples sont souvent associées à une modification de base dans un proche environnement.

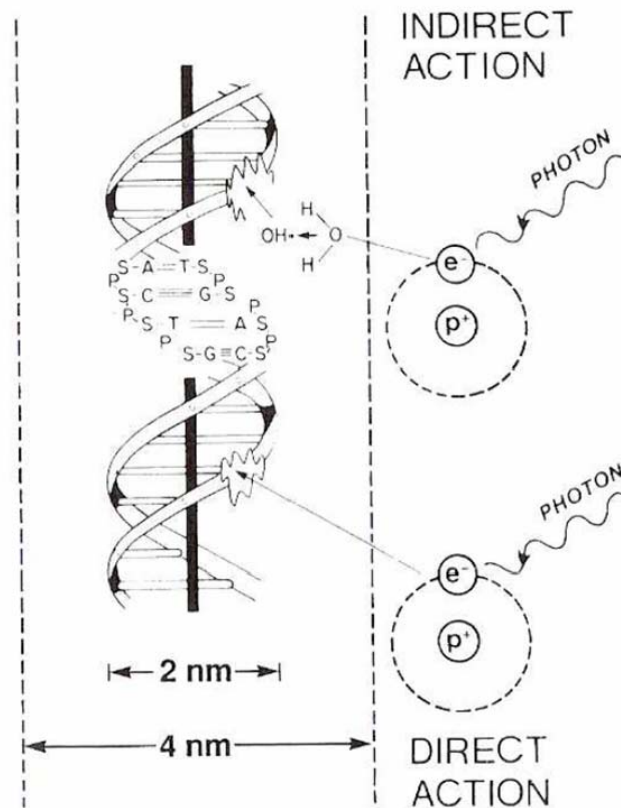
### *1.1.1 Toxicité des radiations ionisantes*

Les acides nucléiques et plus particulièrement l'acide désoxyribonucléique (ADN) est la plus importante cible biologique des radiations ionisantes [Connell, 2004]. En effet, la toxicité des radiations ionisantes dans les systèmes vivants est largement attribuée à la formation de cassures de brins d'ADN. Ces dernières peuvent se révéler être létales, conduisant à une mort cellulaire. Des mutations peuvent aussi avoir lieu, dans lesquelles l'irradiation modifie le contenu génétique de l'ADN. Certaines de ses mutations peuvent aussi conduire à la mort cellulaire mais dans certains cas la forme mutante est viable.

## I.2 Classification des dommages

Les rayonnements ionisants génèrent dans la cellule des dommages, entre autres, dans l'ADN. Les conséquences biologiques après exposition de la cellule à des rayonnements sont principalement dues à ces altérations. L'effet des rayonnements ionisants sur la matière biologique peut être classé en deux catégories principales, résumées à la *figure 2*. On distingue un effet direct qui est la conséquence de l'absorption du rayonnement par les biomolécules elles-mêmes. Cette absorption peut conduire à la formation d'un état excité ou d'un ion avec éjection d'un électron. Si l'énergie déposée dans le système est suffisante, la

molécule excitée ou l'ion peuvent se fragmenter conduisant à une altération de l'information génétique dans le cas de l'ADN.



**Figure 2** : Les différents effets des dégâts des radiations ionisantes : effet indirect ou direct

Mais les cellules sont composées majoritairement d'eau (80%), laquelle peut se trouver associée aux acides nucléiques. Les rayonnements ionisants sont donc majoritairement absorbé par l'eau pour conduire par radiolyse à la formation de nombreuses espèces dont certaines sont extrêmement réactives :  $\text{H}_2\text{O}^+$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{e}^-$ ,  $\text{H}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{H}_2$ . Le radical  $\cdot\text{OH}$  est la principale espèce formée par radiolyse de l'eau et aussi la plus réactive [Cadet, 2002a]. Les modifications chimiques observées sur les acides nucléiques proviennent de réactions avec les radicaux (**figure 2**). Des réactions d'arrachement d'hydrogène par des radicaux sur le ribose conduisent à des ruptures de brins, perte de bases et formation d'une molécule de sucre libre modifiée ou attaché à l'ADN. De plus, les électrons secondaires sont générés de manière abondante par la radiolyse de l'eau [International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report 31 (ICRU, Washington, DC, 1979)]. Au cours de collisions inélastiques successives avec l'environnement, ces électrons deviennent thermalisés et solvatés [Hase, 2000]. Récemment, Boudaiffa *et al.* ont démontré la capacité des électrons à

induire une simple ou double rupture du brin d'ADN replié [Boudaiffa, 2000]. Cette observation a été soutenue récemment par des investigations détaillées sur les interactions basiques entre les électrons de faible énergie avec les bases nucléiques [Abouaf 2005], dérivés de ribose [Sulzer, 2006], oligonucléotides [Zheng, 2006] et l'ADN [Boudaiffa, 2000]. Tous ces résultats suggèrent que les électrons de faible énergie (0-20 eV) induisent de manière efficace la formation de fragments dans l'ADN par un processus résonnant, c'est-à-dire de l'attachement d'électrons dissociatif (DEA).

Les réactions avec ces électrons ont aussi été étudiées sur de l'ADN condensé où les composés constituant cet ADN sont irradiés par un faisceau d'électrons bien défini et monochromatique. D'autres expériences ont été effectuées sur faisceaux croisés pour des molécules isolées en phase gazeuse. La plupart des techniques qui étudient les interactions électrons de faible énergie/molécules utilisent les techniques basées sur la désorption d'électrons stimulés pour les matériaux condensés. Ce qui permet la détection d'anions organiques de petite taille et de radicaux qui désorbent à la surface d'une cible solide après irradiation par les électrons. La limitation majeure des désorptions induites par les électrons est qu'elle ne permet pas la détection de composés non volatils qui restent à la surface de la cible. Par ailleurs, le rôle des espèces réactives générées par le solvant et les molécules de soluté réactives ne peut pas être sondé.

#### I.4 Les objectifs de ce travail

##### *I.4.1 Photoionisation à 10 eV sur un nébulisat et étude de l'effet du milieu sur la dégradation des oligonucléotides*

Les travaux précédents peuvent être rassemblées en trois catégories: les études sur les molécules isolées en phase gazeuses, les études sur des molécules condensées en surface et les études sur les composés en solution aqueuse.

Dans le premier cas, les conséquences de l'interaction entre la molécule cible et la sonde (électrons, photons, ions...) sont obtenues par spectroscopie ou spectrométrie de masse. Dans le cas de systèmes en phase condensés sous vide ou en solution, le faisceau de particule incident peut servir de sonde s'il s'agit de photons ou bien un système spectroscopique annexe permet de suivre les effets de l'irradiation. Dans cette configuration, il n'est pas

toujours possible d'accéder aux détails moléculaires et une analyse *ex situ* avec technique séparative et un couplage éventuel à la spectrométrie de masse est nécessaire [Cadet, 2005 et Zheng, 2006].

Il apparaît que l'APPI présente l'avantage de pouvoir étudier les dégâts directs et indirects directement par spectrométrie de masse en ligne avec possibilité de spectrométrie de masse tandem. En effet, en photoionisation directe, un spray atmosphérique est irradié par des photons d'environ 10 eV. Les ions produits dans le spray à pression atmosphérique sont extraits et analysés par un spectromètre de masse. L'APPI sans dopant sur une solution aqueuse de biomolécule peut donc permettre d'étudier les dégâts directs.

L'introduction d'une petite quantité d'une molécule ionisable à 10 eV et miscible avec de l'eau (l'acétone par exemple) permet de modéliser le cas où le solvant est ionisé. Cette configuration permet d'étudier les effets indirects des radiations ionisantes.

L'APPI devrait donc offrir une approche originale pour l'étude des dégâts des rayonnements ionisants sur les biomolécules.

Le but de cette partie du travail est précisément d'évaluer ces aspects sur un petit oligonucléotides, dTA.

#### *1.4.2 Procédés expérimentaux mis en oeuvre – Etude des Oligonucléotides*

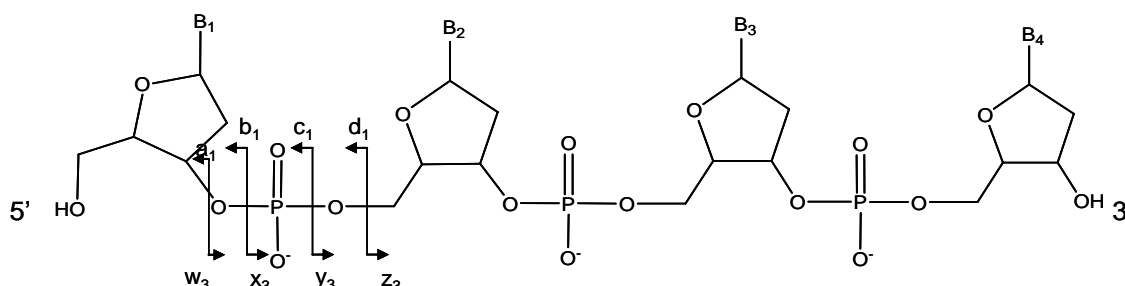
L'acétone et ses analogues deutérés ont été choisis dans ce travail dans la mesure où ce composé est soluble dans n'importe quelle proportion d'eau et dans la mesure où son énergie d'ionisation (9,7 eV) est inférieure à l'énergie des photons [NIST webbook]. Aucune fragmentation de ce composé ne peut avoir lieu puisque l'acétone est ionisée près de son seuil d'ionisation. En effet, des expériences de photoionisation de l'acétone ont reporté que la perte de  $\text{CH}_3$  et la formation de l'ion  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^+$  n'ont lieu qu'à 10,3 eV. Ainsi, la photoionisation à 10 eV d'une petite quantité d'acétone dans l'eau nous permet de sonder l'effet de l'émission de photoélectrons qui possèdent une énergie résiduelle entre 0 et 0,3 eV. La photoabsorption par l'oligonucléotide est négligeable du fait de sa petite quantité comparé à l'acétone (voir partie sur les conditions expérimentales). Ainsi, cette expérience permet l'observation des dommages causés sur les oligonucléotides (dimères et trimères) c'est-à-dire sur des systèmes possédant des caractéristiques permettant un meilleur modèle que les expériences en phase gazeuse précédente. En effet, ce système permet de former un spray sur des molécules plus importantes que celles amenées en phase gazeuse par le chauffage et l'évaporation et il permet en outre de prendre en considération le solvant, l'eau, de ce fait permettant à notre

modèle de mieux mimer la réalité. Les dommages directs sont observés lorsque le spray est irradié par les photons UV sans acétone infusée avec le solvant. La comparaison des spectres de masse obtenus avec ou sans acétone dans le milieu révèle certaines particularités des dégâts primaires et secondaires causés par les électrons. Le rôle du milieu (solvant) est mis en évidence par l'utilisation d'eau deutérée ( $D_2O$ ). L'irradiation du spray et le contrôle des ions sont effectués en mode d'ionisation négative. Lorsqu'un cosolvant est employé (tel que l'acétone), l'absorption par l'analyte lui-même est négligeable.

L'eau utilisée a été bidistillée et filtrée sur des cartouches Millipore (18 M $\Omega$ ). L'acétone utilisée est de qualité HPLC et achetée auprès de Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Les solvants sont introduits dans la source à l'aide d'un pousse seringue model 22 (Harvard Holliston, MA, USA). Les oligodéoxynucléotides étudiés ici sont le dTA et le dTAG qui ont été synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique) avec une pureté de type "Oligold". Nous avons préparé des solutions aqueuses d'oligonucléotides à une concentration de  $10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ . Les échantillons sont infusés à 10  $\mu$ L.min $^{-1}$  dans le flux de solvant. Les paramètres instrumentaux de spectrométrie de masse sont ajustés de façon à obtenir le meilleur rapport signal/bruit et à minimiser de possibles dissociations induites par collision en source (CID).

## II. RESULTATS

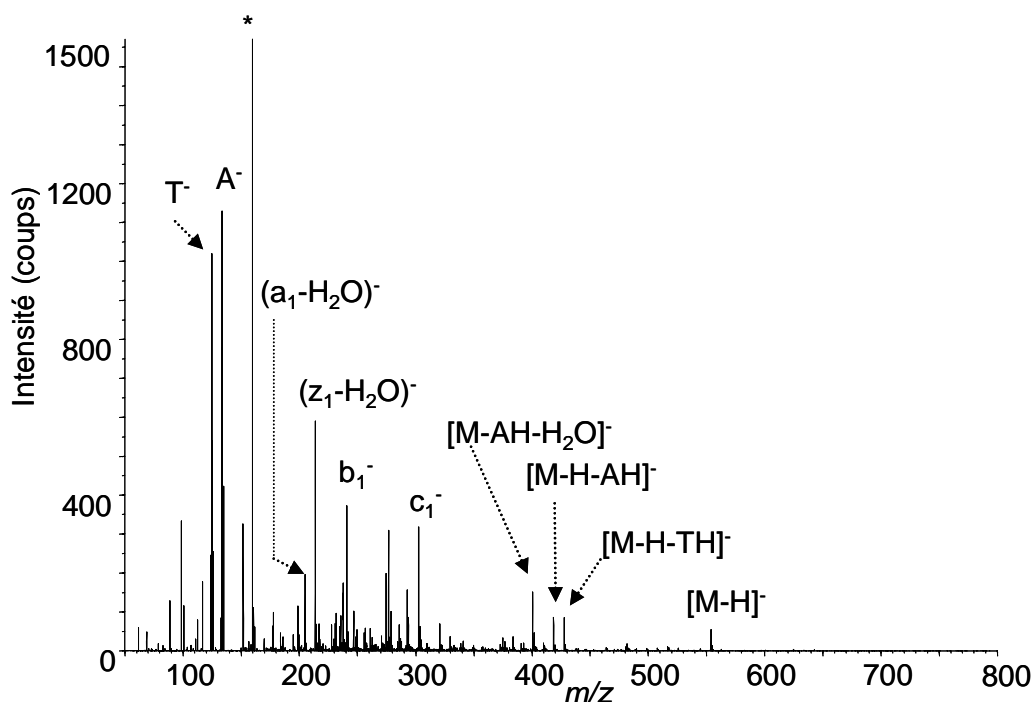
Au cours de ce travail, les ions fragments seront labellisés selon la nomenclature proposée par McLuckey *et al.* et résumée sur la **figure 3** [McLuckey, 1992]. Brièvement, quatre fragmentations du squelette de l'oligonucléotides sont possibles conduisant à des ions a, b, c, d ou w, x, y, z selon que la charge reste du côté 5' ou 3' de la molécule respectivement. Les bases nucléiques seront identifiées comme suit : T pour la thymine, A pour l'adénine et G pour la guanine.



**Figure 3** : Représentation schématique de la nomenclature utilisée pour nommer les ions fragments des oligonucléotides selon [McLuckey, 1992]

## II.1 Photoionisation dans l'eau en présence d'acétone (1 à 4 %)

Le spectre de masse de photoionisation du dinucléotide dTA en présence de 2 % d'acétone est représenté sur la *figure 4*.



**Figure 4** : Spectre de masse APPI du dinucléotide d(TA) enregistré en mode négatif dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétone (98/2, v:v) à 400 °C

D'intenses fragmentations sont observées sur ce spectre. D'une manière générale, les mêmes voies de fragmentation sont observées pour les deux oligodéoxynucléotides étudiés ici. Il est intéressant de noter que les mêmes ions fragments sont détectés indépendamment du pourcentage d'acétone. L'intensité de certains fragments augmente avec ce pourcentage indiquant que l'origine de ces ions doit être reliée à l'ionisation de l'acétone.

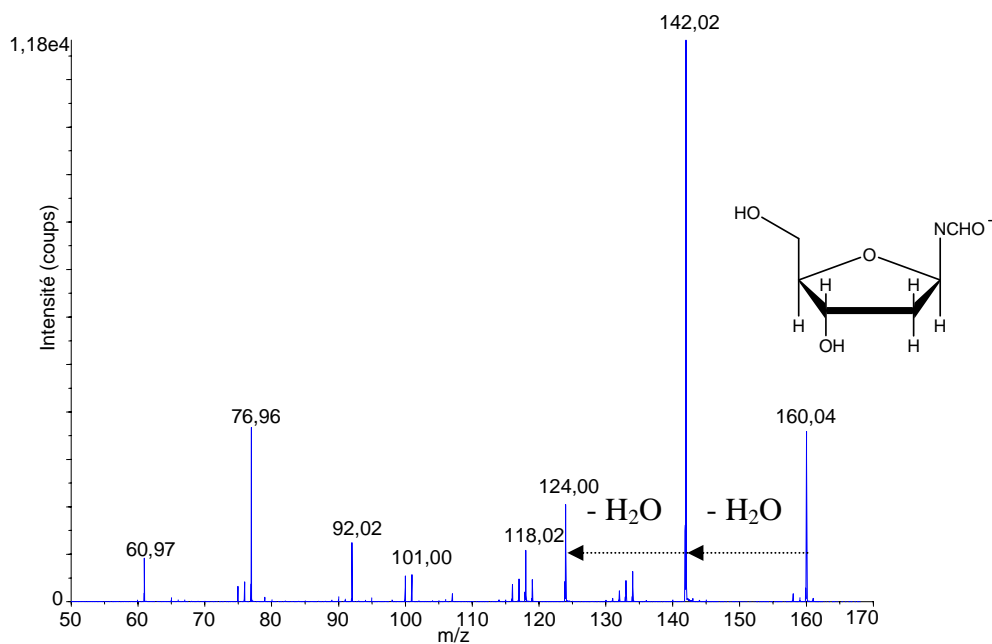
Tout d'abord, l'espèce déprotonée  $[M-H]^-$  est détectée à  $m/z$  554 avec une très faible intensité. Des pertes de base neutre sont détectées à  $m/z$  428  $[M-H-TH]^-$  et  $m/z$  419  $[M-H-AH]^-$  avec une perte d'eau observée à  $m/z$  401 correspondant à l'espèce  $[M-H-AH-H_2O]^-$ .

Par ailleurs, les ions fragments  $(a-H_2O)^-$ ,  $b^-$ ,  $c^-$  et  $d^-$  sont détectés sur le spectre de masse. Concernant les ions z et a, ils sont formés uniquement sous leur forme déshydratée :  $(a_1-H_2O)^-$  et  $(z_1-H_2O)^-$  à  $m/z$  205 et 214 respectivement. Cette observation suggère que la



charge est portée par la base nucléique puisque la structure de ces fragments ne laisse pas apparaître de groupement phosphate. D'une manière générale, on peut remarquer que la totalité des fragments issus du squelette de l'oligonucléotide sont formés par photoionisation à pression atmosphérique.

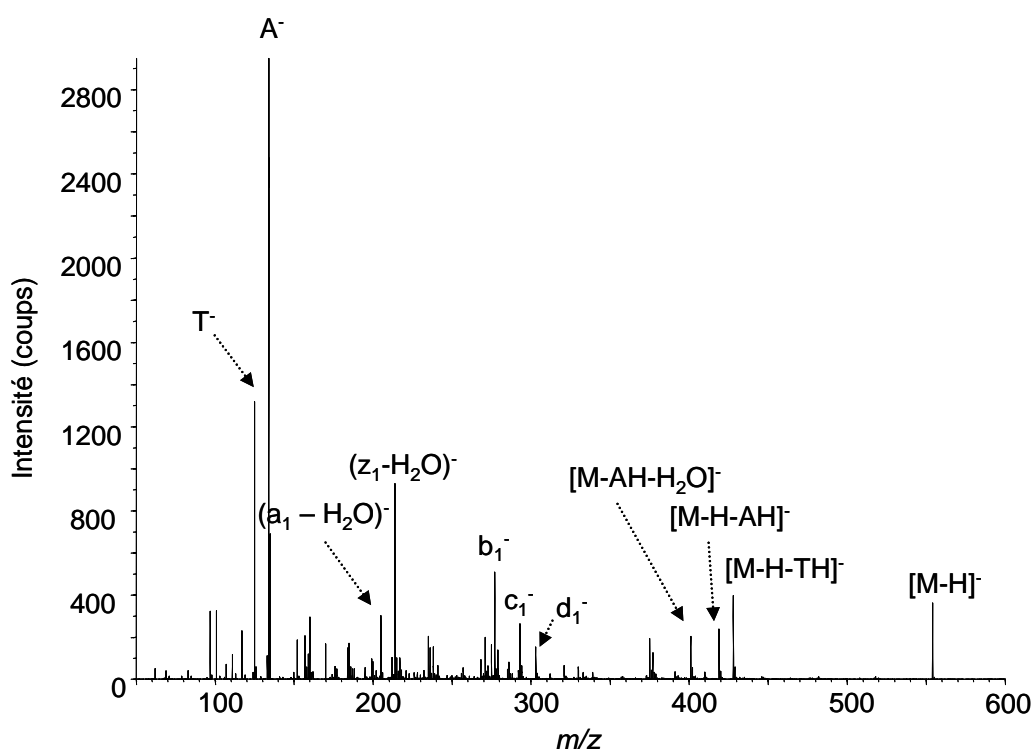
De manière intéressante, le pic de base des deux spectres de masse correspond à un pic à  $m/z$  160 qui n'est pas attribué à un ion fragment de séquence spécifique selon la nomenclature de McLuckey (*figure 3*). Afin d'établir la structure de cet ion, des expériences de MS/MS ont été effectuées sur cet ion précurseur (*figure 5*). Le mécanisme hypothétique de fragmentation de cette espèce permettant d'expliquer la présence de certains des ions observés sur le spectre nous a permis d'établir sa structure, décrite sur l'encart de la *figure 5* qui correspond à un nucléoside modifié. Aucune perte de base n'est observée sur le spectre MS/MS, néanmoins, deux pertes d'eau sont détectées conduisant aux ions à  $m/z$  142 et 124. La présence sur le spectre de masse d'un massif centré à  $m/z$  118 est interprétée comme une perte d'un groupement cétène (42 unités) sur la partie ribose alors que l'ion à  $m/z$  119 provient d'une perte d'un groupe isocyanate de la partie azotée de la molécule. Quand aux ions détectés à  $m/z$  61 et 77, ils sont attribués à des ruptures du ribose. Ces observations nous amènent à suggérer une structure pour cet ion comme un déoxyribose lié avec un groupe NCHO, sans aucune hypothèse sur l'agencement des atomes. Cette structure correspond à une décomposition partielle de la thymine liée sur le sucre.



**Figure 5** : Spectre CID de l'ion précurseur détecté à  $m/z$  160 obtenu avec une énergie de collision de 60 eV

## II.2 Photoionisation dans l'eau en présence d'acétone deutérée (1 à 4 %)

Afin de mieux connaître le système dans lequel on travaille, des expériences ont été effectuées en employant de l'acétone deutérée (acétone  $d_6$ ). En effet, les mécanismes de fragmentation impliquant l'acétone, tels que les réactions de transfert d'atome d'hydrogène, devraient se traduire par un déplacement de certains pics sur les spectres de masse. Comme on peut le voir sur la **figure 6**, le spectre de masse obtenu dans  $H_2O/acetone-d_6$  (96/4, v : v) est identique à celui enregistré avec l'acétone normale, montré en **figure 4**. Ces observations prouvent que l'acétone n'est pas impliquée dans les processus de fragmentation des oligonucléotides.

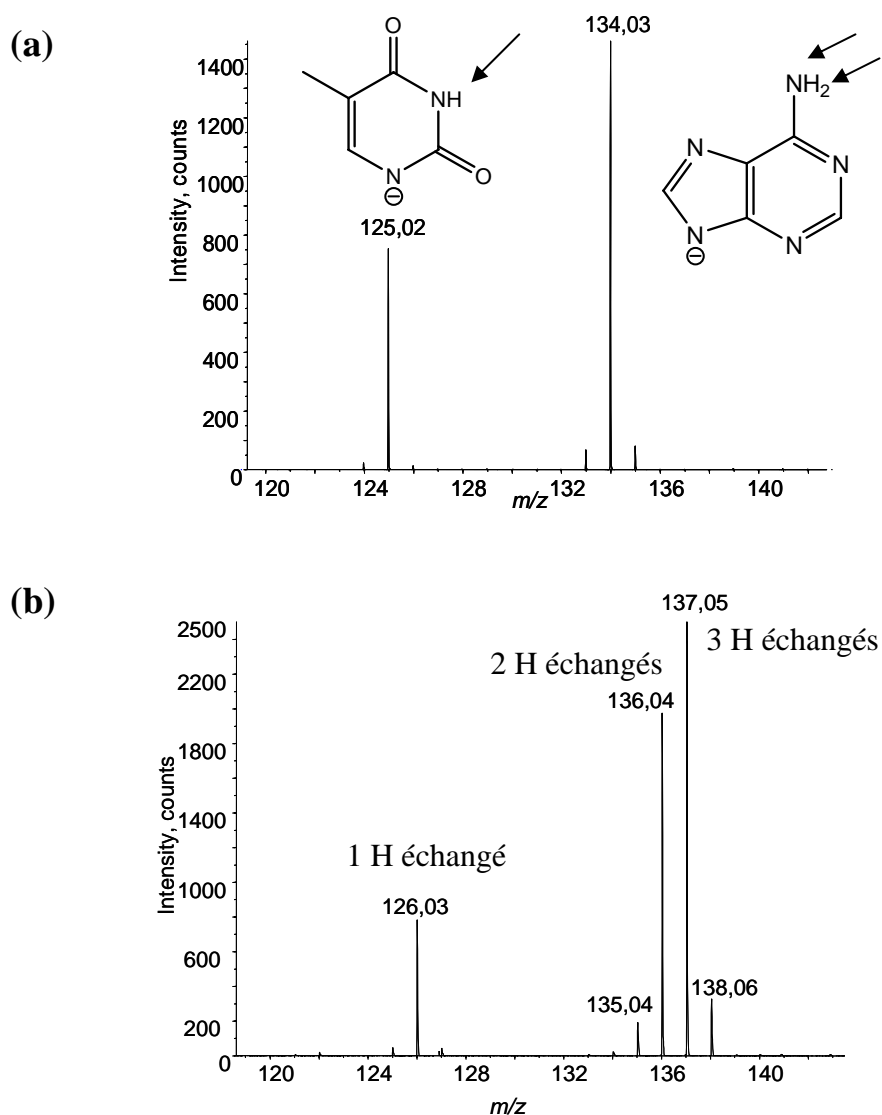


**Figure 6** : Spectre de masse APPI du dinucléotide d(TA) enregistré en mode négatif dans un mélange  $H_2O/acétone\ d_6$  (96/4, v:v) à 400 °C

## II.3 Photoionisation dans $D_2O$ en présence d'acétone

Dans l'eau deutérée, les hydrogènes labiles sont échangeables par le deutérium dans la molécule induisant ainsi un incrément de masse sur l'ion parent et sur les différents ions fragments observés. Un phénomène inattendu est observé dans la région des bases

déprotonées. Un zoom de cette région est présenté sur la **figure 7**. D'après ce spectre, on remarque que la thymine déprotonée, détectée à  $m/z$  125, n'échange qu'un seul atome d'hydrogène et, en effet, on observe bien dans l'eau deutérée (**figure 7b**) un pic à  $m/z$  126 correspondant à cet échange, conformément à ce que l'on peut attendre. Le cas de l'adénine est assez différent. L'ion détecté à  $m/z$  134 dans l'eau (correspondant à l'adénine déprotonée  $A^-$ ) donne lieu à une structure de pic qui s'étend jusqu'à  $m/z$  138 dans l'eau lourde (**figure 7b**), ce qui est en désaccord avec le nombre d'hydrogènes échangeables théoriques qui est de 2 (cf. structure sur la **figure 7b**). Cette incorporation anormale d'atomes de deutérium dans l'adénine suggère un mécanisme radicalaire pour la formation de cet ion fragment conduisant à un réarrangement H/D (encore appelé "*H/D scrambling*").



**Figure 7** : Zoom de la région des bases déprotonées des spectres de masse de d(TA) enregistrés dans (a)  $H_2O$ /acétone et (b)  $D_2O$ /acétone

### III. DISCUSSION

#### III.1 Mécanisme des dommages indirects sur les nucléotides

L'analyse des fragmentations obtenues pour le dinucléotide dTA avec 2% d'acétone met en évidence plusieurs faits expérimentaux:

- des pertes de base éventuellement suivie de déshydratations
- des ruptures de la liaison phosphodiester
- des modifications chimiques sur les bases nucléiques

Il est intéressant de noter que tous ces phénomènes sont connus et répertoriés pour être des conséquences des rayonnements ionisants sur les oligonucléotides. Nous observons donc tous les grands phénomènes connus résultants des dégâts indirects.

Les modifications chimiques observées s'expliquent par l'attaque de radicaux oxydants générés dans l'eau par absorption des photons VUV.

Les pertes des bases nucléiques et les ruptures des liaisons phosphodiester peuvent avoir deux origines :

- l'attaque de radicaux
- la capture d'électrons

La formation de l'ion à  $m/z$  160 est inédite et il pourrait s'agir d'une modification non encore répertoriée. Cet ion correspond à un dommage de la base purique, qui est ici la thymine.

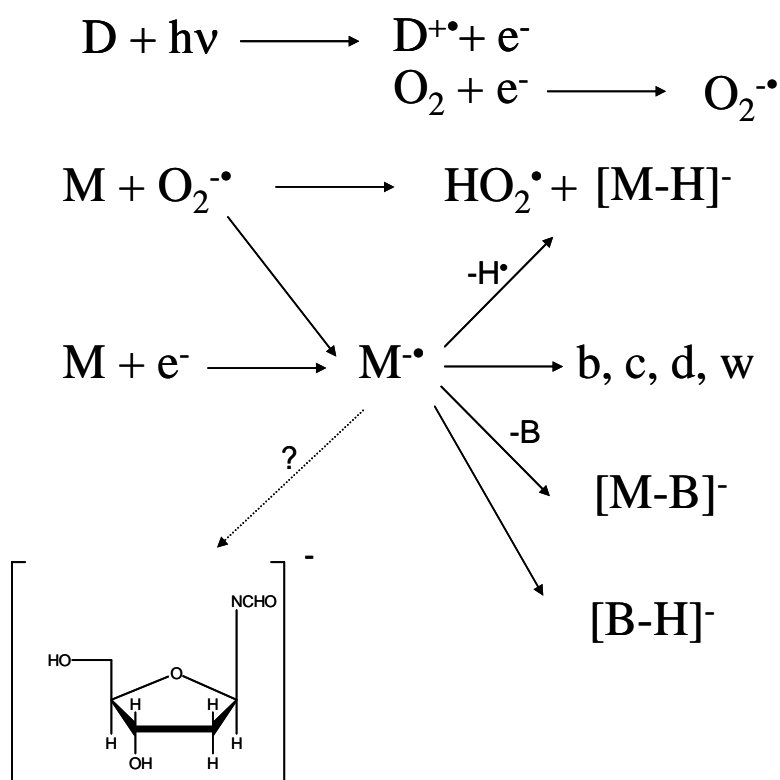
Parmi les altérations que peut subir l'ADN, on peut en distinguer quatre grands types :

- les modifications du déoxyribose
- les modifications des bases nucléiques
- les pontages entre l'ADN et les protéines
- les adduits exocycliques entre les bases de l'ADN et des aldéhydes réactifs

Les travaux sur des composés modèles tels que les nucléosides isolés exposés à des conditions de stress oxydant (rayonnement ionisant par exemple) ont en effet permis d'identifier et de

caractériser environ 70 dommages des bases, diastéréoisomères compris. On peut toutefois noter que seulement 8 de ces bases modifiées ont été correctement détectées dans l'ADN cellulaire [Cadet, 2002b]. Il existe quatre principales lésions de la thymine et ont été reporté par Cadet *et al.* en 1997 [Cadet, 1997]. Parmi ces dommages, on ne retrouve pas la décomposition observée ici (*figure 5*).

L'ensemble de l'étude présentée ici a permis d'identifier et de caractériser une nouvelle lésion radio-induite de l'ADN. Le schéma ci-dessous résume les mécanismes suggérés ici pour la dégradation des oligonucléotides en APPI (*figure 8*).



**Figure 8** : Mécanismes suggérés pour expliquer les fragmentations observées en APPI

L'ensemble de cette étude a permis de montrer que la capture d'électrons est possible en milieu dense et conduit à des fragments spécifiques de la séquence de l'oligonucléotide. Les résultats obtenus sont en accord avec les données de la littérature en phase condensée et gazeuse [Balog, 2004, Sanche, 2002, Ptasinska, 2005 et 2006]. Par ailleurs, on a pu mettre en évidence une nouvelle voie de dégradation de la thymidine révélant ainsi l'importance du milieu (solvant) sur l'effet des dégâts des radiations ionisantes.

### III.2 Et les dommages sur les protéines ?

Les acides aminés et les protéines peuvent également être des cibles des rayonnements ionisants. Les chaînes latérales de tous les acides aminés peuvent être endommagées, toutefois les produits d'oxydation ne sont que partiellement identifiés. Les chaînes latérales des acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), des acides aminés basiques (lysine, arginine) et des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) sont les plus sujettes à l'oxydation [Delattre, 2005]. Des réactions d'oxydation peuvent également toucher la chaîne polypeptidique conduisant à la formation de radicaux centrés sur le carbone en  $\alpha$  de la liaison peptidique. Ce radical est formé par l'arrachement de l'atome d'hydrogène sur ce carbone via l'action des radicaux  $\cdot\text{OH}$ . Deux radicaux ainsi formés peuvent réagir entre eux, générant des liaisons intra ou inter chaînes. Un radical centré sur le carbone peut également réagir avec une molécule d' $\text{O}_2$ , ce qui conduit à la formation d'un radical peroxy. A partir de ce radical, une série de réactions complexes aboutit à la fragmentation de la chaîne polypeptidique [Stadtman, 1993].

Les résultats obtenus sur les peptides (chapitre 8) ont permis de mettre en évidence certains phénomènes inattendus tels que des captures d'électron sur une molécule neutre ou encore des transferts d'hydrogène ayant lieu à partir de molécules d'acide présentes dans le milieu. Les fragments générés sont issus de la rupture de la liaison N- $\text{C}_\alpha$  correspondant à un dégât lié au rayonnement UV émis par la lampe de photoionisation.

## REFERENCES IX

### *A*

[Abouaf, 2005] R. Abouaf et H. Dunet, Structures in dissociative electron attachment cross-sections in thymine, uracil and halouracils, *Eur. Phys. J. D*, 35, 2005, 405-410

### *B*

[Balog, 2004] R. Balog, J. Langer, S. Gohlke, M. Stano, H. Abdoul-Carime et E. Illenberger, Low energy electron driven reactions in free and bound molecules: from unimolecular processes in the gas phase to complex reactions in a condensed environment, *Int. J. Mass Spectrom.*, 233, 2004, 267-291

[Beach, 1994] C. Beach, A.F. Fuciarelli et J.D. Zimbrick, *Radiat. Res.*, 137, 1994, 385-393

[Boudaiffa, 2000] B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M.A. Huels et L. Sanche, *Science*, 287, 2000, 1658-16

### *C*

[Cadet, 1997] J. Cadet, M. Berger, T. Douki et J-L Ravanat, Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 131, 1997, 1-87

[Cadet, 2002a] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J.L. Ravanat et S. Sauvaigo, Les lésions radio-induites de l'ADN, *Médecine nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 26, 2002, 119-125

[Cadet, 2002b] J. Cadet, T. Douki, S. Sauvaigo, J.P. Pougeot et J.L. Ravanat, Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement, *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 2002, 441-4449

[Cadet, 2005] J. Cadet, E. Sage et T. Douki, Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA, *Mutat. Res.*, 571, 2005, 3-17

[Chapman, 1973] J.D. Chapman, A.P. Reuvers, J. Borsa et C.L. Greenstock, Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro, *Radiat. Res.*, 56, 1973, 291-306

[Connell, 2004] P. Connell, S. Kron et R. Weichselbaum, *DAN Repair*, 3, 2004, 1245-1251

### *D*

[Delattre, 2005] J. Delattre, P. Théron et D. Bonnefont-Rousselot, Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In J. Delattre, J.L. Beaudeau, D. Bonnefont-Rousselot, *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*, 281-351, Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris, 2005

### *G*

[Goodhead, 1994] D.T. Goodhead, Initial events in the cellular effects of ionizing radiation: clustered damage in DNA, *Int. J. Radiat. Biol.*, 65, 1994, 7-17

### *H*

[Hase, 2000] H. Hase, in "The role of radiation in the evolution of life" p. 3-8, Kyoto University Press, 2000

### *M*

[McLuckey, 1992] S.A. McLuckey, G.J. Van Berkel et G.L. Glish, Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 3, 1992, 60-70

### *P*

[Ptasinska, 2005] S. Ptasinska, S. Denifl, P. Scheier, E. Illenberger et T.D. Märk, Bond and site selective loss of H atoms from nucleobases by very low energy electrons (< 3 eV), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 2005, 6941-6943



[Ptasinska, 2006] S. Ptasinska, S. Denifl, S. Gohlke, P. Scheier, E. Illenberger et T.D. Märk, Decomposition of thymidine by low energy electrons: implications for the molecular mechanisms for single strand breaks in DNA, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 2006, 1893-1896

## R

[Roots, 1975] R. Roots et S. Okada, Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells, *Radiat. Res*, 64, 1975, 306-320

## S

[Sanche, 2002] L. Sanche, Nanoscopic aspects of radiobiological damage: fragmentation induced by secondary low-energy electrons, *Mass Spectrom. Rev.*, 21, 2002, 349-369

[Stadtman, 1993] E.R. Stadtman, Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 1993, 797-821

[Sulzer, 2006] P. Sulzer, S. Ptasinska, F. Zappa, B. Mielewska, A.R. Milosavljevic, P. Scheier, T.D. Märk, I. Bald, S. Gohlke, M. A. Huels et E. Illenberger, Dissociative electron attachment to furan, tetrahydrofuran, and fructose, *J. Chem. Phys.*, 125, 2006, 044304-044306

## W

[Ward, 1994] J.F. Ward, The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences, *Int. J. Radiat. Biol.*, 665, 1994, 427-432

## Z

[Zheng, 2006] Y. Zheng, J.R. Wagner et L. Sanche, DNA damage induced by low energy electrons: electron transfer and diffraction, *Phys. Rev. Lett.*, 96, 2006, 208101-208104

## *Conclusions générales*

## Conclusions Générales

L'objectif de ce travail était de lancer un nouveau programme de recherche concernant l'étude des interactions entre les radiations ultraviolettes et des nébulisats contenant des molécules organiques et biologiques.

Les travaux effectués pendant cette thèse ont permis de contribuer au développement d'une nouvelle approche pour l'étude de biomolécules par spectrométrie de masse qui est la photoionisation à pression atmosphérique. En effet, l'APPI s'est avérée être un outil puissant pour caractériser et identifier des molécules d'intérêt biologique important. La principale force de cette technique réside dans la possibilité de travailler dans des conditions qui seraient inadaptées par les autres techniques classiques d'ionisation.

Les résultats obtenus dans le cadre du premier axe de recherche de ce travail de thèse, à savoir augmenter le domaine d'application de cette technique, offrent de nouvelles solutions pour mieux comprendre le comportement de molécules biologiques sous irradiation UV et à pression atmosphérique. En effet, nous avons pu démontrer que la photoionisation à pression atmosphérique pouvait s'étendre à d'autres classes de composés que ceux initialement pressentis et plus particulièrement à des biomolécules polaires et de haut poids moléculaire tels que les peptides, les sucres, etc. En effet, on a pu voir que ces composés se prêtaient très bien à la photoionisation. Par contre, la photoionisation montre ses limites lorsqu'on s'intéresse à des molécules très polaires et de très haut poids moléculaire. Ceci est démontré à travers les résultats sur les oligonucléotides où on a pu observer une absence de l'espèce moléculaire sur les spectres de masse.

La compréhension des mécanismes d'ionisation induits par l'absorption de lumière à pression atmosphérique a représenté une autre problématique importante de ce travail de thèse. Nous nous sommes attachés à l'étude des mécanismes de formation des ions ainsi qu'à l'élucidation des voies de fragmentation. En effet, ces dernières se révèlent souvent intensives et particulières. Dans ce cadre, il nous a paru important de pouvoir expliquer et contrôler les processus de fragmentation sous photoionisation à pression atmosphérique. Certains de ces ions fragments correspondent à des processus radicalaires. Le rôle des électrons et des atomes d'hydrogène formés lors de ce processus a été mis en évidence, notamment par l'étude du

comportement des peptides et des dinucléotides étudiés en eau lourde. Ces travaux ont permis de mettre à jour une nouvelle chimie portant aussi bien sur des sucres, des nucléotides, que des peptides et autres classes de composés en disséquant les rôles respectifs des structures moléculaires, des photons ultraviolets et du solvant (eau ou organiques). Nous avons observé des ions fragments radicalaires d'un type nouveau, jamais observé auparavant avec les sources d'ions connues (impact électronique, électronebulisation, MALDI...) ni en spectrométrie de masse tandem.

Les réactions mises en évidence lors de l'analyse des interactions entre rayonnement UV, solvant et molécules biologiques sont très originales et ont nécessité un travail complexe de décryptage.

L'originalité et le caractère résolument novateur de cette expérience nous ont amené à transférer cette expérience sur une ligne de lumière du Synchrotron SOLEIL. Le couplage entre le spectromètre de masse et la ligne de lumière DISCO de l'installation de rayonnement synchrotron SOLEIL implique notamment l'insertion d'un étage de pompage différentiel pour passer de la pression atmosphérique de la source jusqu'à l'ultra-haut vide de la ligne. Ce couplage n'est pas trivial et implique une étroite collaboration avec "l'équipe du vide" de SOLEIL. Le montage expérimental qui est envisagé ici est tout à fait original et sans équivalent. L'accordabilité du rayonnement VUV délivré par la ligne de lumière DISCO ainsi que les haut flux de photons vont très certainement permettre de lever certains doutes concernant les mécanismes de la photoionisation à pression atmosphérique et ainsi de faire progresser la technique.

Enfin, l'utilisation d'une source de lumière accordable en APPI va certainement renforcer la versatilité de cette source d'ion. Nous avons pu démontrer la validité de l'originalité de l'étude des dégâts des radiations ionisantes en APPI. D'autres applications et utilisation de l'APPI hors de sa niche en chimie analytique sont anticipées.

# ***FIGURES***

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1 : Quelques notions fondamentales

Figure 1a : Les différentes interactions lumière/matière possibles

Figure 1b : Phénomène de photoabsorption dans le volume  $A.dx$

Figure 2 : Théorème de Koopman

Figure 3 : Courbes de potentiel du niveau fondamental et d'un niveau  $i^{\text{ème}}$  excité de la molécule et de l'espèce ionique

Figure 4 : Sections efficaces absolues (a) de photoabsorption du toluène et (b) de photoionisation du toluène

Figure 5 : Diagramme de Jablonski. Les flèches bleues, rouges et vertes indiquent une émission ou une absorption du rayonnement avec A : Absorption, F : Fluorescence, P : Phosphorescence, ISC : Croisement intersystème et IC : conversion interne

Figure 6 : Courbes  $\log k(E) = f(E_{\text{int}})$  dans le cas d'une dissociation compétitive faisant intervenir un mécanisme de fragmentation par rupture simple RS et un mécanisme de fragmentation par réarrangement RR à partir de l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  du butylbenzène obtenu par impact électronique couplé à un triple quadripôle

Figure 7 : Distribution d'énergie interne théorique des ions moléculaires produits sous IE (70 eV) selon [Vékey, 1996]

Figure 8 : Chemin réactionnel d'une réaction de fragmentation

Figure 9 : Diagramme de Wahrhaftig d'après [Baer, 1997]

Figure 10 : Spectre en impact électronique à 70eV (a) et 12eV (b) d'un éther à  $m/z$  354 ( $M^{+\bullet}$ ) d'après [Vékey 1996]

Figure 11 : Réaction de fragmentation des sels de benzylpyridinium

Figure 12 : Calcul de l'énergie interne des ions par la méthode du « taux de survivant ». Les valeurs de SY sont reportées sur un graphique en fonction des énergies  $E_0$  (a) et la dérivée de la sigmoïde correspond directement à la distribution en énergie interne  $P(E)$  des ions formés en source (b). D'après [Gabelica 2005]

Figure 13 : Distribution en énergie interne du sel de p-méthylbenzylpyridinium en électrospray (cône à 30V) obtenu par la méthode du « taux de survivant » (ligne pleine) et par la méthode de la température caractéristique (ligne en pointillée,  $T_{char} = 947$  K), d'après [Drahos 1999]

Figure 14 : Distributions d'énergie interne hypothétique de l'état stable des ions parents soumis aux collisions par processus d'activation «slow heating» dans les deux cas limites (a) «rapid exchange» et (b) «slow energy exchange»

## **CHAPITRE 2 : Spectrométrie de masse**

Figure 1 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse

Figure 2 : Schéma de principe du spectromètre de masse Qstar pulsar  $i$

Figure 3 : Schémas du détecteur à double MCP en chevron avec anode séparée en 4 quadrants

Figure 4 : Schéma d'un analyseur quadripolaire

Figure 5 : Zone de stabilité d'un ion de masse  $m$  donnée selon  $x$  ou  $y$  (en haut) et selon  $x$  et  $y$  (en bas).

Figure 6 : Zone de stabilité représentée dans un diagramme (U, V) pour des valeurs de masse croissante ( $m_1 < m_2 < m_3$ ). La droite correspond à un balayage linéaire de U en fonction de V

Figure 7 : Schéma illustrant le principe du miroir électrostatique.

Figure 8 : Schéma de principe d'un analyseur temps de vol à injection orthogonale

Figure 9 : Schéma du modulateur d'un analyseur TOF à injection orthogonale et des tensions appliquées

Figure 10 : Schéma des différences de potentiel appliquées entre les différentes lentilles du Qstar

### **CHAPITRE 3 : La photoionisation à pression atmosphérique (APPI)**

Figure 1 : Schéma de la source Photospray™

Figure 2 : Schéma de principe de la source Photomate™, d'après les documents Agilent (<http://www.chem.agilent.com>)

Figure 3 : Graphe présentant la température du spray en fonction de la température de chauffage pour différents systèmes de solvants avec  $T_{eb}(\text{H}_2\text{O}) = 100^\circ\text{C}$ ,  $T_{eb}(\text{AcN}) = 82^\circ\text{C}$  et  $T_{eb}(\text{MeOH}) = 65^\circ\text{C}$

Figure 4 : Distribution en énergie interne pour différentes températures dans le cas de (a) l'acétonitrile et (b) dans le méthanol

Figure 5 : Distribution en énergie interne en fonction de (a) la tension de cône (b) de la tension FP (*Focusing Potential*)

Figure 6 : Distribution en énergie interne en fonction de la valeur du potentiel d'extraction. La valeur d'énergie interne moyenne est de 1,64 eV



Figure 7 : Energie interne moyenne des ions en fonction de la température du spray dans le méthanol (en rouge) ; l'acétonitrile (en bleu) et l'eau (en vert)

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

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

Figure 10 : Calcul de l'absorption UV par un spray à base d'H<sub>2</sub>O

Figure 11 : Mécanisme de formation de clusters de méthanol protonés à partir de méthanol et de photoions du toluène selon [Koster, 2001]

Figure 12 : Champ d'application théorique de la photoionisation à pression atmosphérique

Figure 13 : (a) Photographie du prototype de la micropuce APPI : la taille de la puce est de 18 x 29 mm principalement déterminée par la taille des connecteurs fluidiques (b) La micropuce APPI finale avec l'entrée du gaz nébuliseur et le capillaire d'introduction de l'échantillon. Sa taille est de 18 x 10 mm

Figure 14 : Représentation schématique de la microAPPI

Figure 15 : (a) Vue schématique de la micropuce, (b) photographie de la micropuce équipée du connecteur Nanoport et du capillaire de transfert

Figure 16 : Vue schématique de la source DAPPI

Figure 17 : Puce du nébuliseur. Le chauffage s'effectue par le bas de la puce.

## **CHAPITRE 4 : Les sources de lumières**

Figure 1 : Lampe de photoionisation Heraeus<sup>TM</sup> utilisé avec la source d'ions APPI

Figure 2 : Trajectoires des électrons relativistes et non relativistes

Figure 3 : L'installation du rayonnement synchrotron SOLEIL

Figure 4 : Comparaison de SOLEIL et de l'ESRF au niveau énergétique

Figure 5 : Photographie de la tête de ligne

Figure 6 : Densités de puissance émise par le dipôle de DISCO en fonction de l'angle vertical calculées pour trois énergies de photons

Figure 7 : Absorbeur doigt froid. La position d'un thermocouple mesurant la température est indiquée

Figure 8 : Disposition des premiers éléments de la tête de ligne de DISCO

Figure 9 : Schéma optique de le ligne de lumière DISCO

Figure 10 : Schéma de principe du pompage différentiel de DISCO

Figure 11 : Cellules du pompage différentiel

Figure 12 : Dimension du faisceau dans le pompage différentiel

Figure 13 : Principe de l'architecture retenue pour la synchronisation de système de contrôle commande de DISCO avec le logiciel Analyst 1.1 (Applied Biosystems/Sciex)

## **CHAPITRE 5 : Etude d'acides nucléiques**

Figure 1 : Structure d'un ribonucléotide

Figure 2 : Principales bases des acides nucléiques

Figure 3 : Exemple d'un brin d'ADN

Figure 4 : Les formes tautomériques de l'uracile

Figure 5 : Spectre APPI de l'adénine enregistré dans l'eau à 400 °C

Figure 6 : Spectres de masse APPI de (a) l'uracile (b) la guanine dans l'eau à 400 °C

Figure 7 : Spectres de masse APPI de (a) l'uracile (b) la guanine enregistrés dans le méthanol à 400 °C

Figure 8 : Spectres de masse APPI enregistrés à 400 °C en présence d'anisole dans le cas de (a) l'uracile et de (b) la guanine

Figure 9 : Spectre CID de l'adénine protonée avec CE = 50 eV

Figure 10 : Voies de fragmentation observées par dissociation induite par collisions sur l'adénine protonée d'après [Nelson, 1992]

Figure 11 : Spectre CID de la guanine protonée avec CE = 30 eV

Figure 12 : Voies de fragmentation observées par dissociation induite par collisions sur la guanine protonée d'après [Qian, 2007]

Figure 13 : (a) Spectre CID du cation radical de l'uracile à CE = 10 eV (b) Voies de fragmentations observées pour l'espèce radicalaire

Figure 14 : Spectre CID de la molécule protonée de l'uracile avec CE = 10 eV

Figure 15 : Spectres de masse de l'uridine enregistrés dans l'eau à 500 °C (a) sans dopant et assistés en infusant 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  de (b) toluène et (c) d'acétone comme dopant

Figure 16 : Mécanisme de la formation de l'ion *d* selon McCloskey *et al.* [Wilson, 1975]

Figure 17 : Spectres APPI-DA de l'adénosine enregistrés dans l'eau à 500 °C en infusant différents dopants : (a) l'acétone (b) le toluène et (c) l'anisole

Figure 18 : Formation des ions *c* et *d* à partir du cation radical du ribonucléoside

Figure 19 : Spectre de masse APPI-DA de la déoxyadénosine enregistré à 500 °C en utilisant du toluène comme dopant

Figure 20 : Voies de fragmentation des déoxyribonucléosides par déshydratation et perte de base neutre

Figure 21 : (a) Spectre de masse Thermospray de l'AMP enregistré à 500 °C (b) spectre de masse APPI de l'AMP (sans dopant) enregistré dans les mêmes conditions

Figure 22 : Mécanisme de fragmentation proposé pour la formation de la base protonée selon [Kamel, 2004]

Figure 23 : Spectres APPI-DA enregistrés en infusant du dopant à 500 °C dans le cas de (a) l'AMP et (b) l'UMP

Figure 24 : Spectre APPI-DA de la dAMP enregistré à 500 °C en infusant de l'acétone comme dopant

## **CHAPITRE 6 : Etude d'oligodéoxynucléotides**

Figure 1 : Représentation schématique de la nomenclature utilisée pour nommer les ions fragments des oligonucléotides selon [McLuckey, 1992]

Figure 2 : (a) Mécanisme proposé par Beauchamp *et al.* pour expliquer les pertes de BH et B<sup>-</sup> [Rodgers, 1994], (b) Mécanisme proposé par Gross *et al.* [Wan, 2001a]

Figure 3 : Spectre de masse APPI-DA du dinucléotide d(TA) en mode d'ionisation positif en infusant du toluène dans la source

Figure 4 : Mécanisme proposé pour expliquer la formation de l'espèce  $[M+H_2O+H-TH]^+$

Figure 5 : Spectres de masse CID des ions précurseurs à (a)  $m/z$  162 et (b)  $m/z$  176 provenant de la photoionisation sous conditions assistées de d(TA) en mode d'ionisation positif

Figure 6 : Structures proposées pour les ions à  $m/z$  162 et  $m/z$  176

Figure 7 : Spectre de masse APPI-DA du tridéoxynucéotide d(TAG) en mode positif

Figure 8 : Spectre de masse APPI-DA du d(TA) enregistré en mode d'ionisation négatif

Figure 9 : Spectre de masse APPI-DA du d(TAG) enregistré en mode d'ionisation négatif

Figure 10 : Schéma récapitulatif permettant d'expliquer la formation des espèces observées avec A et B représentant des ions fragments de type ECD

Figure 11 : Mécanisme proposé pour par Zheng *et al.* pour expliquer le clivage de la liaison phosphodiester dans l'ADN [Zheng, 2005]

## **CHAPITRE 7: Etude d'oligosaccharides**

Figure 1 : Nomenclature de fragmentation des polysaccharides proposée par Domon et Costello [Domon, 1988]

Figure 2 : Mécanisme de formation des ions de type B et Y en mode positif

Figure 3 : Mécanisme de formation des ions de type A et X en mode positif

Figure 4 : Formation des ions E et E' selon Viseux *et al.*

Figure 5: Fragments attendus pour un saccharide substitué en (1-4)

Figure 6 : Structure du glucose

Figure 7 : Spectres de masse APPI du glucose natif enregistrés dans le système de solvant H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v) en mode positif (a) sans dopant, (b) en infusant du toluène à 1 μL.min<sup>-1</sup> et (c) avec de l'hexafluorobenzène (C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>) à 6 μL.min<sup>-1</sup>

Figure 8 : Spectre de masse APPI du glucose natif enregistré dans le chloroforme en mode d'ionisation positif

Figure 9 : Spectre de masse APPI du glucose natif enregistré en mode d'ionisation négatif dans le chloroforme

Figure 10 : Structures des disaccharides étudiés : (A) composé II<sub>α(1-4)</sub> (maltose), (B) composé II<sub>β(1-4)</sub> (lactose) et (C) composé II<sub>β(1-1)</sub> (tréhalose)

Figure 11 : Spectres APPI du (a) maltose (b) lactose et (c) tréhalose enregistrés en mode d'ionisation positif dans le solvant H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v)

Figure 12 : Schéma de fragmentation des disaccharides conduisant à l'obtention de ruptures de cycle observées sur les spectres de masse

Figure 13 : Chélation du sodium par une liaison (1-1) beaucoup plus facile qu'une liaison (1-4)

Figure 14 : Spectres de masse APPI enregistrés dans le chloroforme du (a) maltose (b) lactose et (c) tréhalose natifs

Figure 15 : Schéma de fragmentation conduisant aux ions E et E' détectés en APPI selon Viseux *et al.* [Viseux, 1997]

Figure 16 : Structures des trisaccharides étudiés au cours de ce travail

Figure 17 : Spectres APPI enregistrés dans le système de solvant H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v) du (a) cellotriose (III<sub>β</sub>) et (b) du raffinose (III<sub>α</sub>) natifs

Figure 18 : Spectres APPI enregistrés dans le chloroforme du (a) cellotriose et (b) du raffinose natifs

Figure 19 : Spectres APPI du glucose perméthylé enregistrés dans le système H<sub>2</sub>O/MeOH (50 :50, v/v) (a) sans dopant (b) en présence de toluène à 8 μL.min<sup>-1</sup> et (c) C<sub>6</sub>F<sub>6</sub> à 3 μL.min<sup>-1</sup>

Figure 20 : (a) Spectre MS/MS de l'ion précurseur à  $m/z$  127 (b) Mécanisme hypothétique de fragmentation permettant d'expliquer la présence de certains ions sur le spectre MS/MS (c) Les 2 voies de fragmentation possible conduisant à l'ion à  $m/z$  97

Figure 21 : Spectre APPI du glucose perméthylé enregistré dans le chloroforme

Figure 22 : Spectres de masse APPI enregistrés dans H<sub>2</sub>O/MeOH (50:50, v/v) du (a) lactose (b) maltose et (c) tréhalose perméthylés

Figure 23 : Formation de l'ion C<sub>1</sub> dans le cas des anomères (a) α et (b) β

Figure 24 : Mécanisme hypothétique de formation de l'ion à  $m/z$  419 à partir de l'espèce sodée [M+Na]<sup>+</sup>

Figure 25 : Spectres APPI enregistrés dans CHCl<sub>3</sub> en mode positif du (a) lactose (b) maltose et (c) tréhalose perméthylés

Figure 26 : Mécanisme hypothétique de formation de l'ion à  $m/z$  365 à partir de l'espèce protonée [M+H]<sup>+</sup>

Figure 27 : Spectres APPI du cellotriose perméthylé enregistrés dans (a) H<sub>2</sub>O/MeOH (b) CHCl<sub>3</sub>

Figure 28 : Spectres APPI du raffinose perméthylé enregistrés dans (a) H<sub>2</sub>O/MeOH (b) CHCl<sub>3</sub>

Figure 29 : Principaux chemins réactionnels de la transformation du glucose dans un spray à haute température

## CHAPITRE 8: Etude de peptides

Figure 1 : Nomenclature pour la fragmentation des peptides

Figure 2 : Mécanisme de formation des ions  $y$  et  $b$  selon [Paizs, 2005]

Figure 3 : Mécanismes de formation des ions immoniums d'après [Paizs, 2005]

Figure 4 : Mécanisme de l'ECD proposé par Zubarev et Mc Lafferty [Zubarev, 1998]

Figure 5 : Mécanisme de l'ECD revu par Syrstad et Tureček [Syrstad, 2005]

Figure 6 : Structure cristallographique du monomère la protéine PF4 (gauche), les structures RMN des peptides hélicoïdaux DF8 (droite) homologues à l'hélice  $\alpha$  ayant lieu dans la protéine PF4

Figure 7 : Spectres APPI du peptide DF8 enregistrés dans l'isopropanol (a) en mode positif (b) en mode négatif

Figure 8 : Comparaison entre les massifs isotopiques expérimentaux et théoriques de l'espèce  $[M+H]^+$  du peptide DF8

Figure 9 : Spectre MS/MS de l'ion  $c_{12}^+$  à  $m/z$  1357.8 obtenue avec une énergie de collision de 60 eV

Figure 10 : Spectre MS/MS de l'ion  $(c_{12}-2H)^-$  à  $m/z$  1356 obtenue avec une énergie de collision de - 60 eV

Figure 11 : Mécanisme proposé pour expliquer la formation des ions  $[c-2H]^-$

Figure 12 : Spectres APPI du peptide DF8 enregistrés en mode négatif dans l'isopropanol (a) dans des conditions natives (b) en présence d'acide

Figure 13 : Distribution isotopique de l'ion  $(c_{13}-2H)^-$  dans le cas du peptide DF8(a) en solution non acidifiée (b) en solution acidifiée (c) de l'adduit TFA de l'ion  $c_{13}$ . Le cercle rouge indique la distribution théorique pour ce fragment



Figure 14 : Mécanisme proposé pour expliquer la formation des ions  $(c-2H+TFA)^-$

Figure 15 : Mécanisme possible à l'origine des massifs isotopiques anormaux observé sur des ions  $c$  en présence formés à partir du peptide en solution acidifiée par TFA dans le milieu

Figure 16 : Région des basses masses du spectre de masse du peptide DF8 enregistré en mode d'ionisation négatif (Y : forme immonium de l'ion  $y$ )

## CHAPITRE 9: Dégâts des radiations ionisantes

Figure 1 : Schéma de la radiolyse de l'eau

Figure 2 : Les différents effets des dégâts des radiations ionisantes : effet indirect ou direct

Figure 3 : Représentation schématique de la nomenclature utilisée pour nommer les ions fragments des oligonucléotides selon [McLuckey, 1992]

Figure 4 : Spectre de masse APPI du dinucléotide d(TA) enregistré en mode négatif dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétone (98/2, v:v) à 400 °C

Figure 5 : Spectre CID de l'ion précurseur détecté à  $m/z$  160 obtenu avec une énergie de collision de 60 eV

Figure 6 : Spectre de masse APPI du dinucléotide d(TA) enregistré en mode négatif dans un mélange H<sub>2</sub>O/acétone d<sub>6</sub> (96/4, v:v) à 400 °C

Figure 7 : Zoom de la région des bases déprotonées des spectres de masse de d(TA) enregistrés dans (a) H<sub>2</sub>O/acétone et (b) D<sub>2</sub>O/acétone

Figure 8 : Mécanismes suggérés pour expliquer les fragmentations observées en APPI

# ***TABLEAUX***

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 2 : Spectrométrie de masse

Tableau 1 : Principales caractéristiques des spectromètres hybrides quadripôle temps de vol commerciaux

Tableau 2 : Signification des principaux paramètres instrumentaux du Qstar modifiables par l'utilisateur

### CHAPITRE 3 : La photoionisation à pression atmosphérique (APPI)

Tableau 1 : Energies d'ionisation de divers composés organiques

Tableau 2 : Nombre d'articles publiés dans la littérature dédiés à l'APPI-MS (source : *Web of Science*, keywords : APPI)

Tableau 3 : Composition des trois mélanges de sels de benzylpyridinium étudiés avec la lettre *p* correspondant à la position para, *m* pour métha et *o* pour une liaison en ortho

Tableau 4 : Energies d'ionisation de divers composés organiques, présentés par rapport à l'énergie des photons fournis par les lampes à Ar, Kr et Xe (valeurs obtenues sur le NIST Webbook, [http : //webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov))

Tableau 5 : Affinités protoniques des différents dopants, de leurs espèces [D-H]<sup>•</sup> et de quelques solvants. Valeurs obtenues sur le *NIST Webbook* ([http : // webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov)) excepté pour l'AP du radical méthoxyphényl qui a été trouvée dans la référence [Kauppila, 2004a]

Tableau 6 : Réactions observées en photoionisation à pression atmosphérique en mode d'ionisation négatif d'après [Kauppila, 2004b]

Tableau 7 : Champ d'application de l'APPI

Tableau 8 : Limites de détection, répétabilité et linéarités des composés étudiés par GC et capLC- $\mu$ APPI-MS par Haapala *et al.* [Haapala, 2007a]

## **CHAPITRE 4 : Les sources de lumière**

Tableau 1 : Quelques données concernant les lampes de photoionisation Heraeus™

Tableau 2 : Caractéristiques spectrales des différentes branches de la ligne DISCO

Tableau 3 : Caractéristiques des éléments d'optique de la ligne

## **CHAPITRE 5 : Etude d'acides nucléiques**

Tableau 1 : Noms et abréviations des nucléobases, nucléosides et nucléotides

Tableau 2 : Valeurs des pKa des nucléosides

Tableau 3 : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse des bases nucléiques

Tableau 4 : Energies d'ionisation (EI) et affinités protoniques (AP) des nucléobases et des molécules de dopants

Tableau 5 : Valeur de l'enthalpie de réaction de transfert d'hydrogène calculée avec la valeur minimale de l'EI et rapport des intensités du cation radical moléculaire sur la molécule protonée pour chaque base nucléique dans l'eau et dans le méthanol

## **CHAPITRE 6 : Etude d'oligodéoxynucléotides**

Tableau 1 : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse des oligonucléotides en APPI dans les deux modes d'ionisation étudiés

## **CHAPITRE 7 : Etude d'oligosaccharides**

Tableau 1 : Pics diagnostiques potentiels pour déterminer l'isomérisation de position (+ : présence, - : absence)

Tableau 2 : Paramètres instrumentaux du Q-Star utilisés classiquement lors de l'analyse des oligosaccharides

Tableau 3a : Données obtenues dans le solvant H<sub>2</sub>O/MeOH (50 :50, v/v) pour les oligosaccharides natifs étudiés

Tableau 3b : Données obtenues dans le chloroforme pour les oligosaccharides natifs étudiés

## **CHAPITRE 8 : Etude de peptides**

Tableau 1 : Les 20 acides aminés naturels les plus courants

Tableau 2 : Nomenclature et structure des ions fragments employées dans cette étude

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

Tableau 4 : Liste des fragments détectés en mode positif

Tableau 5 : Liste des fragments détectés en mode négatif

Tableau 6 : Liste des fragments détectés en mode négatif en présence d'acide dans le milieu

# ***ANNEXES***

# ***ARTICLE 1***

# Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of nucleic bases, ribonucleosides and ribonucleotides

A. Bagag, A. Giuliani<sup>1</sup>, O. Laprévôte\*

Laboratoire de Spectrométrie de Masse, ICSN-CNRS, Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Received 19 February 2007; received in revised form 16 March 2007; accepted 16 March 2007

Available online 24 March 2007

## Abstract

Almost all the ionization techniques have been employed for the analysis of the bases, nucleosides and nucleotides in mass spectrometry, except atmospheric pressure photoionization (APPI). The latter has attracted these last years a growing interest for the analysis of biological molecules. In this work, we report a comprehensive study of the ionization mechanisms under APPI conditions of the bases, nucleotides and nucleosides. In-source fragmentations have been studied first with the photoionization lamp switched off, i.e., under thermospray conditions. It is shown that, in this mode of operation, fragmentations are minor and the compounds do not suffer from thermal degradation. The fragmentation patterns of these biomolecules have been further monitored under both direct and dopant-assisted photoionization conditions for three different dopant molecules (toluene, anisole and acetone). Some fragmentation channels appeared to be dependent on the nature of the dopant employed and the versatility of the fragments generated under APPI conditions originates from the formation of a variety of precursor ions in the ion source.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Atmospheric pressure photoionization (APPI); Nucleobase; Nucleoside; Nucleotide; Fragmentation mechanism

## 1. Introduction

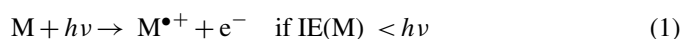
Nucleic acids play a fundamental part in preservation and transfer of the genetic information [1]. The backbone of these molecules is made of alternating sugar (ribose or deoxyribose) and phosphate units bonded together in a long chain, each sugar group being linked to a third type of molecule called a nucleobase.

Some nucleobases have been found in meteorites [2,3] suggesting their possible formation in the interstellar medium [4,5]. The ultraviolet irradiation of the pyrimidine and purine nucleobases is then of the highest interest in view of the possible delivery of these molecules from space to early Earth and of the role that they could have played in the origin and development of life in our planet [6]. The electronic structure and the ionization properties of the nucleic acids are essential for understanding the UV induced degradation pathways of these

important biological molecules. The gas phase reactivity of protonated nucleosides has been investigated by mass spectrometry using mainly their collision-induced dissociation (CID) pathways, which typically begin with the loss of the sugar group leaving the protonated nucleobase. When it further fragments, the latter ion undergoes ring opening and various neutral losses depending on the structure [7,8] of the individual base.

Atmospheric pressure photoionization has attracted in the past few years a growing interest for the analysis of biomolecules. This technique allows almost all kind of solvents to be used, even the most non-polar one, and it is quite insensitive to salts [9].

The ionization mechanism in APPI is based on photoionization of particular species possessing lower ionization energy (IE) than the photon energy ( $h\nu$ ). Usually, a Krypton discharge lamp is used, which produces mostly 10 eV photons. The basic mechanism [10] involves ionization of the analyte (M) according to:



However, the dominant ion observed by APPI is typically  $[M+H]^+$ , result at variance with usual gas phase photoionization experiments performed in diluted media where the molecular ion

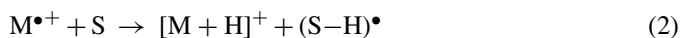
\* Corresponding author. Tel.: +33 1 69 82 30 32; fax: +33 1 69 07 72 47.

E-mail address: [olivier.laprevote@icsn.cnrs-gif.fr](mailto:olivier.laprevote@icsn.cnrs-gif.fr) (O. Laprévôte).

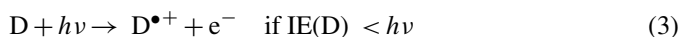
<sup>1</sup> Present addresses: DISCO Beamline, SOLEIL Synchrotron, BP 48, L'Orme des Merisiers, 91192 Gif-sur-Yvette Cedex, France; Cepia, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France.



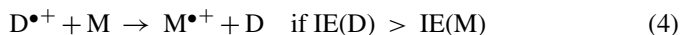
$M^{\bullet+}$  is generally detected [11]. In 2004, Syage [12] solved this apparent discrepancy by showing that the dominant mechanism of  $[M+H]^+$  formation by atmospheric pressure photoionization is an hydrogen abstraction reaction by  $M^{\bullet+}$  from the protic solvents:



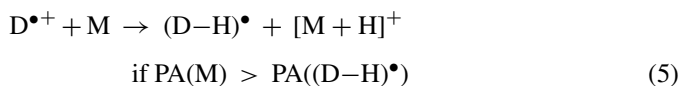
Citing reference [12]: “though the hydrogen abstraction reaction is endothermic in most cases, it is shown that the equilibrium constant is still expected to be much greater than unity in most of the cases studied due to the very slow reverse reaction involving the very low abundant  $[M+H]^+$  and  $(S-H)^{\bullet}$  species”. However, the direct photoionization of the analyte is not very efficient due to the strong VUV absorption by the nebulizing gases and by the solvent. For this reason, APPI sources may be operated with adjunction of a third molecule, usually referred to as dopant (D), in order to enhance the ionization efficiencies [13,14]. The most widely used compounds are acetone, toluene and anisole. The ionization is initiated by photoionization of the dopant:



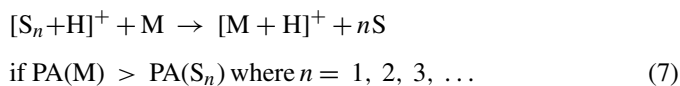
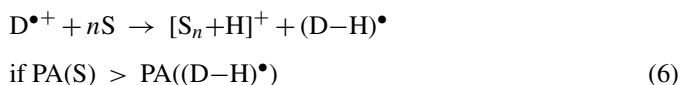
The dopant radical cation  $D^{\bullet+}$  may then exchange charge with the analyte if the latter has an ionization energy (IE) lower than that of dopant [13,14]:



This reaction may compete with a proton transfer process if particular conditions on the proton affinities (PA) are fulfilled [13,14]:



The dopant radical cation can also react by proton transfer with solvent clusters if the proton affinity of the cluster is higher than that of the  $(D-H)^{\bullet}$  species. The protonated solvent cluster interacting with a molecule of analyte can further lead to the protonated molecule of interest [13,14]:



Therefore, three ionization routes are possible for the positive ionization mode: direct photoionization, charge exchange or proton transfer with the dopant; all reactions depending on the ionization energies and proton affinities of the analyte, solvent and dopant. In the case of dopant-assisted APPI (DA-APPI), considering the relative amount of the dopant with respect to the analyte, it is assumed that photoabsorption of the analyte molecule is very unlikely. We therefore consider that, under such conditions, the ionization mechanisms are entirely ascribed to

those involving the dopant as described at Eqs. (3)–(7) and that the direct photoionization (Eq. (1)) is negligible.

Hitherto less effort has been devoted to the study of the fundamental processes occurring in the APPI source despite their complexity and fundamental interest. In this work, we first have paid attention to the behaviour of the molecules with the photoionization lamp switched off, namely under thermospray conditions. The comparison of the mass spectra obtained by that way to those recorded with the UV lamp switched on allowed us to decipher the consequences of the direct light absorption by the molecules. Addition of a dopant, in order to achieve dopant-assisted APPI experiments, led us to reveal the specific fragmentations controlled by the analyte/dopant interactions.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemical and compounds

All solvents were HPLC grade. Methanol and acetone were purchased from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Water used was bidistilled and filtered on Millipore cartridges (18 M $\Omega$ ). Toluene 99.5% from SDS (Peypin, France), anisole 99% from Acros Organics (Geel, Belgium) and acetone were used as dopants and introduced at various flow rates using a Harvard syringe pump model 22 (Harvard, Holliston, MA, USA).

Nucleic bases have been provided graciously by Dr. Pascale Clivio (FRE CNRS 2715, Reims, France) and the nucleosides and nucleotides were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium).

### 2.2. Mass spectrometry

The photoionization experiments were carried out by using the Photospray<sup>TM</sup> source (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). This source was fitted with a Krypton PKS 106 lamp (Cathodeon, Cambridge, UK) that generates a continuous flow of mainly 10 eV photons with a minor contribution of 10.6 eV photons. Mass spectra were recorded using a hybrid quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Qstar Pulsar-i, Applied Biosystems). Stock solutions of compounds were prepared in water at a concentration of 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

The samples were injected by the flow-injection analysis (FIA) method: 20  $\mu$ L of the sample solutions were loaded into an injection loop and next eluted with water (called “LC solvent” in the following in analogy with liquid chromatographic separations). The LC solvent was introduced into the photospray ionization source using a HPLC pump Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Palo alto, CA, USA) at a flow rate of 200  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. The nebulizer gas was dry and clean air.

Mass spectrometric instrumental parameters were adjusted in order to attain the best signal-to-noise ratio and to minimize possible in source collision-induced dissociation (CID). Operating parameters for the nucleic bases were: Ion source voltage (ISV) = 1200 V, declustering potential 1 (DP<sub>1</sub>) = 20 V, focusing potential (FP) = 100 V, declustering potential 2 (DP<sub>2</sub>) = 15 V. For the nucleosides and nucleotides, the typical parameters were the same except for the ISV value which was adjusted to 1800 V. The

gas flow protecting the lamp was fixed to  $2 \text{ L min}^{-1}$ . Data were acquired using the Analyst QS software (Applied Biosystems).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Purine and pyrimidine bases

The mass spectra of the nucleic bases recorded at  $400^\circ\text{C}$  with the lamp switched off show the intense ion peaks assigned to  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ions and sodium cationized species ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) for all the studied bases (adenine, thymine, uracil, guanine, cytosine) (spectra not shown). The cationized species observed under such conditions are transferred into the gas phase by a thermospray-like process, that is desolvation of charged species performed in solution, as shown in previous works [15,16]. The thermal degradations of nucleobases and the *in*-source collision-induced dissociations of their corresponding ions appear to be minor.

Table 1 lists some data concerning the nucleobases which are relevant for the present study. Since the NIST [17] does not recommend any precise value for the ionization energies of the nucleobases, Table 1 reports the minimum and maximum values. From those ionization energy data, it is expected that all the nucleobases may be ionized under APPI conditions, since their ionization energies are all lower than the energy of the photons delivered by the lamp. Hence, switching the lamp on has large consequences on the mass spectra of the bases. The total ion current increases and the absolute ion intensities are significantly more important than in thermospray. Fig. 1 compares the APPI mass spectrum recorded in water for the uracil (Fig. 1a) to that of guanine (Fig. 1b). The mass spectra show the formation of intense  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ion peaks for all the bases, which is at variance with usual gas phase photoionization experiments performed in diluted media [18], as mentioned previously. Moreover, only intact protonated or cationized molecules are detected without any significant fragment. In the case of uracil, this observation is in agreement with previous photoionization experiments carried out on the isolated (gas phase) molecule, for which the lowest

Table 1  
Ionization energies (IE) and proton affinities (PA) of the nucleobases and dopant molecules

Compounds	IE (eV)	PA (kJ mol <sup>-1</sup> )
Guanine	7.8–8.2	959.5
Adenine	8.3–8.9	942.8
Cytosine	8.4–9.0	949.9
Thymine	9.0–9.4	880.9
Uracil	9.2–9.8	872.7
Adenosine		989.3
Cytidine		982.5
Uridine		947.6
Toluene	8.83	
Benzyl radical		831.4
Anisole	8.20	
Methoxyphenyl radical		~880
Acetone	9.69	
2-oxo-Propyl radical		820

The data are extracted from the NIST database<sup>17</sup> except for the proton affinity of the methoxyphenyl radical which has been found in reference [19].

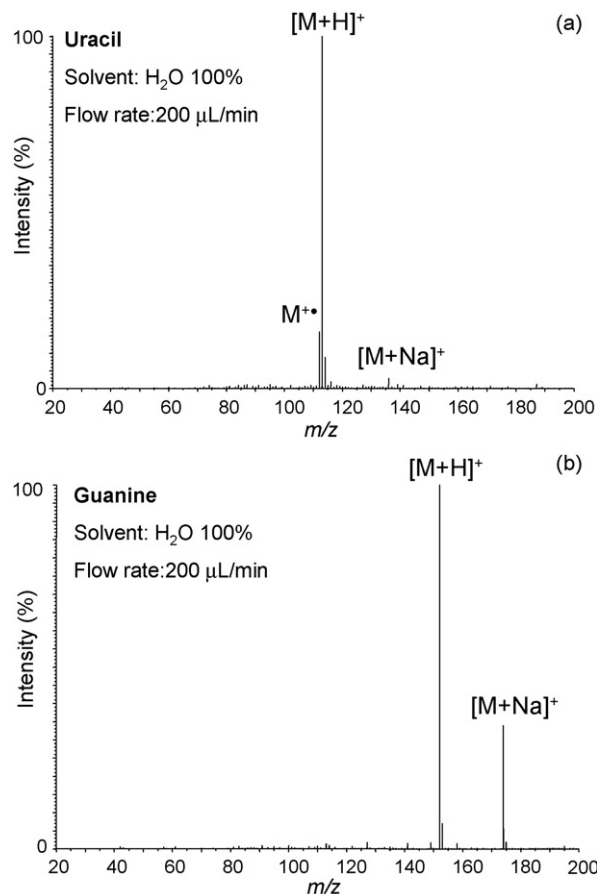


Fig. 1. APPI mass spectra of (a) uracil and (b) guanine, recorded in  $\text{H}_2\text{O}$  at  $400^\circ\text{C}$ .

appearance energy for fragmentation was found at  $10.95 \text{ eV}$  [18]. With regard to the other bases, uracil exhibits a conspicuous behaviour since its molecular radical cation  $\text{M}^{\bullet+}$  is detected. The major H-atom transfer reaction must then be considered as competitive to the processes leading to the molecular ions (direct photoionization or charge exchange reaction).

According to Syage [12], the enthalpy of the H-atom transfer reaction (Eq. (2)) can be expressed as:

$$\Delta H = \text{IE}(\text{H}) - \text{IE}(\text{M}) - \text{PA}(\text{M}) + D_{\text{H}}(\text{S}) \quad (8)$$

where  $\text{IE}(\text{H})$  and  $\text{IE}(\text{M})$  are the respective ionization energies of the hydrogen atom and of the analyte,  $\text{PA}(\text{M})$  is the proton affinity of the analyte and  $D_{\text{H}}(\text{S})$  is the H-atom bond dissociation energy in the solvent molecule. With  $\text{IE}(\text{H}) = 13.6 \text{ eV}$ ,  $D_{\text{H}}(\text{H}_2\text{O}) = 5.16 \text{ eV}$  and  $D_{\text{H}}(\text{MeOH}) = 4.08 \text{ eV}$ , the reaction enthalpies have been calculated for water and methanol taking into account the minimal value of the ionization potential energy. The results, listed in Table 2, are compared to the  $\text{M}^{\bullet+}/[\text{M}+\text{H}]^+$  ratios calculated in both solvent from the mass spectrometry data. According to the obtained reaction enthalpy values, it appears that the H-atom transfer reaction is always endothermic in water, but it is exothermic in methanol for three bases: guanine, cytosine and adenine.

From the intensity ratio given in Table 2, it is seen that for every nucleobases the radical cation is a minor species in both

Table 2  
Calculation of the reaction enthalpy values for the H-atom abstraction reaction (Eq. (8)) for the minimal value of IE in Table 1 and intensity ratios of the molecular radical cation to the protonated molecule for each nucleic base in water and methanol

Bases	$\Delta H_{\text{H}_2\text{O}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{\text{MeOH}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$[\text{M}^{\bullet+}]/[\text{M}+\text{H}]^+$ in H <sub>2</sub> O	$[\text{M}^{\bullet+}]/[\text{M}+\text{H}]^+$ in MeOH
Guanine	96.3	-7.7	0.01	0.01
Adenine	64.5	-39.5	$2.4 \times 10^{-3}$	0
Cytosine	48.2	-55.8	$2.1 \times 10^{-4}$	$6.7 \times 10^{-5}$
Thymine	279.3	175.3	$1.2 \times 10^{-3}$	$3.45 \times 10^{-3}$
Uracil	265.8	161.8	0.16	16.6

solvent, except for uracil. Hence, no trend may be derived within the series of molecules from the comparison of the calculated enthalpies and the intensity ratios. Such a disagreement between the observations and the calculation of the enthalpy in water has been pointed out previously [12]. Although the solvents used in this work were of the highest available purity, ionization of an impurity and subsequent proton transfer to the bases is mentioned for completeness.

The use of dopant-assisted ionization conditions provides additional information on the ionization processes occurring in the APPI source. Fig. 2 displays the mass spectra of uracil (Fig. 2a) and guanine (Fig. 2b) in presence of anisole (at a 0.5  $\mu\text{L min}^{-1}$  flow rate). In this case, the situation is completely reversed with regard to the previous experiment: the molecular

ion  $\text{M}^{\bullet+}$  gives a very strong signal with guanine whereas uracil is detected only in its protonated form. The mass spectra of the other nucleobases are similar to that of uracil (Fig. 2a), without any molecular ion or other fragment ion. From Table 1, it appears that the proton affinities of the  $[\text{D}-\text{H}]^{\bullet}$  species formed from the dopants are lower than those of the nucleobases, thereby justifying their facile protonation under DA-APPI conditions (Eq. (5)). The case of the guanine molecule is particularly interesting inasmuch as it presents the highest proton affinity (which should be in favor of protonation reactions, Eq. (5)) and the lowest ionization energy (which could induce efficient charge transfer reactions, Eq. (4)). It is worth noting that guanine is the only compound for which the ionization energy is lower than that of anisole (Table 1). In agreement with the respective ionization energies of guanine and anisole, the charge transfer reaction (Eq. (4)) clearly takes place with this dopant as shown in spectrum 2b. This condition is not fulfilled for the other nucleobases. This result helps to understand the origin of the radical cation which is observed in the case of uracil in the absence of dopant. The comparison of the mass spectra of this compound shown in Figs. 1 and 2a clearly demonstrates that the radical cation was formed by photoabsorption (Fig. 1a, Eq. (1)), a process which can not be observed when a dopant is introduced in the source and undergoes the photoionization reaction in place of the analyte. All these observations confirm our assertion that direct photoionization of the analyte may be neglected under dopant-assisted APPI. Depending on the relative proton affinities and ionization energies of the dopant and analyte molecules, their interaction leads to charge exchange reaction or H-atom transfers, or both.

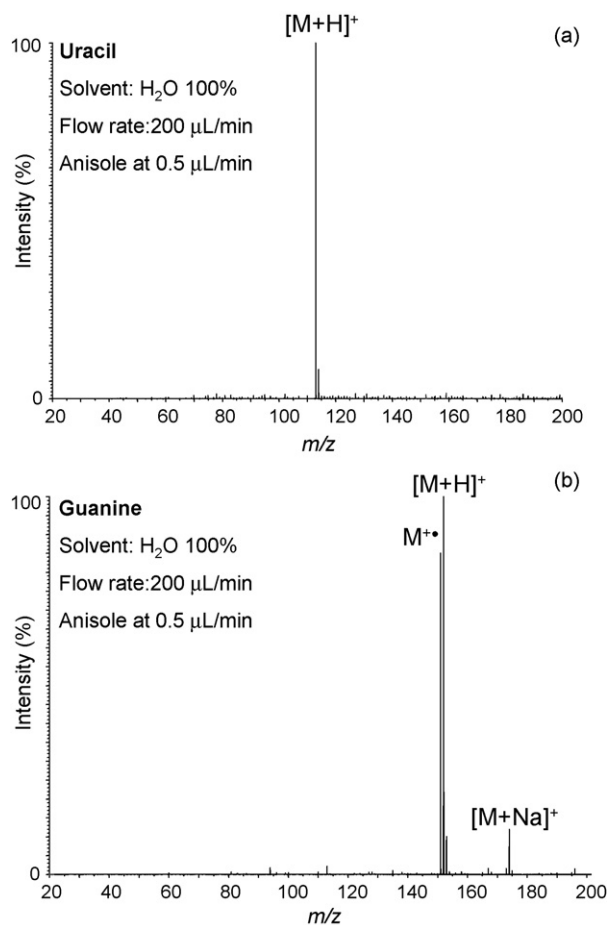
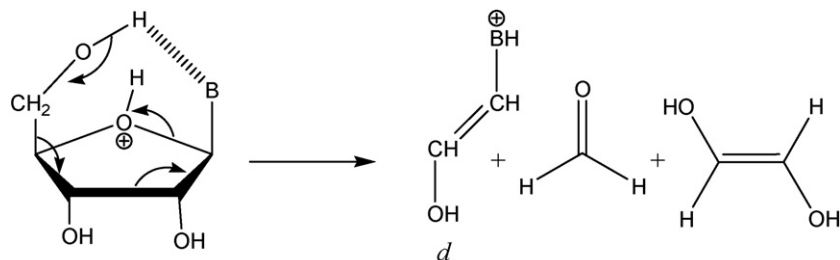


Fig. 2. Dopant-assisted APPI mass spectra recorded at 400 °C of (a) uracil and (b) guanine with infusion of anisole.

### 3.2. Ribonucleosides

The APPI mass spectra of the ribonucleosides (adenosine, cytidine, uridine and guanosine) are very similar to those acquired under thermospray conditions (i.e., with the lamp switched off) but the total ion current is much higher with the lamp on. The Fig. 3a displays the photoionization mass spectrum of uridine recorded at 500 °C in water. The major peaks correspond to the cationized species  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  and  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$  together with a fragment assigned to the protonated nucleobase, which arises from the loss of the neutral sugar moiety [20,21].

Introduction of the dopant has significant consequences on the mass spectra of the ribonucleosides. As exemplified by Fig. 3b, infusion of toluene at 5  $\mu\text{L min}^{-1}$  in the ion source reduces strongly the  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ion peak with respect to that of the  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ion. The loss of the ribose moiety leading the protonated



Scheme 1.

base ( $\text{BH}_2^+$ , base peak) is still observed without any other fragmentation process.

Changing toluene by acetone as the dopant induces some modifications of the DA-APPI mass spectrum of uridine (Fig. 3c). Beside the protonated molecule and the  $\text{BH}_2^+$  ion peaks, additional fragment ions show up at  $m/z$  227 ( $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ) and  $m/z$  155. The latter one corresponds to a *d* ion according to the nomenclature proposed by McCloskey et al. [22,23] (Scheme 1). For uridine, it appears only when acetone is used as a dopant and its relative intensity increases when the acetone flow rate rises. The formation of this *d* ion should thus

be related to the difference between acetone and toluene with regards to the protonation reaction of the analyte. The lowest proton affinity of the 2-oxo-propyl radical (which corresponds to the  $[\text{D}-\text{H}]^\bullet$  species formed from acetone) could increase the protonation rate of the nucleoside on the less basic sugar part of the molecule thus inducing the fragmentation reaction shown in Scheme 1. According to Wilson and McCloskey [22], the proton affinity of the sugar moiety is below  $865 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Since the *d* fragment is not observed using toluene for uridine (Fig. 3b), the proton affinity of the ribose moiety should stand between those of the benzyl radical ( $\text{PA} = 831 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) and of the 2-oxo-propyl radical ( $\text{PA} = 820 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). The assumption of a protonation on the sugar moiety of the ribonucleosides as origin of *d* ions is reinforced by the observation of a concomitant water loss (Fig. 3c).

The influence of the dopant properties on the behaviour of the analyte molecule under DA-APPI conditions is further illustrated by the case of adenosine. Fig. 4a displays the mass spectrum of adenosine recorded with  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  of acetone. The same fragment ions as for uridine (Fig. 3c) are observed but with different relative intensities: the base peak corresponds to the protonated molecule and the relative abundances of the two main fragments  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  and  $\text{BH}_2^+$  are significantly reduced. The higher stability of the  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ion formed from adenosine is likely to be related to its higher proton affinity with respect to uridine ( $989.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  versus  $947.2 \text{ kJ mol}^{-1}$  for uridine, see Table 1). By using toluene in place of acetone, the  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  and  $\text{BH}_2^+$  ion peaks remain at a similar level but the appearance of a fragment at  $m/z$  164 and of the  $\text{M}^{\bullet+}$  ion is particularly noteworthy (Fig. 4b), a phenomenon which could be attributed to the higher PA value of the benzyl radical. The use of anisole confirms this hypothesis. With this dopant, for which the  $[\text{D}-\text{H}]^\bullet$  radical possesses the highest proton affinity (Table 1), the protonation of the analyte become a minor process (Fig. 4c). By contrast, other reaction pathways are spectacularly enhanced such as those leading to the *d* fragment and to the one at  $m/z$  164, which was assigned to a *c* fragment ion in the McCloskey's nomenclature [22]. Consequently, the *d* and *c* fragments could originate from an other precursor ion than the protonated molecule. In this context, the appearance of the molecular ion  $\text{M}^{\bullet+}$  of adenosine with toluene and its very high abundance with anisole must be taken into account. According to Shaw et al. [23] who reported the formation of *c* and *d* ions under electron impact ionization (Scheme 2), we suggest that these fragments could originate from the radical cation  $\text{M}^{\bullet+}$  of adenosine formed by charge transfer with the dopant radical

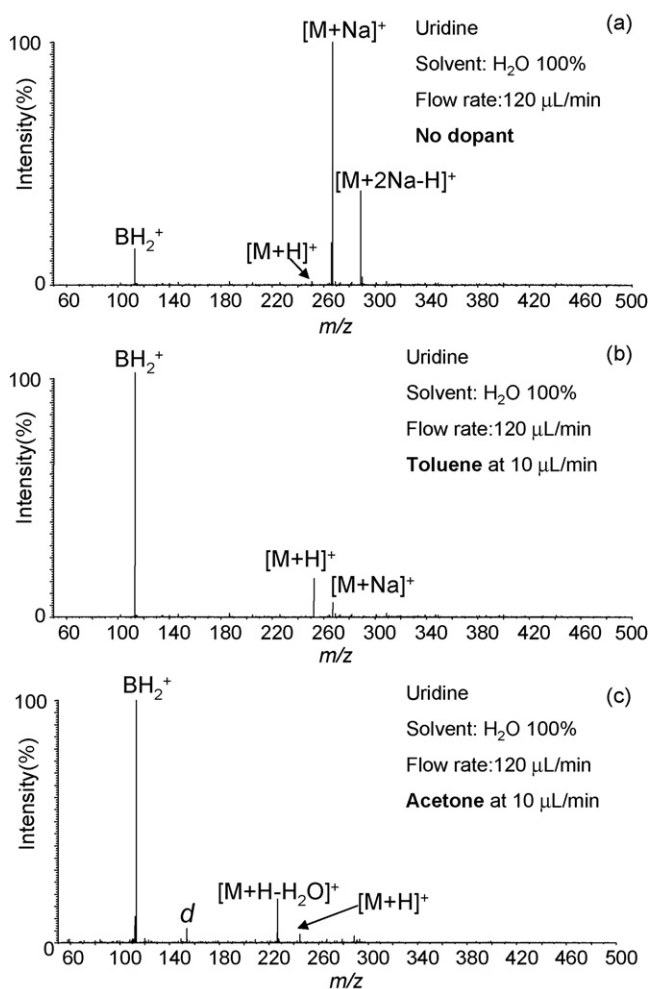
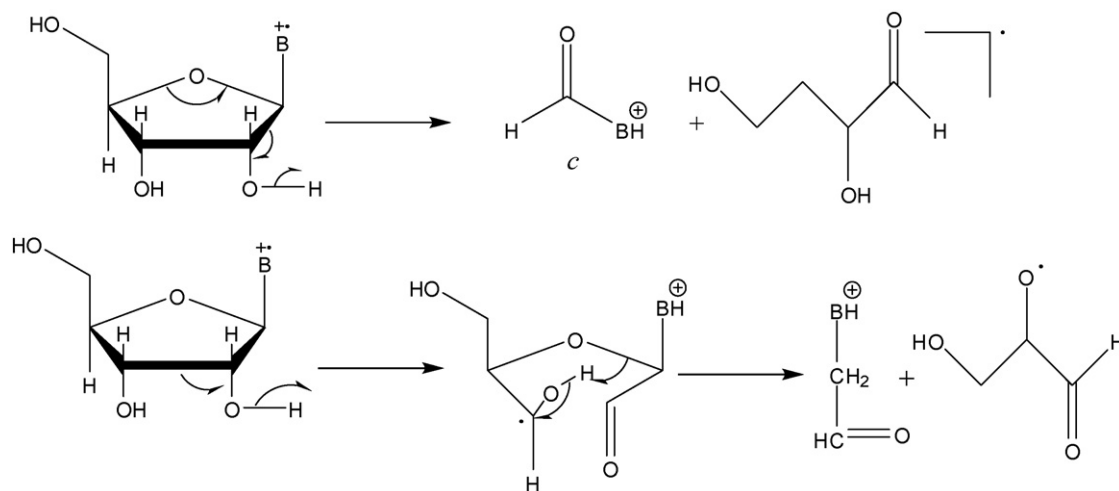


Fig. 3. APPI mass spectra of uridine recorded at  $500^\circ\text{C}$  (a) without dopant, (b) assisted with toluene, and (c) with acetone.



Scheme 2.

cation. The comparison of the ionization energies of the three dopants then leads to an apparently paradoxical result: the charge transfer reactions are all the more favourable as the ionization energies of the dopant are low (Table 1). Two different factors have however to be taken into account. First, the charge exchange reaction is competitive to the proton transfer: if the latter reaction rate is lowered, it increases the relative rate of the former. Secondly, as demonstrated in a previous work [24], the photoionization cross section of anisole is approximately two-fold that of toluene, thus increasing the abundance of radical cations able to react with the analyte.

As a consequence, it appears that the *d* fragment ion could originate either from a molecule protonated at the ribose part or from the radical molecular ion.

### 3.3. Deoxyribonucleosides

Deoxyribonucleosides behave similarly to ribonucleosides with respect to thermospray ionization and direct photoionization. Fig. 5 shows the mass spectrum of deoxyadenosine with  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  flow rate of toluene. Whatever the dopant used, the mass spectra of the deoxyribonucleosides are dominated by fragment ions originating from successive dehydrations, from

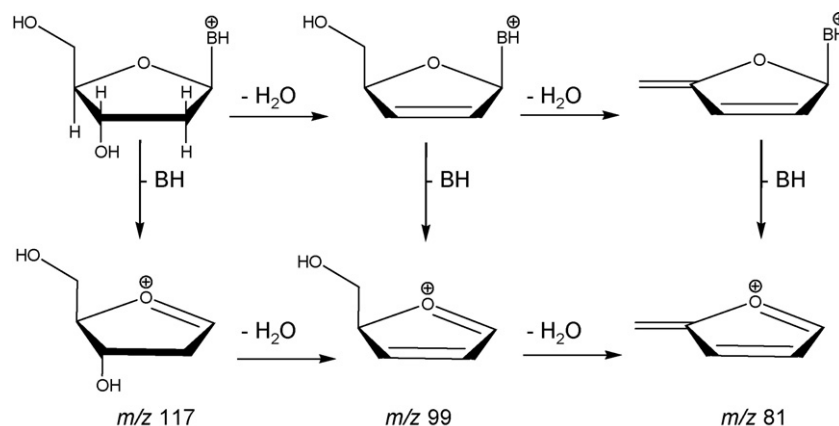
which neutral base losses might occur, as depicted in Scheme 3 [25].

The fragment ions at  $m/z$  117 ( $[\text{M}+\text{H}-\text{BH}]^+$ ) and  $m/z$  81 are observed in Fig. 5, whereas the  $m/z$  99 ion ( $[\text{M}+\text{H}-\text{BH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ) is of too low abundance to be detected. The ions corresponding to the protonated bases are observed for all nucleosides.

In contrast to the ribonucleosides, the water loss that characterizes the presence of the proton on the sugar moiety is not accompanied by the formation of *d* ion. Other processes are observed such as the loss of a second molecule of water or of  $\text{H}_2$  from both  $[\text{M}+\text{H}]^+$  and  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$  precursor ions. The absence of *c* ions does not allow us to propose the existence of radical species  $\text{M}^{\bullet+}$  which, moreover, are not detected in the spectra.

### 3.4. Ribonucleotides

Three ribonucleotides, cytidine-5'-monophosphate (CMP), adenosine-5'-monophosphate (AMP) and uridine-5'-monophosphate (UMP) have been studied under thermospray conditions and exhibit analogous behaviours. Fig. 6a displays the thermospray mass spectrum obtained for AMP. For all nucleotides, the thermospray spectra show the formation of



Scheme 3.

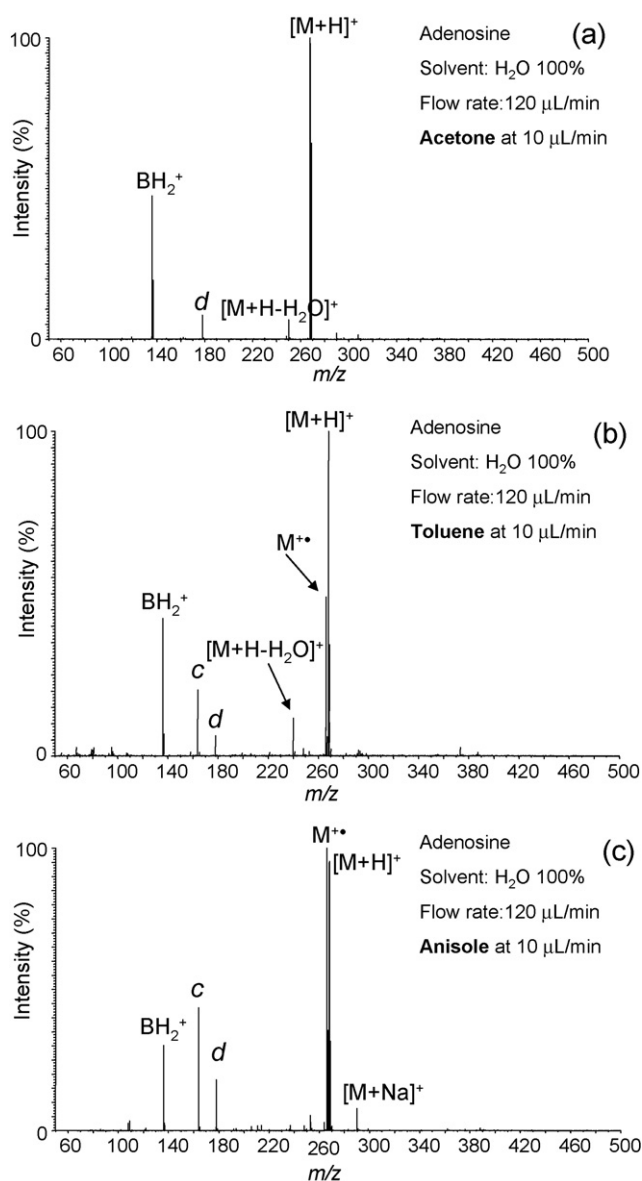


Fig. 4. DA-API mass spectra of adenosine recorded at 500 °C using different dopants: (a) acetone, (b) toluene, and (c) anisole.

mono- and disodiated molecular species along with a less abundant protonated molecule. Fragment ions corresponding to [M+H-HPO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> and [M+Na-HPO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> are generated from the protonated and sodium-cationized nucleosides, respectively. A consecutive loss of water can also arise from the [M+H-HPO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> fragments but not from the cationized ions. Mechanistic studies [25] have reported that, under CID conditions, the formation of the protonated nucleobase (BH<sub>2</sub><sup>+</sup>) involves the assistance of the phosphate group, leading to a very stable cyclic phosphoribose molecule (Scheme 4). The corresponding ion peaks are clearly present in all thermospray spectra as exemplified by that of AMP (Fig. 6a). Under direct photoionization conditions (Fig. 6b), the same fragment ions are detected but with significantly different relative abundances. The contribution of the sodium-cationized ions to the ion current is reduced, thus underlying the increase amount of protonated molecules by photoionization. In addition,

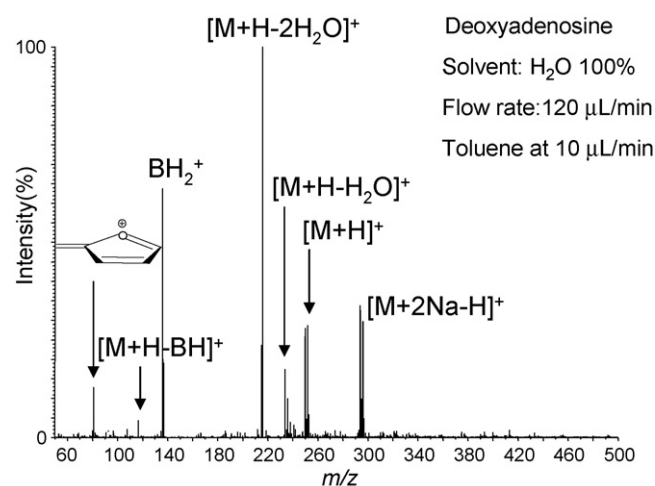


Fig. 5. DA-API mass spectrum of deoxyadenosine recorded at 500 °C using toluene as dopant.

weak *c* and *d* fragment ion peaks are also present. By using acetone as dopant, the DA-API mass spectrum of AMP shows similar features (Fig. 7a). Cationized and protonated molecules are observed along with the BH<sub>2</sub><sup>+</sup>, [M+Na-HPO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> and [M+H-HPO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> fragment ions, with a further reduced intensity of the

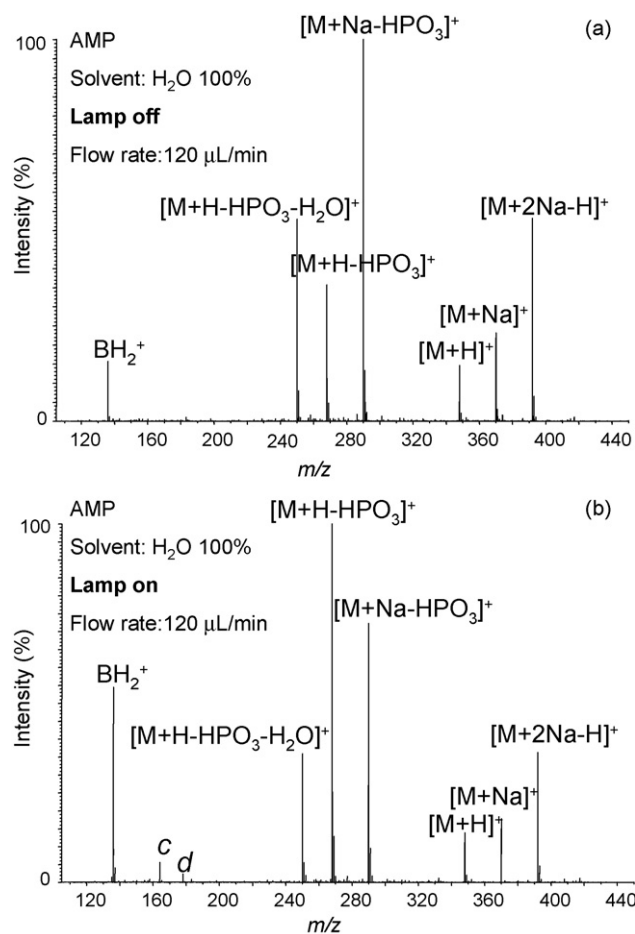
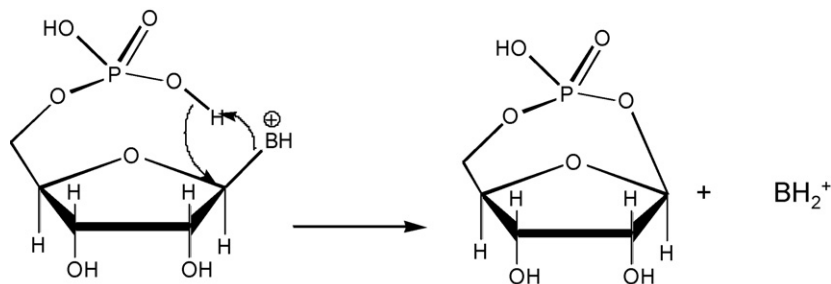


Fig. 6. (a) Thermospray mass spectrum of AMP recorded at 500 °C; (b) APPI mass spectrum of AMP (without dopant) in the same conditions.



Scheme 4.

sodium-containing ions. Similarly to the direct photoionization (Fig. 6b), *c* and *d* fragments of low abundance are observed. Actually, the only difference with the spectrum obtained without dopant is the absence of consecutive loss of water from the  $[M+H-HPO_3]^+$  fragment ion.

With regards to AMP, UMP shows a very different behaviour. Fig. 7b shows the DA-APPI mass spectrum of UMP with  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  of acetone infused. In this case two consecutive losses of water from the  $[M+H]^+$  ion are observed, which were absent from the mass spectrum of AMP (Fig. 7a). Moreover, the  $[M+H-HPO_3-H_2O]^+$  ions are abundant, at the expense of the  $[M+H-HPO_3]^+$  species, in contrast to the AMP molecule.

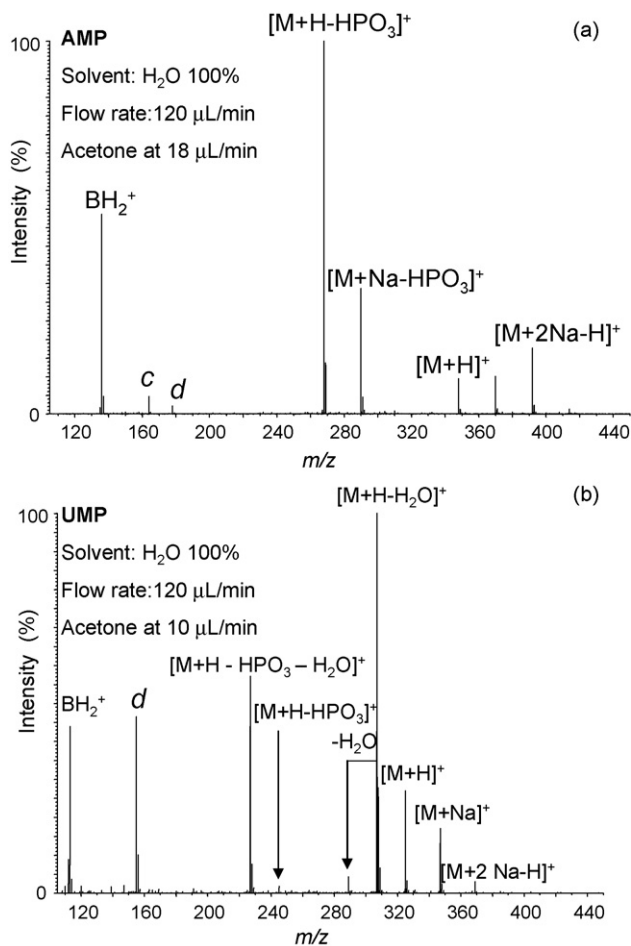


Fig. 7. DA-APPI mass spectra recorded at  $500^\circ\text{C}$  of (a) AMP and (b) UMP. Dopant: acetone.

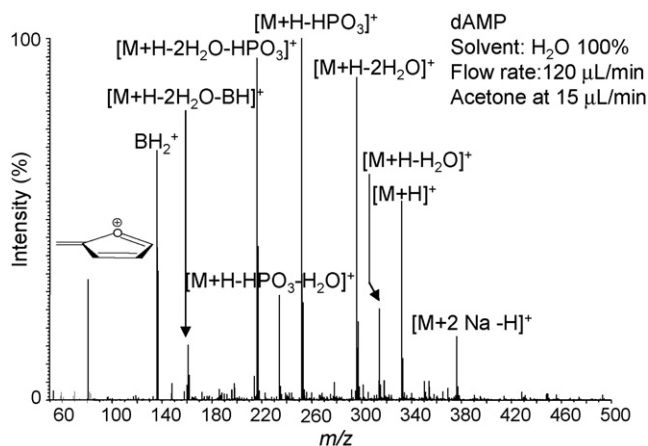


Fig. 8. DA-APPI mass spectrum of dAMP recorded at  $500^\circ\text{C}$  using acetone as dopant.

In addition, Fig. 7b exhibits a quite intense *d* fragment ion and no *c* ion. Similarly to the ribonucleoside uridine, these abundant losses of water and the presence of abundant *d* fragment ions suggest an efficient protonation on the ribose moiety of UMP with acetone. The noticeable differences in the fragmentation patterns between protonated UMP and AMP thus underline the pre-eminent role of the protonation sites on their gas phase behaviour. The much higher proton affinity of adenine than that of uracil could enhance significantly the protonation rate of the nucleic base for AMP and of the ribose moiety for UMP. In the case of AMP and in the same way as for the corresponding nucleoside adenosine, minor charge exchange reactions could occur, leading to a weak but significant *c* ion peak.

### 3.5. Deoxyribonucleotides

The following deoxyribonucleotides have been studied: 2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate (dAMP), 2'-deoxycytidine-5'-monophosphate (dCMP), 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (dGMP) and 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP). They all exhibit very similar behaviours and therefore only the case of dAMP will be presented. The DA-APPI mass spectrum of dAMP with acetone is displayed at Fig. 8. In correspondence with the case of ribonucleotides (Fig. 7), protonated and sodium-cationized molecules are of low abundance and relatively intense fragment ions are observed. The latter appeared not to be dependant on the nature of the

dopant. The consecutive losses of phosphoric acid, water and nucleic base are more abundant for d(AMP) than for AMP. The same observation was made with nucleosides molecules.

#### 4. Conclusions

This work reports on a comprehensive mass spectrometry study related to nucleobases, nucleotides and nucleosides under APPI conditions. The peculiar features of this ionization technique have been evidenced by direct comparison of the mass spectra with those acquired under thermospray ionization conditions (i.e., with the UV lamp switched off). While fragmentation was little in thermospray, it revealed especially important under dopant-assisted photoionization conditions which show competitive charge transfer and proton transfer reactions. For nucleosides and nucleotides, the *c* ions appear to come from radical species  $M^{\bullet+}$ . The *d* fragment ions, for their part, can have a double origin: the molecular ions  $M^{\bullet+}$  for one hand and, on the other hand, the protonation on the ribose moiety. The protonation rate of the ribose depends strongly on the difference of proton affinities between the bases and the molecules of dopant. The differences in the extent of fragmentation of  $[M+H]^+$  ions between the nucleotides and the nucleosides may indicate a real difference in the ease of decomposition of these protonated species, thus showing the importance of the phosphate group. Moreover, successive dehydration reactions occur more easily from deoxyribose containing compounds than from ribose derivatives. In conclusion, the great versatility of fragmentations in APPI comes from the formation of a variety of precursor ions which can be either (radical) molecular ions or molecules protonated at various sites. In that context, the relative ionization energies and proton affinities of the sample and dopant molecules have been shown to play a key role in the relative abundance of these different precursor ions.

#### References

- [1] C. Périgaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach, *Nucleosides Nucleotides* 11 (1992) 903.
- [2] P.G. Stocks, A.W. Schwartz, *Nature* 282 (1979) 709.
- [3] A. Shimoyama, S. Hagishita, K. Harada, *Geochem. J.* 24 (1990) 343.
- [4] S. Chakrabati, S.K. Chakrabati, *Astron. Astrophys.* 354 (2000) L6.
- [5] I.W.M. Smith, D. Talbi, E. Herbst, *Astron. Astrophys.* 369 (2001) 611.
- [6] A. Brack (Ed.), *The Molecular Origins of Life*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1998.
- [7] J.M. Gregson, J.A. McCloskey, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 165/166 (1997) 475.
- [8] B. Porcelli, L.F. Muraca, B. Frosi, E. Marinello, R. Vernillo, A. De Martio, S. Catinella, P. Traldi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 398.
- [9] S.J. Bos, S.M. van Leeuwen, U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 85.
- [10] J.-P. Rauha, H. Vuorela, R. Kostianen, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 1269.
- [11] J. Berkowitz, *Photoabsorption, Photoionization, Photoelectron Spectroscopy*, Academic Press, New York, 1979, p. 93.
- [12] J.A. Syage, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1521.
- [13] T.J. Kauppila, T. Kotiaho, R. Kostianen, A.P. Bruins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 203.
- [14] T.J. Kauppila, T. Kuuranne, E.C. Meurer, M.N. Eberlin, T. Kotiaho, R. Kostianen, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5470.
- [15] S. Cristoni, L.R. Bernardi, I. Binunio, F. Guidugli, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1686.
- [16] D. Debois, A. Giuliani, O. Laprèvote, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 1554.
- [17] P.J. Linstrom, W.G. Mallard (Eds.), *Nist Chemistry WebBook*, NIST Standard reference Database Number 69, June 2005. National Institut of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 20899 (<http://webbook.nist.gov>).
- [18] H.W. Jochims, M. Schwell, H. Baumgärtel, S. Leach, *Chem. Phys.* 314 (2005) 263.
- [19] T.J. Kauppila, R. Kostianen, A.P. Bruins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 808.
- [20] J. Wu, S.A. McLuckey, *Int. J. Mass Spectrom.* 237 (2004) 197.
- [21] A.K. Vrkic, R.A.J. O'Hair, S. Foote, G.E. Reid, *Int. J. Mass Spectrom.* 194 (2000) 145.
- [22] M.S. Wilson, A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 3436.
- [23] S.J. Shaw, D.M. Desiderio, K. Tsuboyama, J.A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 2510.
- [24] A. Giuliani, D. Debois, O. Laprèvote, *Eur. J. Mass Spectrom.* 12 (2006) 189.
- [25] A.M. Kamel, B. Munson, *Eur. J. Mass Spectrom.* 10 (2004) 239.



# ***ARTICLE 2***



# Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of oligodeoxyribonucleotides

A. Bagag,<sup>a</sup> A. Giuliani<sup>b,c</sup> and O. Laprévôte<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse, ICSN-CNRS, Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France.  
E-mail: olivier.laprevote@icsn.cnrs-gif.fr

<sup>b</sup>DISCO Beamline, Synchrotron SOLEIL, BP 48, L'Orme des Merisiers, 91192 Gif-sur-Yvette Cedex, France

<sup>c</sup>Cepia, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France

Small oligonucleotides (di- and trimers) were investigated by atmospheric pressure photoionization (APPI) with focus on the fragmentation mechanisms. The fragmentation patterns of these biomolecular ions have been monitored under dopant-assisted photoionization (DA-APPI) conditions. Our results reveal new aspects of the gas-phase chemistry of ions formed from such biomolecules. They illustrate that the reaction between low-energy electrons released from photoionization processes and di- and trinucleotides lies in dissociative electron attachment processes leading to phosphodiester bond cleavages and to the formation of numerous fragments in the ion source. The conditions of DA-APPI, which involve protic solvents and atmospheric pressure conditions, seem to be relevant for the study of radiation damages to biological molecules

**Keywords:** atmospheric pressure photoionization (APPI), oligonucleotides, fragmentation mechanisms, electrons

## Introduction

Atmospheric pressure photoionization (APPI) is a relatively recent ionization technique, which has attracted a growing interest. This method proved useful for the ionization of small hydrophobic molecules but its domain of applications has been gradually extended to larger and more polar compounds.<sup>1–4</sup> To our knowledge, oligonucleotides have so far not been studied under APPI conditions. Oligonucleotides are molecules of biological interest and their detection and structural analysis using APPI is worth evaluating. Moreover, as discussed below, APPI involves vacuum ultraviolet (VUV) irradiation of a spray containing molecules in the solution phase. Thus, the technique could reveal useful information for the study of UV-related radiation damage to biological molecules in protic medium and under atmospheric pressure conditions.

Dinucleotides serve as model systems to study the dissociation of larger oligonucleotide ions whose behavior in the gas phase is rather complex. Because dinucleotides are the

smallest sub-units of nucleic acids that bear sequence information, their characterization by mass spectrometry is potentially useful in structural studies of nucleic acids.

The ionization process in APPI is directly dependent on the solvent and dopant, as well as on the composition of the nebulizing gases. The formation of ions in positive ion APPI is presented in Table 1. The basic mechanism involves the direct photoionization of the analyte [Equation (1)]. However, the dominant ion observed by APPI is typically  $[M+H]^+$ , a result at variance with usual gas-phase photoionization experiments performed in diluted media where the molecular ion  $M^{+\bullet}$  is generally detected.<sup>5</sup> In 2004, Syage<sup>6</sup> solved this apparent discrepancy by showing that the dominant mechanism of  $[M+H]^+$  formation by atmospheric pressure photoionization is a hydrogen transfer reaction from the protic solvents to  $M^{+\bullet}$  [Equation (3)]. Alternatively, APPI ion sources may be operated with adjunction of a third molecule, called dopant (D), which is easily photoionized [Equation (4) of Table 1].

Table 1. Ion formation mechanisms in positive ion APPI.<sup>2,7</sup>

M (analyte) + 10 eV (photons)	$\rightarrow M^{+\bullet} + e^-$	if $IE^a (M) < 10 \text{ eV}$	(1)
$M^{+\bullet} + X^c$	$\rightarrow M + X^{+\bullet}$	if $IE (X) < IE (M)$	(2)
$M^{+\bullet} + S$ (solvent)	$\rightarrow [M + H]^+ + [S - H]^{\bullet}$	if $PA^b (M) > PA ([S - H]^{\bullet})$	(3)
D (dopant) + 10 eV (photons)	$\rightarrow D^{+\bullet} + e^-$	if $IE (D) < 10 \text{ eV}$	(4)
$D^{+\bullet} + nS$ (solvent)	$\rightarrow [D - H]^{\bullet} + [S_n + H]^+$	if $PA (S_n) > PA ([D - H]^{\bullet})$	(5)
$[S_n + H]^+ + M$	$\rightarrow [M]^+ + nS$	if $PA (M) > PA (S_n)$	(6)
$D^{+\bullet} + M$	$\rightarrow M^{+\bullet} + D$	if $IE (M^{+\bullet}) < IE (D)$	(7)
$D^{+\bullet} + S$	$\rightarrow$ no proton transfer	if $PA (S) < PA ([D - H]^{\bullet})$	(8)
$D^{+\bullet} + M$	$\rightarrow [D - H]^{\bullet} + [M + H]^+$	if $PA (M) > PA ([D - H]^{\bullet})$	(9)

<sup>a</sup> $IE$  corresponds to the ionization energy; <sup>b</sup> $PA$  corresponds to the proton affinity; <sup>c</sup> $X = H, Cl$  or  $NO_2$

The dopant radical cation,  $D^{+\bullet}$ , may then exchange charge or proton with the analyte if the conditions of ionization energy and proton affinity are fulfilled [Equations (7) and (9)]. The dopant radical cation may also react by proton transfer with solvent clusters if the proton affinity of the cluster is higher than that of the  $[D - H]^{\bullet}$  species. The protonated solvent cluster interacting with a molecule of analyte can further lead to the protonated molecule of interest [Equations (5) and (6)].<sup>7</sup>

The ionization process in negative ion APPI is thought to be initiated by low-energy electrons released in the photoionization of the dopant [Equation (1)], as seen in Table 2. The low energy electrons may be captured by species, such as analytes, solvents or gases that possess positive electron affinities [Equations (2), (3) and (7)]. Then, the resulting ions can react further with other species, either by proton transfer [Equations (4) and (5)] or by electron transfer [Equations (8) and (9)].<sup>8</sup>

In some cases, the fragmentations observed in the APPI source are accompanied by the formation of unusual fragment ions which are different from collision-induced dissociation (CID) of protonated or deprotonated molecules. Study of oligonucleotides allows us to further investigate the APPI mechanisms for this important family of molecules in both positive- and negative-ion mode, in particular those leading to radical (odd-electron) ion species.

Table 2. The reactions in negative ion APPI.<sup>8</sup>

D + hv	$\rightarrow D^{+\bullet} + e^-$		(1)
S + e <sup>-</sup>	$\rightarrow S^-$		(2)
O <sub>2</sub> + e <sup>-</sup>	$\rightarrow O_2^-$		(3)
M + O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	$\rightarrow [M - H]^- + HO_2^{\bullet}$	if $\Delta_{acid}G^c (M) < \Delta_{acid}G (HO_2^{\bullet})$	(4)
S + O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	$\rightarrow [S - H]^- + HO_2^{\bullet}$	if $\Delta_{acid}G (S) < \Delta_{acid}G (HO_2^{\bullet})$	(5)
M + [S - H] <sup>-</sup>	$\rightarrow M - H^- + S$	if $\Delta_{acid}G (M) < \Delta_{acid}G (S)$	(6)
M + e <sup>-</sup>	$\rightarrow M^{\bullet}$	if $EA^d (M) > 0 \text{ eV}$	(7)
M + O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	$\rightarrow M^{\bullet} + O_2$	if $EA (M) > EA (O_2) = 0.451 \text{ eV}$	(8)
M + O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	$\rightarrow [M - X + O]^- + OX^{\bullet}, X = H, Cl, NO_2$		(9)

<sup>c</sup> $\Delta_{acid}G$  corresponds to the gas phase acidity; <sup>d</sup> $EA$  corresponds to the electron affinity

## Experimental section

### Chemical and compounds

All solvents were HPLC grade. Methanol was purchased from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Water used was bi-distilled and filtered on Millipore cartridges (18 MΩ). Toluene 99.5% (from SDS, Peypin, France) was used as dopant and introduced at various flow rates using a Harvard syringe pump model 22 (Harvard, Holliston, MA, USA).

The deoxyribonucleotides, dTA and dTAG, were synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium). The sample was dissolved in a mixture of H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH (10:90, v/v).

### Mass spectrometry

Photoionization experiments were carried out using the photospray source (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). This source was fitted with a Cathodeon PKS 106 Krypton lamp (Cathodeon, Cambridge, UK) which generates a continuous flow of mainly 10 eV photons with a minor contribution of 10.6 eV photons. Mass spectra were recorded using a hybrid quadrupole-time-of-flight Qstar Pulsar *i* mass spectrometer (Applied Biosystems). Stock solutions of compounds were prepared in a mixture of H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH (10:90, v/v) solution at a concentration of 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

The samples were injected by the flow-injection analysis (FIA) method: 20 μL of the sample solutions were loaded into an injection loop and next eluted with a mixture H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH

(10:90, v/v). The solvent was introduced into the photospray ionization source using a HPLC pump Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Palo alto, CA, USA) at a flow rate of  $200\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$ . The nebulizer gas was dry air.

Mass spectrometric instrumental parameters were adjusted in order to obtain the best signal-to-noise ratio. Operating parameters for the experiments were: ISV (ion source voltage) = 1800V, declustering potential 1 ( $\text{DP}_1$ ) = 20V, focusing potential (FP) = 100V, declustering potential 2 ( $\text{DP}_2$ ) = 15V.

The gas flow which protects the lamp was fixed to  $2\ \text{L}\ \text{min}^{-1}$ . The lamp gas, which is nitrogen, produces a curtain gas to protect the window of the UV lamp against pollution from the spray. Data were acquired using the Analyst QS software (Applied Biosystems). The temperature inside the ion source was  $350^\circ\text{C}$  for dinucleotides and  $400^\circ\text{C}$  for trideoxyribonucleotides.

## Results

### Positive APPI of oligodeoxyribonucleotides

#### Case of d(TA)

Figure 1 displays the APPI mass spectrum of dTA in  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$  (10:90, v/v) at  $350^\circ\text{C}$  with  $10\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$  of toluene (dopant) admitted in the ion source. A weak signal corresponding to the protonated molecules ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) is observed at  $m/z$  556 along with numerous and abundant fragment ions. These fragments may be categorized into four groups. First, two peaks at  $m/z$  448 and  $m/z$  430 may be assigned to  $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}-\text{TH}]^+$  and  $[\text{M}+\text{H}-\text{TH}]^+$ , respectively (T stands

for Thymine and A for Adenine in the following text). Second, the protonated bases appear at  $m/z$  136 and  $m/z$  127 with an unexpected ion peak at  $m/z$  134. Third, the  $m/z$  region between 210 and 340 shows ions arising from dissociations of the phosphodiester backbone. In the fourth category, two peaks are found at  $m/z$  176 and  $m/z$  162, which are labeled by a star in Figure 1.

Formation of the  $[\text{M}+\text{H}]^+$  species arises from protonation of the neutral molecule by proton transfer either from toluene or solvent clusters.<sup>6,9</sup> It has been shown that this protonation reaction may often be exothermic enough to induce extensive in source fragmentations.<sup>10-12</sup> Protonated bases  $\text{AH}_2^+$  and  $\text{TH}_2^+$  at  $m/z$  136 and  $m/z$  127 originate from protonation at the nucleobases, which correspond to the molecular moieties of highest proton affinities. However, as seen in Figure 1, the  $m/z$  136 peak assigned to  $\text{AH}_2^+$  is accompanied by a peak at  $m/z$  134 corresponding to  $[\text{AH}-\text{H}]^+$ . To our knowledge, such a fragment ion has not been reported previously. A possible origin for this ion could be the loss of  $\text{H}^\bullet$  from the radical nucleobase  $\text{AH}^\bullet$ . The observation of this ion could reveal the occurrence of radical reactions promoted by the ionization of the dopant in APPI [Equations (4) and (7) of Table 1], followed by a homolytic cleavage of the base-ribose bond. Although the mechanism for neutral base loss from the protonated molecule to form the  $[\text{M}+\text{H}-\text{TH}]^+$  ion is well described in the literature<sup>13,14</sup> and consistent with the classical protonation reaction from the dopant in APPI, the origin of the  $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}-\text{TH}]^+$  ion is less clear. However, since APPI takes place at atmospheric pressure in the presence of the solvent,

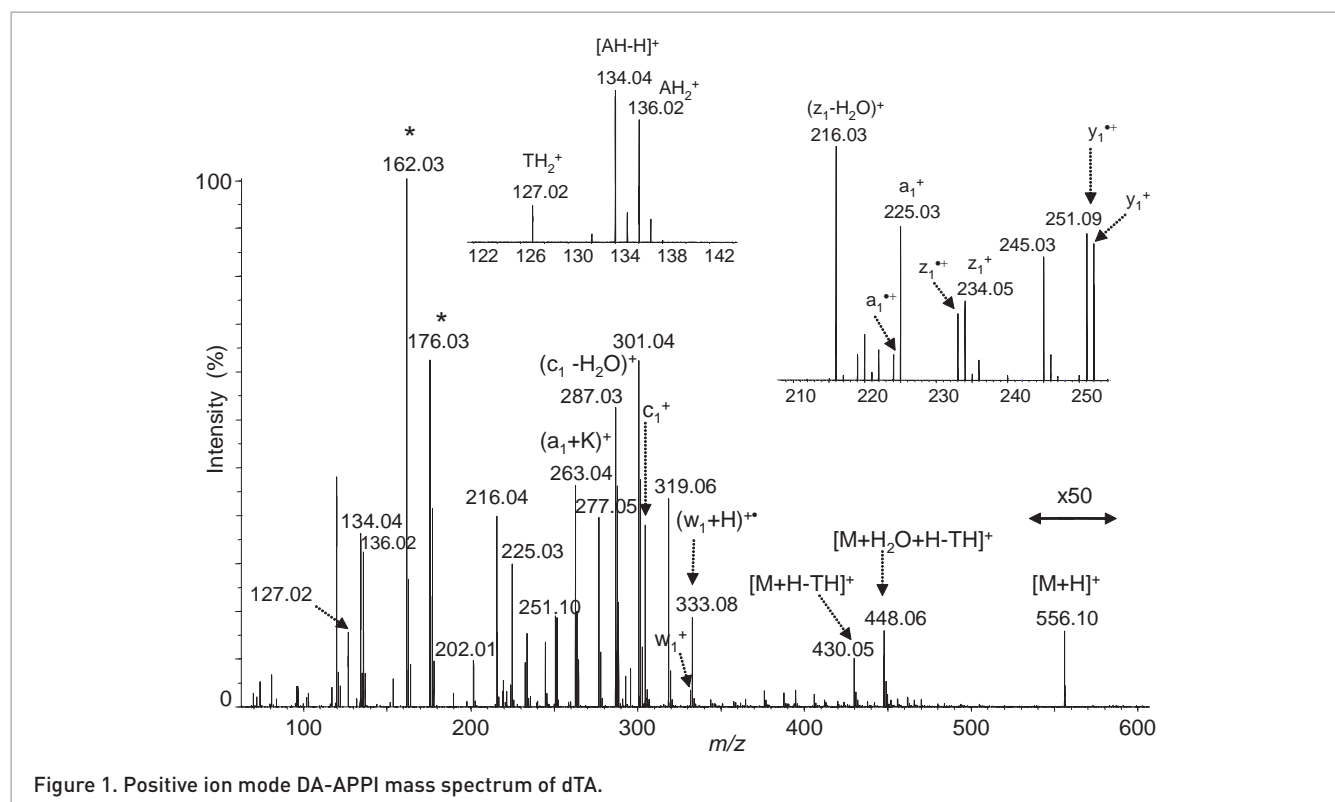
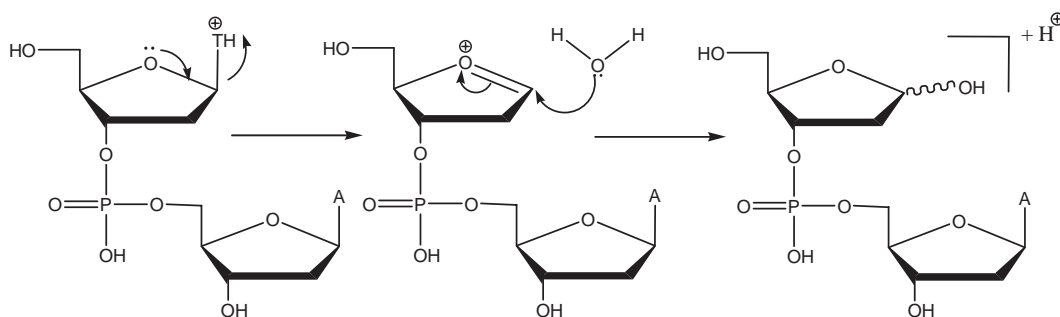


Figure 1. Positive ion mode DA-APPI mass spectrum of dTA.



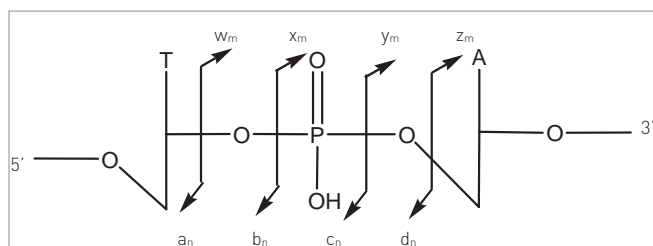
Scheme 1. Proposed mechanism for the formation of the  $[M+H_2O+H-TH]^+$  ion.

ion-molecule reactions are possible and could account for this ion. Hence, we tentatively explain the formation of this ion by a substitution reaction of a solvent molecule (water) on the sugar moiety as can be seen from the proposed mechanism in Scheme 1. Similar "glycosylation-type" reactions have been previously reported under fast-atom bombardment (FAB) conditions which involve analyte-solvent interactions in the gas phase.<sup>15</sup>

McLuckey *et al.*<sup>16</sup> proposed a nomenclature scheme to describe the fragmentation patterns of oligonucleotides in analogy to that widely used for peptides, as can be seen in Scheme 2. In the  $m/z$  range 210–340, characteristic fragment ions are observed, namely  $w_1^+$ ,  $[w_1+H]^+$ ,  $c_1^+$ ,  $[c_1-H_2O]^+$ ,  $y_1^+$ ,  $z_1^+$ ,  $a_1^+$  and  $[z_1-H_2O]^+$  ions. In the present work, the even electron fragment ions are denoted by the letters  $a_n^+$ ,  $b_n^+$ , etc... whereas their corresponding fragment ions which have lost a hydrogen atom,  $H^+$ , are referred to as  $a_n^{*+}$ ,  $b_n^{*+}$ , following Håkansson *et al.*<sup>17</sup>

Careful scrutiny of the  $m/z$  210–250 spectral domain, shown at the inset in Figure 1, reveals conspicuous features. Indeed, the  $a_1^+$ ,  $z_1^+$  and  $y_1^+$  fragments are accompanied by ions shifted one  $m/z$  unit less and labeled  $a_1^{*+}$ ,  $z_1^{*+}$  and  $y_1^{*+}$ . Håkansson *et al.*<sup>17</sup> have reported the formation of  $a^{*+}$  and  $z^{*+}$  fragments associated with even electrons  $w$ - and  $d$ - ions under electron capture dissociation (ECD) of doubly protonated tetra- to hepta-deoxynucleotides. It is worth noting that the present observation of the  $y^{*+}$  ion is new.

The two very intense ion peaks at  $m/z$  162 and 176 deserve particular attention. These two ions, labeled by a star in



Scheme 2. Oligonucleotides fragment-ion nomenclature proposed by McLuckey *et al.*<sup>16</sup>

Figure 1, do not correspond to any described oligonucleotide fragments. Considering that those species are even-electron ions, they should contain one (three or five) nitrogen atom(s) of the nucleic bases. By looking to the MS/MS spectrum of the  $m/z$  162 precursor ion [Figure 2(a)] the loss of a ketene group

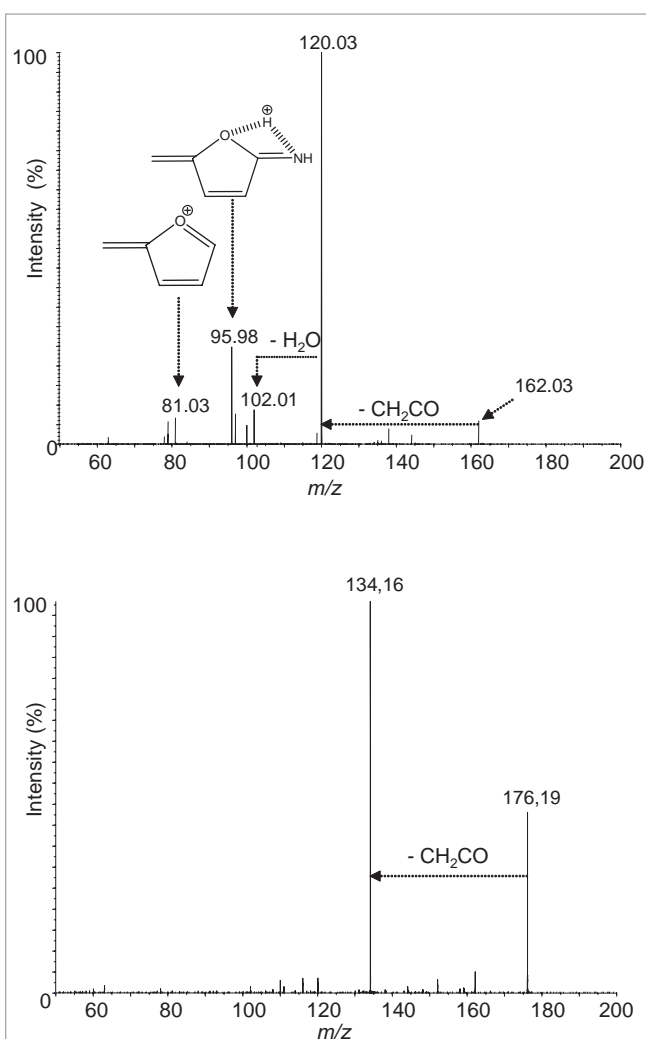
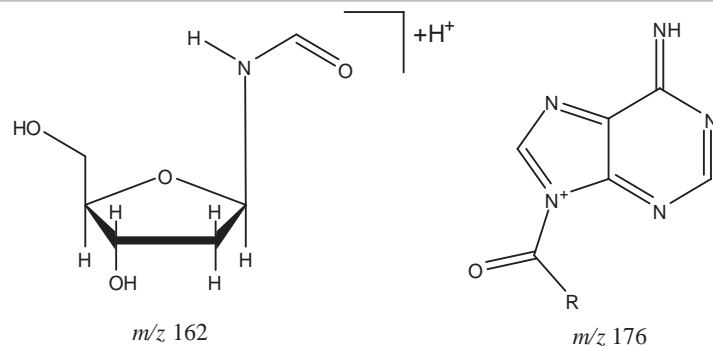


Figure 2. CID mass spectra of the  $m/z$  162 and 176 precursor ions arising from APPI of dTA in the positive ion mode.

Scheme 3. Putative structures of the  $m/z$  162 and 176 ions.

followed by that of a water molecule and ion peaks at  $m/z$  96 and 81, which can easily be attributed to deoxyribose fragmentations, suggest the structure shown in Scheme 3. In contrast, the MS/MS spectrum of the precursor ion at  $m/z$  176 did not show any signal characteristic of the sugar ring nor consecutive loss of water from the prominent  $m/z$  134 fragment ion. The latter ion corresponds to the direct loss of  $\text{CH}_2\text{CO}$  from the precursor ion which was then assigned the structure depicted

in Scheme 3. As far as we know, these two ions have not been described so far.

### Case of d(TAG)

Figure 3 shows the APPI mass spectrum of dTAG in  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$  (10:90, v/v) at  $400^\circ\text{C}$  with  $10\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$  of toluene (dopant). Similarly with Figure 1, a weak  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ion peak is observed at  $m/z$  885.6. Intensive fragmentations of the

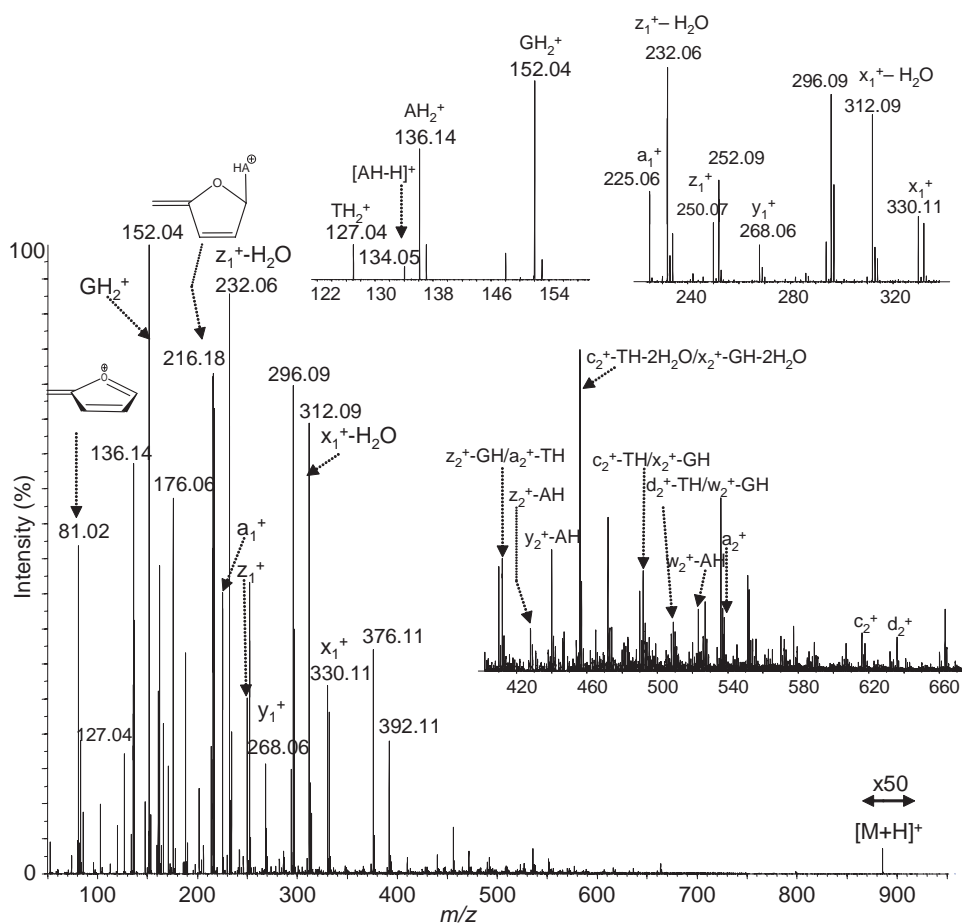


Figure 3. Positive ion mode DA-APPI mass spectrum of dTAG.

trideoxyribonucleotide are observed, involving protonated base losses, phosphodiester cleavages and both.

The three protonated nucleobases,  $\text{TH}_2^+$ ,  $\text{AH}_2^+$  and  $\text{GH}_2^+$ , are detected at  $m/z$  127, 136 and 152, respectively. The formation of protonated nucleobases is well described in the literature<sup>13</sup> from precursor ions protonated at the base site. As seen on the mass spectrum, the major peak is the protonated guanine. According to Phillips and McCloskey,<sup>18</sup> the protonated base ions arising from the 3'-residue are more abundant than those from the 5'-terminus. The low abundance of protonated thymine is attributed to the greater relative stability of the thymidine glycosidic bonds.<sup>19</sup> The second factor influencing gas-phase structure and reactivity is the relative proton affinities of the nucleobases. Moreover, the stable tautomeric structures of adenine and guanine make these bases better leaving groups when protonated.<sup>20,21</sup> The  $m/z$  134 peak assigned to  $[\text{AH}-\text{H}]^+$  is still observed as for dTA, although of lower abundance than in Figure 1.

The enlargement of the region between  $m/z$  220 and 330 shown in Figure 3 displays the following sequence ions:  $a_1^+$ ,  $(z_1-\text{H}_2\text{O})^+$ ,  $z_1^+$ ,  $y_1^+$ ,  $(x_1-\text{H}_2\text{O})^+$  and  $x_1^+$ . The x sequence ions were not observed previously with dTA (Figure 1). As for the dinucleotide, consecutive water losses are favored for most of the sequence specific ions. Interestingly, none of the radical fragment ions detected in this mass range, in Figure 1, are observed for dTAG. This observation is in agreement with the work of Håkansson *et al.*, reporting that the fragmentation of oligonucleotides depends on their sequence.<sup>17</sup> Hence, addition of guanine produces a/b/c/d and w/x/y/z fragments but not the radical complementary ions that were seen for dTA.

Finally, in the region between  $m/z$  400 and 660, the series of sequence-specific fragment ions is almost complete. Indeed,

the  $a_2^+/c_2^+/d_2^+$  ions are observed together with their complementary ions which have lost their 5' base.

## Negative-ion mode APPI of oligodeoxyribonucleotides

### Case of dTA

Figure 4 displays the APPI mass spectrum of dTA in  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$  (10:90, v/v) at  $350^\circ\text{C}$  with  $1\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$  of toluene. The deprotonated molecule appears at  $m/z$  554 along with numerous fragment ions. Similarly to the positive-ion mode, the loss of the neutral thymine from the pseudo-molecular ion is observed at  $m/z$  428. The deprotonated bases  $\text{T}^-$  and  $\text{A}^-$  are also observed at  $m/z$  125 and 134, respectively. The spectral region ranging from  $m/z$  190 to 350 contains fragment ions formed upon dissociation of the phosphodiester group. Similar backbone dissociations as for the positive-ion mode (Figure 1) are observed, leading to  $c_1^-$  (very intense ion peak at  $m/z$  303) and  $z_1^-$  ( $m/z$  232). The radical  $z_1^{\bullet-}$  and  $b_1^{\bullet-}$  ions are also detected in the mass spectrum (see the inset of the Figure). In addition,  $d_1^-$  and  $b_1^-$  fragment ions, absent from the positive-ion mode, are now detected. This is not surprising, since both ions possess terminal oxygen, which can easily retain the negative charge. The ion peak at  $m/z$  199 could be assigned to  $(c_1+\text{Na}-\text{TH}-\text{H})^-$  or  $(x_1+\text{Na}-\text{AH}-\text{H})^-$  ions. It is worth noting that the  $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$  is not detected in the mass spectrum. Since the loss of TH from the deprotonated molecule is observed at  $m/z$  428 ( $[\text{M}-\text{TH}-\text{H}]^-$ ) and not the loss of AH, the  $(c_1+\text{Na}-\text{TH}-\text{H})^-$  ion is more likely to be formed than the  $(x_1+\text{Na}-\text{AH}-\text{H})^-$  ion. The base peak of the mass spectrum is located at  $m/z$  160. It corresponds to the deprotonated species of the  $m/z$  162 ion detected previously in the positive-ion mode (Scheme 3).

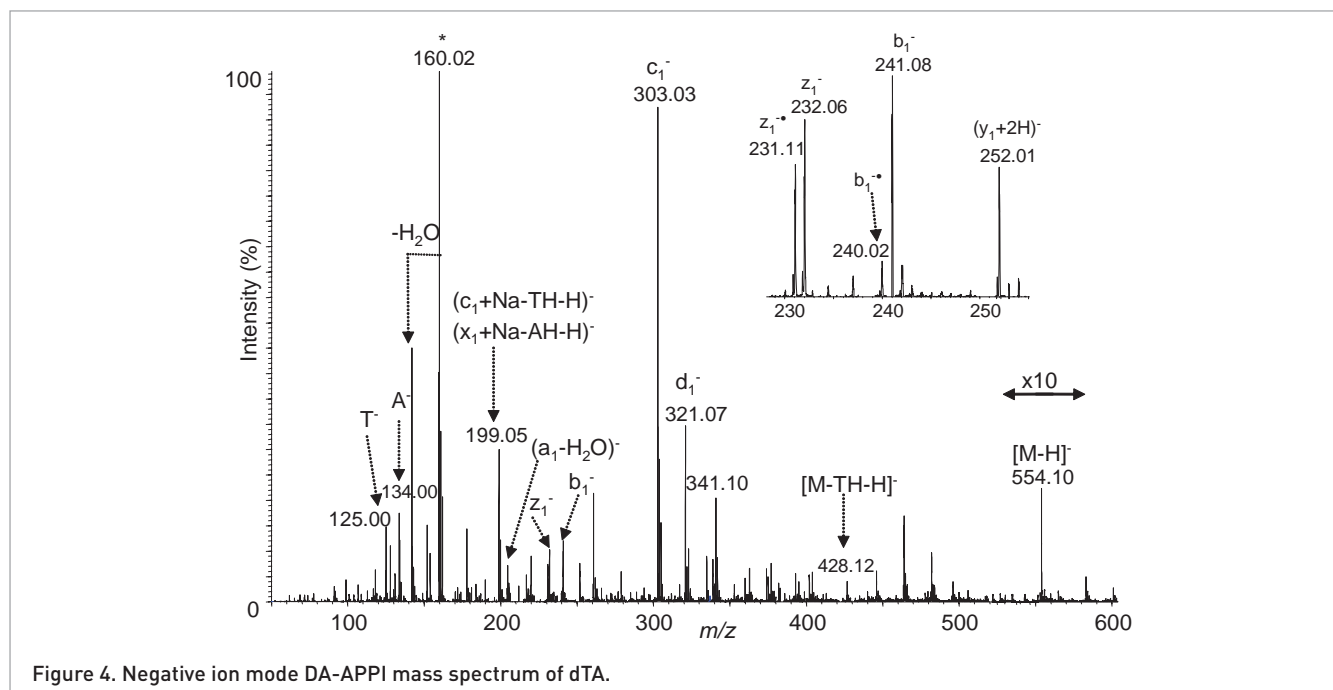


Figure 4. Negative ion mode DA-APPI mass spectrum of dTA.

### Case of dTAG

Figure 5 shows the negative APPI mass spectrum of dTAG recorded in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH (10:90, v/v) at 400°C with 1 μL min<sup>-1</sup> of toluene (dopant). Parallel to the case of dTA, a weak [M-H]<sup>-</sup> ion peak is observed. The fragmentations of the deprotonated molecule show the following trends. The most important decomposition step involves the loss of charged bases. Indeed, deprotonated bases, T<sup>-</sup>, A<sup>-</sup> and G<sup>-</sup>, are observed at *m/z* 125, 134 and 150, respectively. The relative intensities of these peaks may be attributed to the relative stabilities of the corresponding anions, which are in turn related to the gas-phase acidities of the bases. A relative order for the acidities of the bases, adenine > thymine > guanine > cytosine, was established by Rodgers and co-workers.<sup>22</sup> The relative intensities of the deprotonated nucleobases observed on the mass spectrum in Figure 5 are in agreement with this ordering.

The other interesting ions were observed at *m/z* 205 and 214 and were assigned to nucleosides twice dehydrated. Similar fragments have previously been reported, although in the positive-ion mode under CID conditions, by Phillips *et al.*<sup>18</sup> in FAB and Wang *et al.*<sup>23</sup> in electrospray ionization (ESI).

The spectral region ranging from *m/z* 220 to *m/z* 500 contains characteristic fragments. In addition to the backbone fragments similar to those obtained in positive-ion mode, the b<sub>1</sub><sup>-</sup> ion is now detected (*m/z* 241). This behavior is similar to that of the dinucleotide. Meanwhile, in opposition to the positive-ion mode, we detect extensive and abundant frag-

mentations into a<sub>2</sub><sup>-</sup> and c<sub>2</sub><sup>-</sup>, deprived of their middle base (adenine). In the region *m/z* 500–900, z<sub>2</sub><sup>-</sup>, [z<sub>2</sub>+Na-H]<sup>-</sup>, w<sub>2</sub><sup>-</sup> and [w<sub>2</sub>+Na-H]<sup>-</sup> ions are seen. A weak signal arising from loss of 80 mass units from [M-H]<sup>-</sup>, which could correspond to a HPO<sub>3</sub> molecule, is also observed.

In the present study, a dideoxynucleotide and a trideoxynucleotide have been studied under DA-APPI conditions. It is worth noting that when the UV lamp is switched off, no signal ion can be measured. This is unfortunate, since comparison of mass spectra obtained without UV irradiation (i.e. in thermospray ionization) to those recorded in APPI usually reveals especially useful information in the identification of the ionization and fragmentation mechanisms.<sup>10</sup> Nevertheless, a few points can be discussed. Hence, it appears from the present study, that under APPI conditions, base and water losses are significant and observed from the protonated molecule and also from several fragment ions. CID and infrared multiphoton dissociation (IRMPD) of oligonucleotides are known to produce extensive base and water losses.<sup>13,17</sup> The case for ECD is less clear since, in some cases, these reactions are not observed<sup>17</sup> whereas in some other cases they are present<sup>24</sup> and seem to depend on the experimental conditions. The observed base and water losses reported in this study could be partly due to thermal activation of the oligonucleotides in source. Hence, it is reasonable to suppose that partial activation and fragmentation in APPI is gained from heating, to which oligonucleotides appear sensitive.

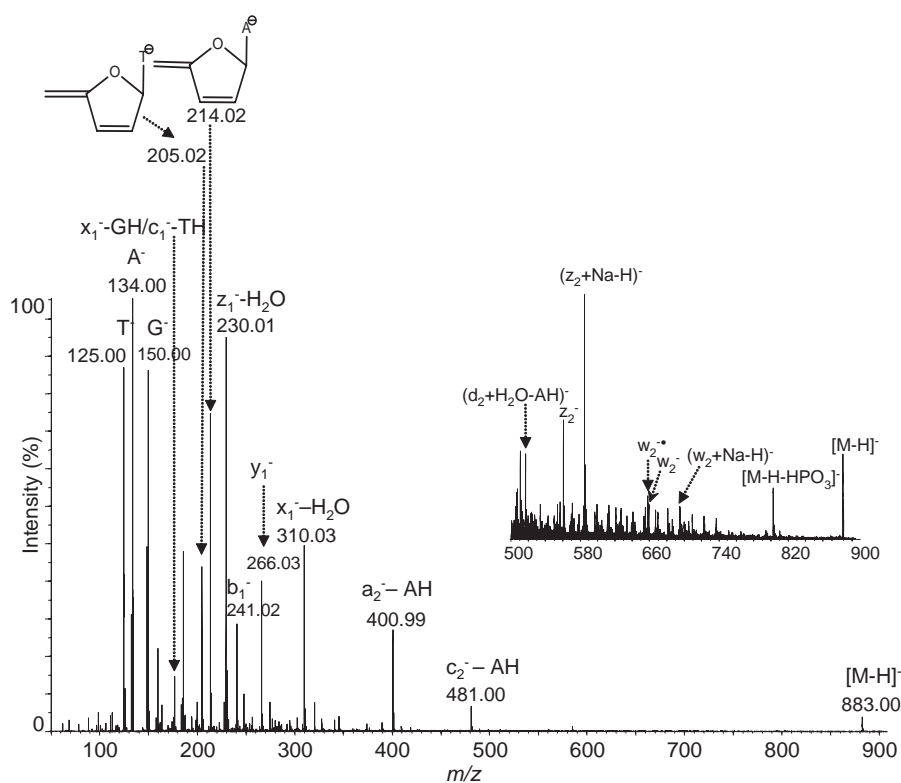


Figure 5. Negative ion mode DA-APPI mass spectrum of dTAG.



Under CID in both polarity modes, the most abundant fragments have been reported to be the protonated or deprotonated nucleobases, accompanied by neutral base losses from the pseudo-molecular ions.<sup>16</sup> IRMPD in the positive-ion mode has been shown to give very similar fragmentation patterns.<sup>17</sup> In the APPI positive-ion mode, it has been shown that the protonation reaction may often be exothermic enough to lead to extensive in source fragmentations.<sup>10</sup> Hence, in addition to possible thermal activation, exothermic proton transfer reactions from the dopant or solvent clusters should be considered to account for the formation of the protonated bases, since their relative intensities follow the proton affinity scale of the bases.

For dTA and in both ion modes, the most abundant fragment ions have been assigned to partially decomposed thymidine ions (Figures 1 and 4), such ions being reported here for the first time. We also report radical fragment ions, which have only been detected previously under ECD conditions, namely  $a^{\bullet}$ ,  $y^{\bullet}$  and  $z^{\bullet}$ . It appears clearly from these results that several fragmentations, especially in the positive-ion mode, cannot be ascribed to only protonation reactions or thermal activation of the analytes. This leads us logically to consider possible the participation of radical precursor ions in these mechanisms. In APPI, photoionization of the dopant releases in the medium low energy photoelectrons and their possible reactions is a matter of concern. Photoelectrons are known to be largely responsible for ionization in the negative mode in APPI, for example photoelectrons capture from neutral molecules is known to produce the  $[M-H]^{-}$  species.<sup>8</sup> Especially, previous studies<sup>25,26</sup> have demonstrated that an ECD/ETD-type of mechanism occurs for peptides under APPI conditions. Consequently, capture of photoelectrons by the oligonucleotides could be postulated to be at the origin of the ECD-like fragments observed here.

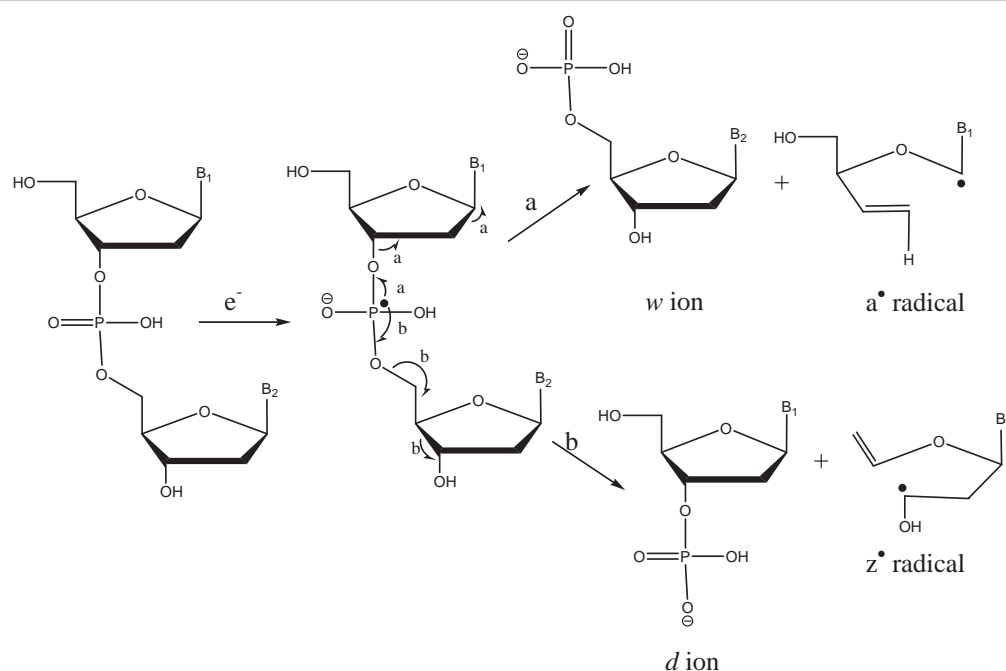
However, the sequence of the events is not clear. Several species, such as the radical  $a^{\bullet}$  and  $z^{\bullet}$  ions for instance, have been described in the literature as arising from electron capture from doubly protonated oligonucleotides.<sup>17</sup> Observation of these fragments requires a doubly protonated precursor in the positive-ion mode. In the present case, no doubly protonated molecule was observed in the positive-ion mode. It appears very unlikely that the doubly protonated species would be formed and react immediately and totally with the photoelectrons to escape detection. A possible zwitterionic form of the oligonucleotides, in which the global charge remains +1 where two nucleobases are protonated and a phosphate group is deprotonated, could be envisaged as a possible precursor for these radical fragments. Håkansson *et al.* have reported the occurrence of doubly charged fragments from doubly protonated tetra- to heptanucleotides submitted to ECD conditions. The authors have interpreted their results as betraying the presence of zwitterionic species. For dTA, a zwitterionic ion would correspond to the protonation of the two adjacent bases. Such a large amount of charge on a small molecule seems unlikely considering, in particular, the low proton affinity of thymine. Another possible mechanism would

involve electron capture by the singly protonated molecule which would lead to neutral ECD-type fragments. Those, in turn, would later become ionized by the classical APPI reactions [Equations (6), (7) and (9) of Table 1]. This mechanism would involve protonation of the oligonucleotide molecule, electron capture and dissociation followed by another protonation/charge transfer step to yield the observed fragment ions. Such a sequence of events makes this mechanism less probable. Another tentative but more plausible mechanism would imply electron capture by the neutral molecule. The propensity to form both negative and positive species in the APPI ion source has been noticed recently<sup>27</sup> and supports this suggestion. Hence, electron capture by a neutral species would produce both the anionic fragments and their neutral counterparts. The latter could then get ionized through charge transfer or proton transfer with the dopant. Moreover, this mechanism has the advantage of accounting for the fragmentations observed in both ion modes. Additional support for this suggestion comes from the comparison of Figures 1 and 4. The  $c_1^{-}$  and  $d_1^{-}$  ions are observed (in the negative-ion mode) at Figure 4 whereas the radical  $y_1^{\bullet}$  and  $z_1^{\bullet}$  ions, which are complementary to  $c_1^{-}$  and  $d_1^{-}$ , are seen (in the positive-ion mode) at Figure 1. Hence, electron attachment to the molecule would produce a transient negative ion with a short lifetime, which is not observed. This negative  $M^{\bullet-}$  ion would evolve by rapid dissociation to form the  $[M-H]^{-}$  ion or even electron sequence specific ions with their radical counterparts.

Different DNA strand-breaking mechanisms have been described in the literature.<sup>32,33</sup> Briefly, two models have been proposed to account for DNA single strand breaks. On the one hand, Li *et al.*<sup>32</sup> have suggested that low-energy electrons may be captured first by phosphate, forming a phosphate-centered radical anion. On the other hand, Zheng *et al.*<sup>34</sup> proposed that strand breaks could be initiated by electron attachment to the bases followed by a charge transfer to the phosphate group. Nevertheless, in both mechanisms, the phosphodiester group ends up with the electron, which triggers the strand break. Our results are in full agreement with this hypothesis, as summarized at Scheme 4.

## Conclusion

We report here a study of a di- and a trioxynucleotide, dTA and dTAG, under DA-APPI conditions in both positive- and negative-ion modes. Extensive fragmentations are observed in all cases and arise from three identified activation mechanisms: thermal activation from heating, exothermic protonation reaction and electron capture. Several fragment ions are reported for the first time. Indeed, a series of even-electron  $d/w$  ions are present in the spectra but we also detect numerous  $a/z$  (both even-electron and radical species),  $(a/z-B)$ ,  $c/x$ ,  $c-B$  and  $d/w$  ions with minimal nucleobase loss from the precursor ions. The presence of numerous sequence-specific product ions is similar to the behavior of DNA under ECD conditions.<sup>35</sup> Analysis of the ECD-type



Scheme 4. DNA strand break mechanisms caused by electron capture, from Reference 30.

fragments observed for dTA led us to suggest that, for this class of compound, electron capture from the neutral molecule to produce a transient radical ion is at the origin of these fragmentation pathways. The conditions of DA-APPI seem to be relevant for the study of radiation damage to biological molecules and allow us to suggest a DNA strand break mechanism triggered by electron capture.

## References

1. L. Song, A.D. Wellman, H. Yao and J. Adcock, "Electron capture atmospheric pressure photoionization mass spectrometry: analysis of fullerenes, perfluorinated compounds, and pentafluorobenzyl derivatives", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 1343 (2007). doi: [10.1002/rcm.2963](https://doi.org/10.1002/rcm.2963)
2. S.J. Bos, S.M. van Leeuwen and U. Karst, "From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry", *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 85 (2006). doi: [10.1007/s00216-005-0046-1](https://doi.org/10.1007/s00216-005-0046-1)
3. S.S. Cai and J.A. Syage, "Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry for analysis of fatty acid and acylglycerol lipids", *J. Chromatogr. A* **1110**, 15 (2006). doi: [10.1016/j.chroma.2006.01.050](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.050)
4. J.M. Purcell, C.L. Hendrickson, R.P. Rodgers and A.G. Marshall, "Atmospheric pressure photoionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for complex mixture analysis", *Anal. Chem.* **78**, 5906 (2006). doi: [10.1021/ac060754h](https://doi.org/10.1021/ac060754h)
5. J. Berkowitz, *Photoabsorption, photoionization and photoelectron spectroscopy*. Academic Press, New York, USA, pp. 93–150 (1979).
6. J.A. Syage, "Mechanism of  $[M+H]^+$  formation in photoionization mass spectrometry", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1521 (2004). doi: [10.1016/j.jasms.2004.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.07.006)
7. T.J. Kauppila, T. Kuuranne, E.C. Meurer, M.N. Eberlin, T. Kotiaho and R. Kostianen, "Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Ionization mechanism and the effect of solvent on the ionization of naphthalenes", *Anal. Chem.* **74**, 5470 (2002). doi: [10.1021/ac025659x](https://doi.org/10.1021/ac025659x)
8. T.J. Kauppila, T. Kotiaho, R. Kostianen and A.P. Bruins, "Negative ion-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 203 (2004). doi: [10.1016/j.jasms.2003.10.012](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.10.012)
9. L.C. Short, S.S. Cai and J.A. Syage, "APPI-MS: Effects of mobile phases and VUV lamps on the detection of PAH compounds", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 589 (2007). doi: [10.1016/j.jasms.2006.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.11.004)
10. A. Bagag, A. Giuliani and O. Lapr vate, "Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of nucleic bases, ribonucleosides and ribonucleotides", *Int. J. Mass Spectrom.* **264**, 1 (2007). doi: [10.1016/j.ijms.2007.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ijms.2007.03.010)
11. A. Giuliani, D. Debois and O. Lapr vate, "Study of a bis-quaternary ammonium salt by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry", *Eur. J. Mass Spectrom.* **12**, 189 (2006). doi: [10.1255/ejms.803](https://doi.org/10.1255/ejms.803)
12. A. Delobel, S. Roy, D. Touboul, K. Gaudin, D.P. Germain, A. Baillet, F. Brion, P. Prognon, P. Chaminade and O.

- Laprévôte, "Atmospheric pressure photoionization coupled to porous graphitic carbon liquid chromatography for the analysis of globotriaosylceramides. Application to Fabry disease", *J. Mass Spectrom.* **41**, 50 (2006). doi: [10.1002/jms.945](https://doi.org/10.1002/jms.945)
13. J. Wu and S.A. McLuckey, "Gas-phase fragmentation of oligonucleotide ions", *Int. J. Mass Spectrom.* **237**, 197 (2004). doi:[10.1016/j.ijms.2004.06.014](https://doi.org/10.1016/j.ijms.2004.06.014)
14. A.K. Vrkic, R.A.J. O'Hair, S. Foote and G.E. Reid, "Fragmentation reactions of all 64 protonated trimer oligodeoxynucleotides and 16 mixed base tetramer oligodeoxynucleotides via tandem mass spectrometry in an ion trap", *Int. J. Mass. Spectrom.* **194**, 145 (2000). doi: [10.1016/S1387-3806\(99\)00150-5](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(99)00150-5)
15. O. Laprévôte, C. Girard, B.C. Das and R. Mukherjee, "Usefulness of fast-atom bombardment and collision-activated dissociation linked scan (I/E) mass spectrometry for structural investigation of indole alkaloids", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6**, 318 (1992). doi: [10.1002/rcm.1290060420](https://doi.org/10.1002/rcm.1290060420)
16. S.A. McLuckey, G.J. Van Berkel and G.L. Glish, "Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 60 (1992). doi: [10.1016/1044-0305\(92\)85019-G](https://doi.org/10.1016/1044-0305(92)85019-G)
17. K. Håkansson, R.R. Hudgins, A.G. Marshall and R.A.J. O'Hair, "Electron capture dissociation and infrared multiphoton dissociation of oligodeoxynucleotide dications", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 23 (2003). doi: [10.1016/S1044-0305\(02\)00708-0](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00708-0)
18. D.R. Phillips and J.A. McCloskey, "A comprehensive study of the low energy collision-induced dissociation of dinucleoside monophosphates", *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes* **128**, 61 (1993). doi: [10.1016/0168-1176\(93\)87016-L](https://doi.org/10.1016/0168-1176(93)87016-L)
19. M. Linscheid and A.L. Burlingame, "Collisionally activated dissociation of field desorbed protonated dinucleoside phosphates", *Org. Mass Spectrom.* **18**, 245 (1983) doi: [10.1002/oms.1210180605](https://doi.org/10.1002/oms.1210180605)
20. F. Greco, A. Liguori, G. Sindona and N. Uccella, "Gas phase proton affinity of deoxyribonucleosides and related nucleobases by fast atom bombardment tandem mass spectrometry", *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9092 (1990). doi: [10.1021/ja00181a009](https://doi.org/10.1021/ja00181a009)
21. J.E. Del Bene, "Molecular orbital study of the protonation of DNA bases", *J. Phys. Chem.* **87**, 367 (1983).
22. M.T. Rodgers, S. Campbell, E. Marzluff and J.L. Beauchamp, "Low energy collision-induced dissociation of deprotonated dinucleotides: determination of the energetically favored dissociation pathways and the relative acidities of the nucleic acid bases", *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes* **148**, 1 (1995). doi: [10.1016/0168-1176\(95\)04177-M](https://doi.org/10.1016/0168-1176(95)04177-M)
23. P.P. Wang, M.G. Bartlett and L.B. Martin, "Electrospray collision induced dissociation mass spectra of positively charged oligonucleotides", *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **11**, 846 (1997). doi: [10.1002/\(SICI\)1097-0231\(199705\)11:8<846::AID-RCM928>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(199705)11:8<846::AID-RCM928>3.0.CO;2-9)
24. K.N. Schultz and K. Håkansson, "Rapid electron capture dissociation of mass-selectively accumulated oligodeoxynucleotide dications", *Int. J. Mass. Spectrom.* **234**, 123 (2004). doi: [10.1016/j.ijms.2004.02.019](https://doi.org/10.1016/j.ijms.2004.02.019)
25. A. Delobel, F. Halgand, B. Laffranchisse-Gosse, H. Snijders and O. Laprévôte, "Characterization of hydrophobic peptides by atmospheric pressure photoionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry", *Anal. Chem.* **75**, 5961 (2003). doi: [10.1021/ac034532k](https://doi.org/10.1021/ac034532k)
26. D. Debois, A. Giuliani and O. Laprévôte, "Fragmentation induced in atmospheric pressure photoionization of peptides", *J. Mass Spectrom.* **41**, 1554 (2006). doi: [10.1002/jms.1122](https://doi.org/10.1002/jms.1122)
27. J.M. Purcell, C.L. Hendrickson, R.P. Rodgers and A.G. Marshall, "Atmospheric pressure photoionization proton transfer for complex organic mixtures investigated by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1682 (2007). doi: [10.1016/j.jasms.2007.07.001](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.07.001)
28. X. Li, M.D. Sevilla and L. Sanche, "Density functional theory studies of electron interaction with DNA: can zero eV electrons induce strand breaks?" *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13668 (2003). doi: [10.1021/ja036509m](https://doi.org/10.1021/ja036509m)
29. J. Berdys, I. Anusiewicz, P. Skurski and J. Simons, "Damage to model DNA fragments from very low-energy (<1 eV) electrons", *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6440 (2004). doi: [10.1021/ja049876m](https://doi.org/10.1021/ja049876m)
30. Y. Zheng, P. Cloutier, D.J. Hunting L. Sanche and J.R. Wagner, "Chemical basis of DNA sugar-phosphate cleavage by low-energy electrons", *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16592 (2005). doi: [10.1021/ja054129q](https://doi.org/10.1021/ja054129q)
31. J. Yang and K. Håkansson, "Fragmentation of oligoribonucleotides from gas-phase ion electron reactions", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1369 (2006). doi: [10.1016/j.jasms.2006.05.006](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.05.006)

## Note to Authors

In the text of your manuscript you mentioned References 32, 33, 34 and 35, but I could not find References 28, 29, 30 and 31. On looking at the list of references I noticed that they only went up to Reference 31 so I have renumbered them. I would be grateful if you could check that this is correct.

# ***ARTICLE 3***



## Rapid Communication

# Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of per-O-methylated oligosaccharides related to D-xylans

Aïcha Bagag<sup>a</sup>, Olivier Laprèvote<sup>a</sup>, Ján Hirsch<sup>b</sup>, Vladimír Kováčik<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 01 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, Cedex, France

<sup>b</sup>Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 January 2008

Received in revised form 29 April 2008

Accepted 25 May 2008

Available online 2 June 2008

## Keywords:

Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry (APPI) oligosaccharides of

D-xylan type

Fragmentation

Xylooligosaccharides

## ABSTRACT

Three D-xylan type per-O-methylated trisaccharides with various types of linkages between the D-xylopyranose units were examined by atmospheric pressure photoionization (APPI) mass spectrometry in the positive ion mode. The most interesting feature of a thermospray mass spectrum using the APPI source with UV lamp switched off, is the exclusive production of  $[M+Na]^+$  adduct ions.  $[M+Na]^+$  cationized ions are the most abundant species in the case of APPI mass spectrometry. The second ionization process has no analogy in the case of substances studied using APPI to date. This aspect involves the addition of a water molecule to the molecular ion of a per-O-methylated saccharide, giving rise to  $[M+H_2O]^+$  adduct ions. The  $[M+H_2O]^+$  species are readily detected at  $m/z$  544, and are clearly visible for all three isomers studied. The MS/MS spectrum of  $[M+Na]^+$  ions contains a base peak at  $m/z$  375, produced by a Y-type cleavage of the trisaccharide, along with a hydrogen rearrangement on the terminal interglycosidically linkage glycosidic oxygen atom. The  $[M+H_2O]^+$  species fragment largely give rise to ions at  $m/z$  175, 143 and, as a result, the  $m/z$  111 ion is unique to nonreducing terminal units.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

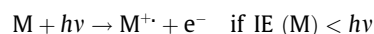
## 1. Introduction

APPI is a relatively recent ionization technique, which had considerable attention in the past few years from the analytical chemistry community. Initially restricted to small hydrophobic molecules, its use was then extended to larger, polar compounds.<sup>1–4</sup> To our knowledge, this technique has not been extended to the study of oligosaccharides.

D-Xylans and D-glucuronoxylans comprise branched polysaccharides with various branching points on the basic linear chain. Mass spectrometric analysis of saccharides has traditionally relied on GC–MS, after a preliminary hydrolysis step.<sup>5</sup> In addition, methylation analysis of O-methyl alditol acetates continue to provide basic information concerning the structure of poly- and oligosaccharides.<sup>5</sup> Electron ionization (EI) MS has been used since the early 1970s to analyze methylated mono- and oligosaccharides.<sup>6,7</sup> Chemical ionization (CI) also represents an interesting alternative method.<sup>8,9</sup> Fast atom bombardment mass spectrometry (FAB MS) has also been used at high collision energy.<sup>10</sup> More recently electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) combined with tandem mass spectrometry has been shown to provide valuable structural information, when applied under low-energy collision activation conditions.<sup>11–13</sup> Naturally occurring saccharides and saccharide conjugates com-

prise mixtures of several molecular species, in which the saccharide and aglycon parts of the molecules are different. Reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) thus represents a method of choice for reducing the complexity of the samples prior to their analysis by mass spectrometry. The development of APPI, which allows the use of organic solvents (even a non-polar solvent) offers some new possibilities for LC–MS. This method<sup>14–16</sup> has been successfully applied to the analysis of a variety of compounds including polyaromatic hydrocarbons,<sup>17</sup> flavonoids,<sup>18</sup> drugs and other biomolecules,<sup>19–21</sup> such as biological matrices or hydrophobic peptides.<sup>22</sup> The coupling of this method with liquid chromatography has also been shown to be efficient.

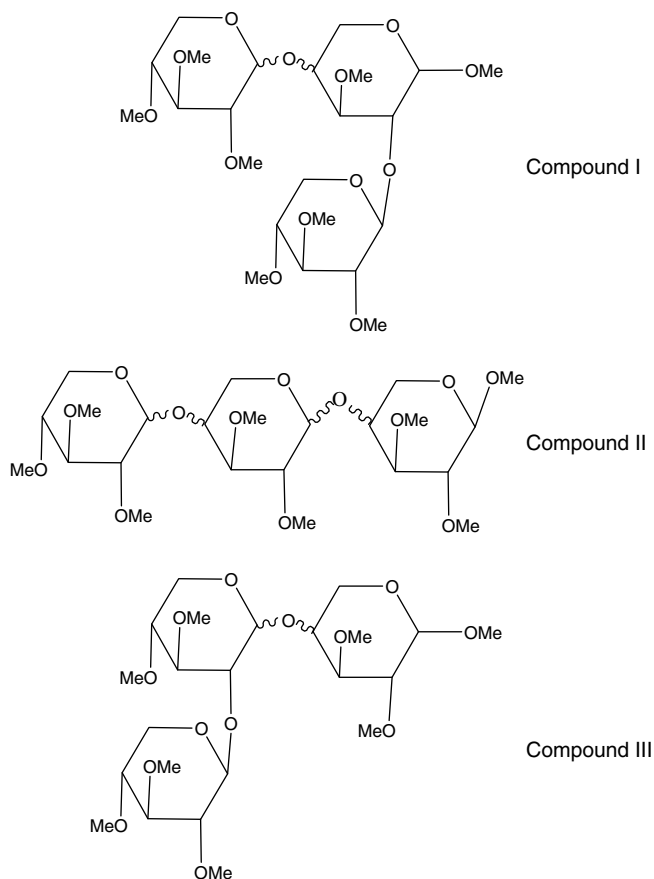
The ionization in APPI is based on the photoionization of particular species that have a lower ionization energy (IE) than the photon energy ( $h\nu$ ). A krypton discharge lamp is typically used for this purpose, which largely produces 10 eV photons. Photoionization is achieved in a modified heated nebulizer or other type of liquid spray nozzle. The basic mechanism<sup>23</sup> involves ionization of the analyte (M) according to the scheme below



However, the dominant ion observed by APPI is typically  $[M+H]^+$  or  $[M+Na]^+$ . This is at variance with typical gas phase photoionization experiments, which are performed in diluted media, and in which a the molecular ion  $M^+$  is generally detected.<sup>23,24</sup> The direct photoionization of the analyte is not very efficient due to the strong UV absorption by the nebulizing gases and by the

\* Corresponding author. Tel.: +421 2 5941 0292.

E-mail address: [chemvkov@savba.sk](mailto:chemvkov@savba.sk) (V. Kováčik).



Scheme 1.

solvent. For this reason, APPI sources are frequently operated in conjunction with a third molecule, which is usually referred to as

dopant (D), in order to enhance the ionization efficiencies.<sup>10</sup> In this case, ionization is based on a charge transfer to the analytes from dopant molecules (e.g., toluene) that have been ionized using 10 eV photons, which is higher than the ionization potentials (IPs) of typical target molecules, but lower than the IPs of virtually all of the constituents of air as well as most common solvents. Furthermore, because molecules of interest are ionized near their ionization thresholds, there is minimal fragmentation that typically results in a cluttered mass spectrum. These features provide tremendous benefits for analyzing mixtures and samples in complex matrices. The method of electron ionization, even when low energy (12 eV) electrons<sup>6,7</sup> are used, by contrast, imparts energy that greatly exceeds the dissociation thresholds, leading to extensive fragmentation.

APPI was used in this study to analyse some per-O-methylated oligosaccharides of the D-xylan type. The experiments were carried out in the positive ion mode. More detailed studies of the O-methylated oligosaccharides will be the subject of future. The structures of the three studied compounds are depicted in Scheme 1. Figure 1 shows the mass spectrum of compound I, obtained using the APPI source with the UV lamp switched off. (e.g., thermospray conditions). The conspicuous feature of this thermospray mass spectrum of isomeric compounds I–III is the exclusive production of  $[M+Na]^+$  adduct ions detected at  $m/z$  549 for all three isomers. These ions are also generated under matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) and electrospray (ESI) conditions.<sup>11–13</sup>  $[M+Na]^+$  cationized ions remain the most abundant species under APPI conditions. Figures 2–4 show APPI mass spectra of I–III recorded in the same conditions as before, but with the photoionization lamp switched on and with H<sub>2</sub>O/MeOH (50/50 v/v) as the solvent admitted into the ion source. The second observed ionization of molecules of analyte has no analogy in substances studied to date by APPI MS. It corresponds to the addition of a water molecule to the molecular ion of per-O-methylated saccharides, giving rise to  $[M+H_2O]^+$  adduct ionradicals. The  $[M+H_2O]^+$  species is detected at  $m/z$  544, and is clearly visible in all three isomers studied (see Figs. 2–4). As a rule the APPI mass spectra of the studied isomers show two peaks at  $m/z$  111 and 143. The only difference between

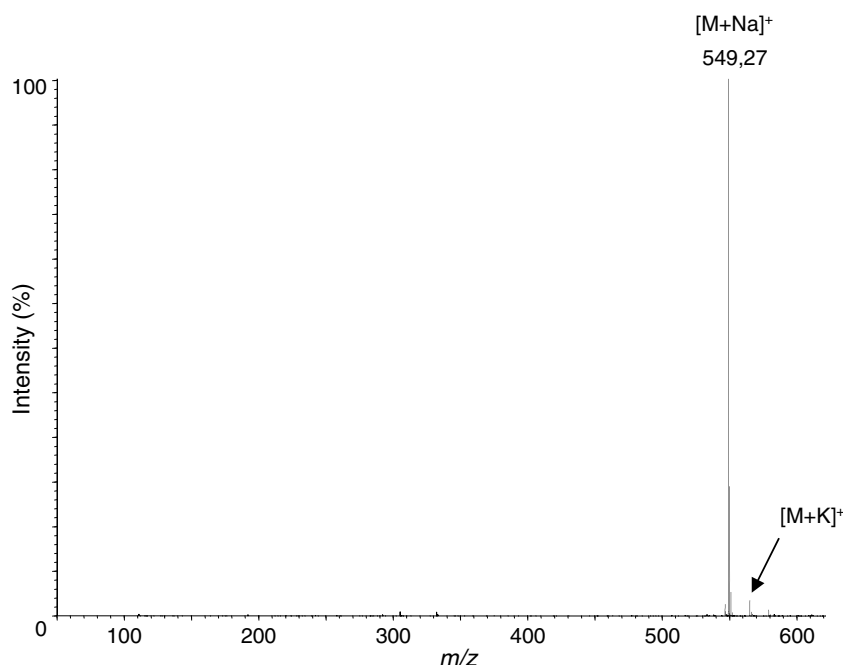


Figure 1. Thermospray mass spectrum of compound I.

the isomers is the relative abundance of these peaks. These results differ from data obtained in FAB experiments, in which the fragmentation of cationized saccharides involve the cleavage of the sugar ring.<sup>10,26</sup>

The fragmentation pathways of the two major quasimolecular ions, that is,  $[M+Na]^+$  and  $[M+H_2O]^+$  species, have been studied by tandem mass spectrometry. No major differences between three isomers studied can be seen. Because of this, only the spectrum of compound **I** is shown. The MS/MS spectrum of  $[M+Na]^+$  ions,

depicted as an example in Figure 5, contains a base peak at  $m/z$  375, which is produced by a Y-type cleavage<sup>25</sup> of the trisaccharide, and a hydrogen rearrangement on the terminal interglycosidically linkage glycosidic oxygen atom (Scheme 2). The shortage of numbers of units in oligosaccharides by the Y mode also occurs in the case of FAB, MALDI ToF/ToF and ESI MS/MS fragmentation techniques.<sup>6,9</sup> However, as can be seen in Figure 6, the  $[M+H_2O]^+$  species fragment largely generates ions at  $m/z$  175, 143 and consequently  $m/z$  111. The latter originates from nonreducing

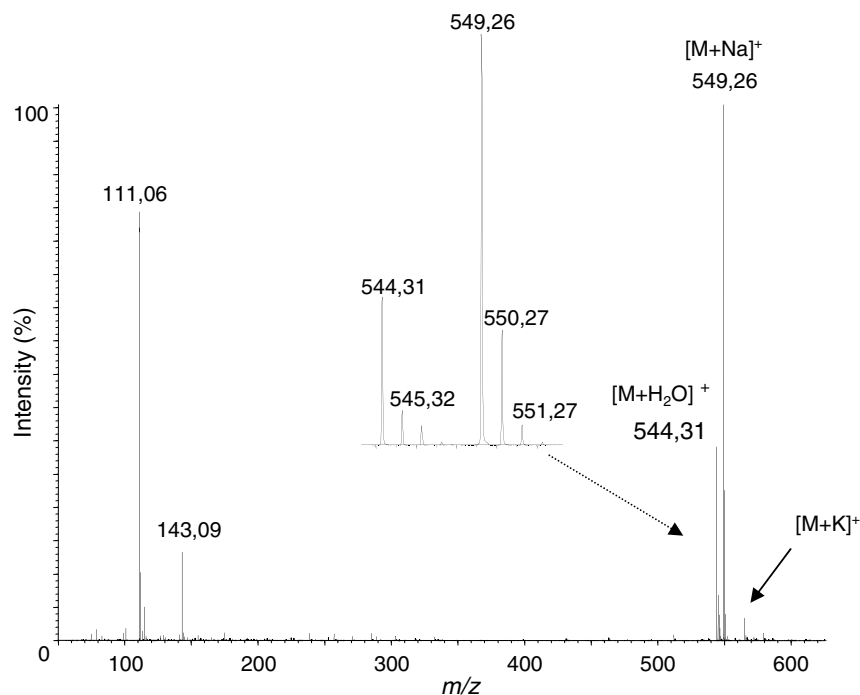


Figure 2. APPI mass spectrum of compound **I** recorded in H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50.

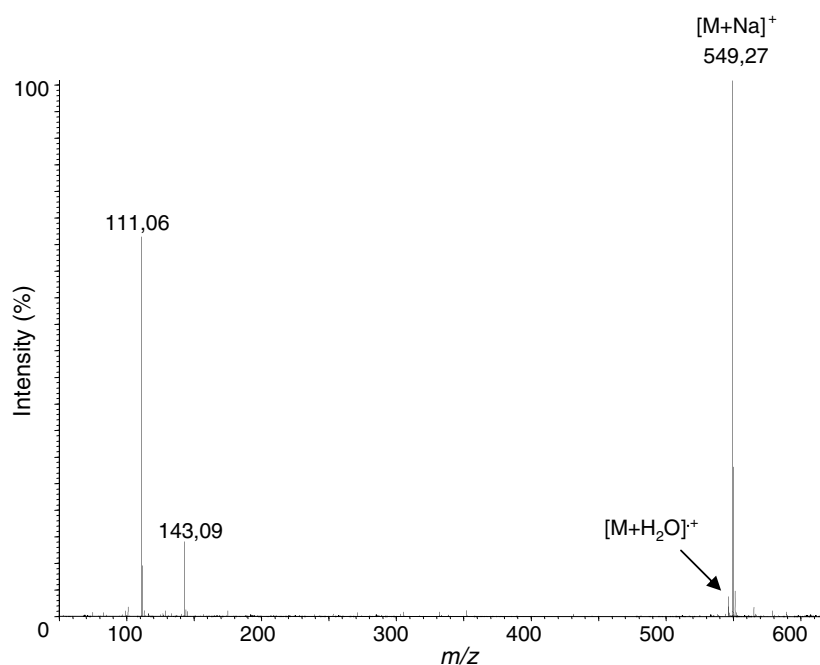


Figure 3. APPI mass spectrum of compound **II** recorded in H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50.

terminal units, as described in Scheme 3. From the CID mass spectrum, a less intensive glycosidic cleavage, namely the C<sub>1</sub>-type in two forms [C<sub>1</sub> + H]<sup>+</sup> and [C<sub>1</sub> + H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> can be observed at *m/z* 207 and 225, respectively. The tentative mechanism of APPI fragmentation of compounds I–III is introduced on the example in Schemes 2 and 3.

In conclusion, we have successfully extended the application of APPI to per-O-methylated trisaccharides related to D-xylan. This is the first report of both linear (II) and branched (I and III) oligosac-

charides examined under UV radiation at a dense medium and under atmospheric pressure. The predominant pathway involved the production of glycosidic fragments without cross ring fragments.<sup>26</sup> Tandem CID fragmentation of [M+Na]<sup>+</sup> ions result in fragment ions. The advantage of this technique is, that the spectra show no internal residue loss.<sup>27</sup> These results differ from those obtained by ESI and MALDI, in which cross ring cleavages are the dominant feature of spectra of per-O-methylated oligosaccharides. This finding demonstrates the potential value of the APPI

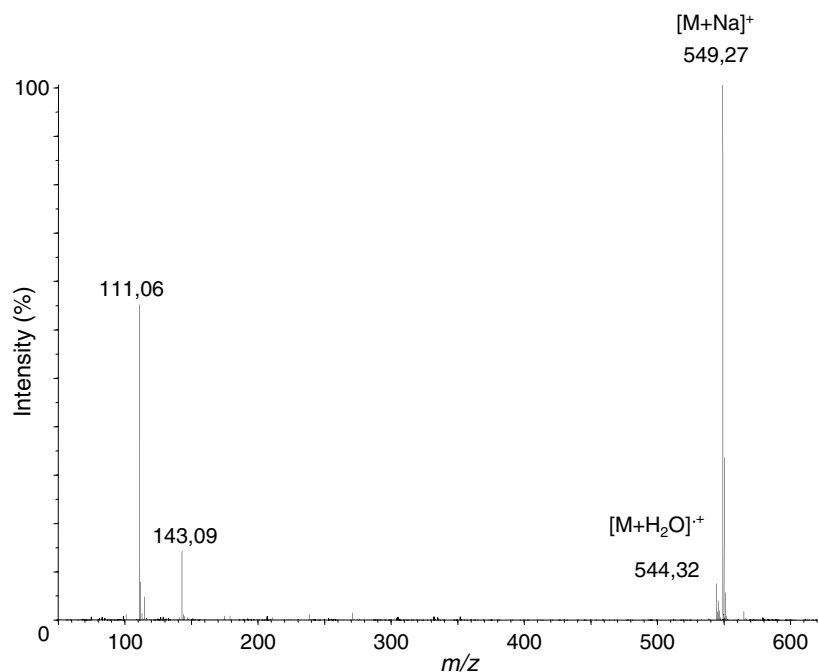


Figure 4. APPI mass spectrum of compound III recorded in H<sub>2</sub>O/MeOH 50/50.

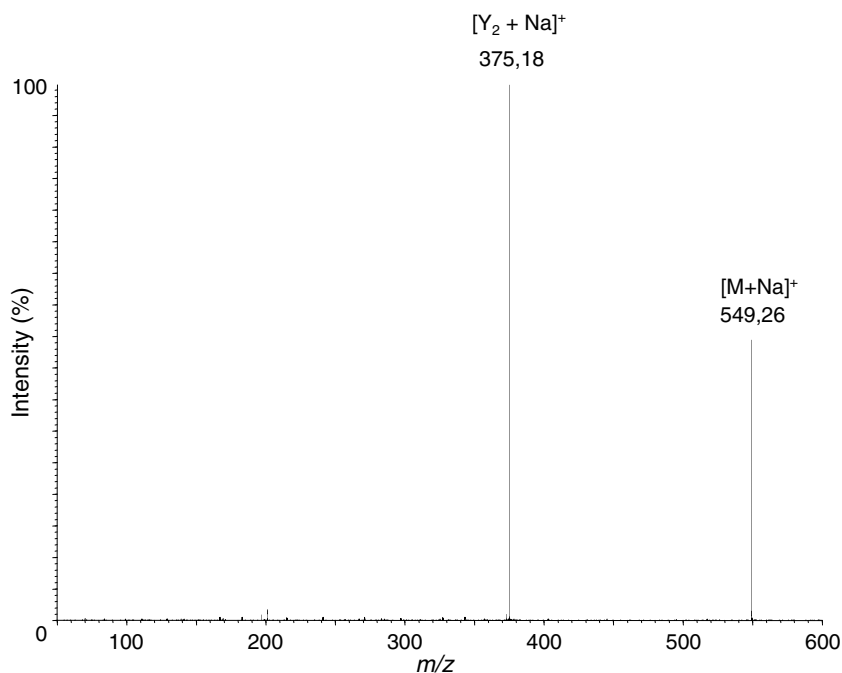
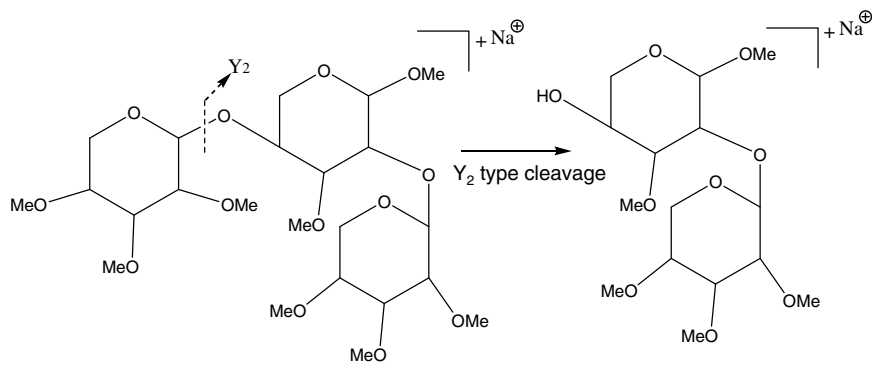
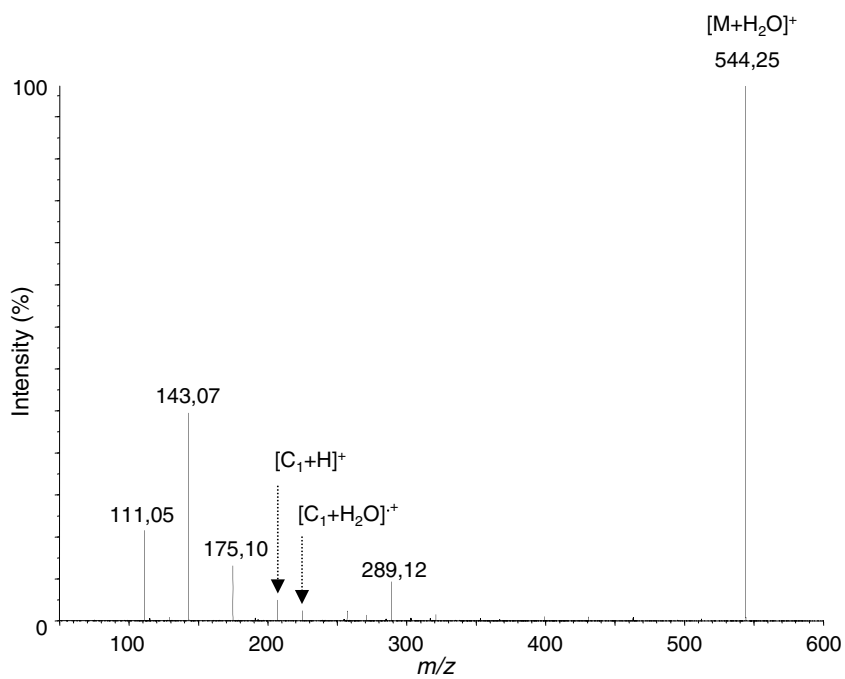
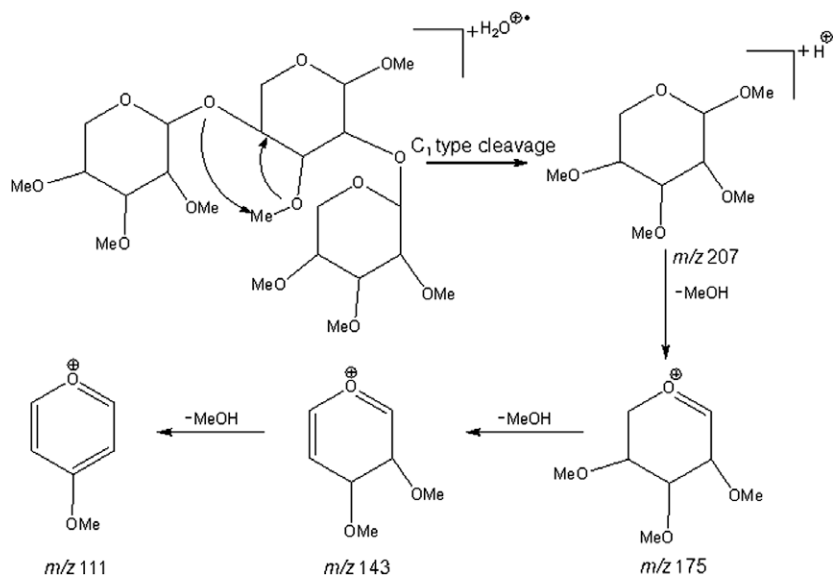


Figure 5. CID mass spectrum of the *m/z* 549 ion precursor.





Scheme 2.

Figure 6. CID mass spectrum of the  $m/z$  544 ion precursor.

Scheme 3.

technique in the detection of per-O-methylated saccharides, even in trace analysis of complicated mixtures.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and compounds

All solvents were HPLC grade. methanol was purchased from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Water was double distilled and then filtered through a Millipore cartridge (18 M $\Omega$ ). The oligo-saccharides were solubilized in a mixture of H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH 50/50. The synthesis of the investigated D-xylan trisaccharides I–III (Scheme 1) has been described earlier.<sup>28,29</sup>

### 2.2. Mass spectrometry

Photoionization experiments were carried out by using the Photospray™ source (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). This source was fitted with a Cathodeon PKS 106 (Cathodeon, Cambridge, UK) Krypton lamp that generates a continuous flow of mainly 10 eV photons with a minor contribution of 10.6 eV photons. Mass spectra were recorded using a hybrid quadrupole-time-of-flight Qstar Pulsar i mass spectrometer (Applied Biosystems). Stock solutions of compounds were prepared in a mixture of H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH 50/50 solution at a concentration of  $2 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

The samples were injected by the flow-injection analysis (FIA) method: 10  $\mu$ L of the sample solutions were loaded into an injection loop and next eluted with a mixture of H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH 50/50. The solvents were introduced into the photospray ionization source using a HPLC pump Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) at a flow rate of 200  $\mu$ L/min. The nebulizer gas was dry, clean air.

Mass spectrometric instrumental parameters were adjusted in order to obtain the best signal-to-noise ratio and to minimize possible in source collision induced dissociation (CID), which have been previously shown to be minor. Operating parameters for the experiments were ISV (ion source voltage) = 1500 V, DP<sub>1</sub> (declustering potential 1) = 10 V, FP (focusing potential) = 50 V, DP<sub>2</sub> (declustering potential 2) = 15 V. The gas flow which protects the lamp was fixed to 2 L/min. Data were acquired using the ANALYST QS software (Applied Biosystems). The temperature of the experiments was 400 °C.

## Acknowledgements

A.B. is indebted to the Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS) for a Ph.D. research fellowship. The investigation was supported by APVV grants 51-017905 and 0650-07.

## References

1. Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3653–3659.
2. Cai, S. S.; Syage, J. A. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1110*, 15–26.
3. Purcell, J. M.; Hendricson, C. L.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5906–5912.
4. Song, L.; Wellman, A. D.; Adcock, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1343–1351.
5. Biermann, Ch. J.; Mc Ginnis, G. D. *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*; CRC Press: Corporate Blvd., N.W., Boca Raton, Florida, 2000. 33431.
6. Kováčik, V.; Kováč, P. *Org. Mass Spectrom.* **1974**, *9*, 172–178.
7. Kováčik, V.; Mihálov, V.; Kováč, P. *Carbohydr. Res.* **1981**, *88*, 189–201.
8. Kováčik, V.; Mihálov, V.; Higuchi, T.; Hirsch, J.; Kováč, P. *Carbohydr. Nucl. Nucl.* **1977**, *4*, 223–227.
9. Pätöprstý, V.; Kováčik, V.; Karácsonyi, Š. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 840–846.
10. Kováčik, V.; Petráková, E.; Hirsch, J.; Mihálov, V.; Heerma, W.; Versluis, C. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *15*, 455–459.
11. Kováčik, V.; Bekešová, S.; Tvaroška, I.; Hirsch, J.; Chmelík, J. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1554–1561.
12. Kováčik, V.; Bekešová, S.; Tvaroška, I. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 749–755.
13. Kováčik, V.; Bekešová, S.; Pätöprstý, V.; Řehulka, P.; Chmelík, J.; Kováč, P. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2006**, *12*, 247–252.
14. Syage, J. A.; Evans, M. D. *Spectroscopy* **2001**, *16*, 15–21.
15. Robb, D. B.; Blades, M. W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1275–1290.
16. Giuliani, A.; Debois, D.; Laprèvote, O. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2006**, doi: 10.1255/ejms.803.
17. Kauppila, T. J.; Kuuranne, T.; Meurer, E. C.; Eberlin, M. N.; Kotiaho, T.; Kostiaainen, R. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5470–5479.
18. Rauha, J.-P.; Vuorela, H.; Kostiaainen, R. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 1269–1280.
19. Delobel, A.; Roy, S.; Touboul, D.; Gaudin, K.; Germain, D. P.; Baillet, A.; Brion, F.; Prognon, P.; Chaminade, P.; Laprèvote, O. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 50–58.
20. Delobel, A.; Touboul, D.; Laprèvote, O. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2005**, *11*, 409–417.
21. Bagag, A.; Giuliani, A.; Laprèvote, O. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *264*, 1–9.
22. Delobel, A.; Halgand, F.; Laffranchise-Gosse, B.; Snijders, H.; Laprèvote, O. *J. Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5961–5968.
23. Berkowitz, J. *Photoabsorption, Photoionization, Photoelectron Spectroscopy*; Academic Press: New York, 1979. p 93.
24. Syage, J. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1521–1529.
25. Doman, B.; Costello, C. E. *Glycoconjugate J.* **1988**, *5*, 397–401.
26. Zaia, J. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, *23*, 161–227.
27. Brüll, L. P.; Kováčik, V.; Thomas-Oates, J. E.; Heerma, W.; Haverkamp, J.; Kováč, P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1353–1362.
28. Hirsch, J.; Kováč, P. *Carbohydr. Res.* **1979**, *77*, 241–244.
29. Kováč, P.; Hirsch, J. *Carbohydr. Res.* **1982**, *100*, 177–193.

## Résumé :

Mon travail de thèse a été entièrement dévoué à l'étude d'une récente technique d'ionisation en spectrométrie de masse : la photoionisation à pression atmosphérique (APPI). Ce travail est développé sur deux axes principaux. D'une part, il vise à appliquer cette méthode d'ionisation à de nouvelles familles de molécules et d'en élargir le cas échéant le domaine d'application. D'autre part et parallèlement à cela, nous nous sommes attachés à l'étude des mécanismes de formation des ions ainsi qu'à l'élucidation des voies de fragmentation. En effet, ces dernières se révèlent souvent intensives et particulières.

Les résultats obtenus dans le cadre du premier axe de recherche de ce travail de thèse offrent de nouvelles solutions pour mieux comprendre le comportement de molécules biologiques sous irradiation UV et à pression atmosphérique. En effet, nous avons pu démontrer que la photoionisation à pression atmosphérique pouvait s'étendre à d'autres classes de composés que ceux initialement pressentis et plus particulièrement à des biomolécules polaires et de haut poids moléculaire tels que les acides nucléiques, peptides, les peptides, etc.

De plus, ce travail a permis de démontrer l'impact du milieu (solvant) sur le mécanisme de formation des ions sous irradiation UV. Ainsi l'étude et la connaissance des mécanismes fondamentaux de formation des ions en APPI a visé *in fine* au contrôle de la formation des ions précurseurs et par voie de conséquence, à celui des fragments générés en source. Nous avons observé des ions fragments radicalaires d'un type nouveau, jamais observé auparavant avec les sources d'ions connues

L'originalité et le caractère résolument novateur de cette expérience nous ont amené à transférer cette expérience sur une ligne de lumière du Synchrotron SOLEIL. L'utilisation d'une source de lumière accordable en APPI va certainement renforcer la versatilité de cette source d'ions.

**Mots-clés :** *spectrométrie de masse, photoionisation, fragmentations, processus radicalaires, biomolécules*

---

## Abstract :

My PhD's work has been completely dedicated to develop new ionization source in mass spectrometry: the atmospheric pressure photoionization (APPI). This work is developed on two main areas. On the one hand, it aims to apply this method to new family of biomolecules. On the other hand, we report a comprehensive study on the ionization mechanisms in APPI.

The first part of this manuscript offers a better understanding of the behaviour of the biological molecules under VUV radiation and atmospheric pressure. Indeed, we were able to say that polar and high molecular weight biomolecules could be easily photoionizable.

Moreover, this work allows studying the effect of the medium (solvent) on the photoionization mechanism to be studied. It is possible to control the orientation of the observed reactions and to choose a particular type of molecular ion. We observed extensive and peculiar fragmentations which have never been detected with classical ionization techniques.

The originality and innovative approach of this experience led us to transfer it to a UV beamline of the Synchrotron SOLEIL. Using an accordable source will certainly enhance the versatility of the ion source.

**Keywords :** *mass spectrometry, photoionization, fragmentations, radical processes, biomolecules*

---

**Laboratoire de Spectrométrie de Masse  
Institut de Chimie des Substances Naturelles (UPR 2301)  
CNRS - Avenue de la Terrasse  
F-91198 GIF-SUR-YVETTE Cedex**