



SFSM

Ecole de Printemps de la Société Française de Spectrométrie de Masse

XIXèmes Rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse

Domaine des Roches, Dieppe, Seine Maritime, Haute Normandie
24 au 28 Mars 2014



Waters
THE SCIENCE OF
WHAT'S POSSIBLE.®

 **SHIMADZU**
Solutions for Science
since 1875



ThermoFisher
SCIENTIFIC

AB SCIEX



Agilent Technologies

Programme Détaillé

Lundi 24 Mars 2014 :

17h00 : Départ du bus de la gare de Rouen vers le centre d'hébergement

18h00 : Accueil des participants sur le site

Soirée d'accueil

Mardi 25 Mars 2014 :

Modérateur : Shakir Shakir

08h30 – 10h15 : "**Préparation d'échantillons**"

Alain Paris, INRA Paris, Unité Mét@risk- Méthodologies d'analyse du risque alimentaire,
16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 5

10h15 – 10h30 : Pause Café

10h30 – 12h00 :

10h30 : "Electrospray mass spectrometry of G-quadruplexes in potassium"

A. Marchand, V. Gabelica

10h45 : "Identification of defective structures of PAMAM dendrimer using various separation methods coupled with mass spectrometry: CE-MS, IM-MS, TLC-MS and LC-MS"

Emma-Dune Leriche, Marie Hubert-Roux, Martin Grossel, Catherine Lange1, Carlos Afonso, Corinne Loutelier-Bourhis

11h00 : "Imagerie par spectrométrie de masse MALDI-FT-ICR de la biodistribution d'un perturbateur endocrinien dans les zebrafishes"

Mathieu Tiquet, Delphine Debois, Benoist Pruvot, Marc Muller, Edwin De Pauw

11h15 : “Chromatographie en phase supercritique couplée à la spectrométrie de masse pour l’analyse de substances naturelles à polarités varies”

Marie Méjean, Alain Brunelle, David Touboul

11h30 : “Complexe plasmatique humain RBP4 – TTR: caractérisation des protéines et du complexe ”

Charlène Granier, Fabrice Bray, Christine Defer, Dominique Dernis, Caroline Tokarski, Christian Rolando

11h45 : “Conformational evolution of peptides following the opening of disulfide bridges using ion mobility coupled with mass spectrometry”

Hanozin Emeline, Morsa Denis, De Pauw Edwin

12h00 - 12h20 : Intervention de Etienne Maout, ThermoFischer,
etienne.maout@thermofisher.com

12h30 - 14h00 : Repas

Modérateur : Alain Desprez

14h00 – 15h45 : ""

Carlos Afonso, Université de Rouen, UMR 6014 COBRA / IRCOF, Rouen

15h45 - 16h00 : Goûter

16h00 - 17h30 :

16h00 : “Utilisation de nouvelles matrices pour l’analyse de Polyoxoanions fonctionnalisés en MALDI-TOF”

Jean Boulicault, Sandra Alves, Richard Cole

16h15 : "Proteomic analyses along the rostro-caudal axis of injured spinal cord"

Stéphanie Devaux, Dasa Cizkova, Françoise Le Marrec-Croq, Julien Franck, Lucia Slovinska, Ivana Grulova, Christophe Lefebvre, Isabelle Fournier, Michel Salzet

16h30 : "Structure of polyphenol clusters: an ion mobility study"

Frédéric Poussigue, Arnaud Vernier, Jérôme Lemoine, Philippe Dugourd, and Fabien Chiro

16h45 : "Development of Laser Ablation and Droplet Capture towards a new ambient mass spectrometry technique"

Benoit Fatou, Maxence Wisztorski, Cristian Focsa, Michel Salzet, Michael Ziskind, Isabelle Fournier

17h00 : "Action FRET: Probing the molecular conformation of mass-selected gas phase ions with FRET detected by mass-spectrometry only"

Steven Daly, Frederic Poussigue, Anne-Laure Simon, Luke MacAleese, Fabien Chiro, Rodolphe Antoine, Philippe Dugourd

19h : Repas

Mercredi 26 Mars 2014 :

Modérateur : Marie Méjean

08h30 – 10h30 : "**Traitement statistiques des données d'analyses**"

Alain Paris, INRA Paris, Unité Mét@risk- Méthodologies d'analyse du risque alimentaire, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 5

10h30-10h45 pause café

10h45 – 12h00 :

10h45 : “Développement d’une méthode de quantification des lipides par imagerie par spectrométrie de masse MALDI”

Laure Jadoul, Rémi Longuespée, Delphine Debois, Gauthier Eppe, Edwin De Pauw

11h00 : “Development of an analytical strategy for isomer separation of selenium compounds in selenium-rich yeast by tridimensional liquid chromatography coupled to high resolution ion mobility – mass spectrometry”

Cédric Delvaux, Johann Far, Gauthier Eppe, Edwin de Pauw

11h15 : “Intégration de données protéomique et transcriptomique en vue du séquençage de novo à haut débit de toxines animales”

Michel Degueldre, Marion Verdenaud, Frédéric Ducancel, Sheila Zuniga , Juan Carlos Trivino, Pierre Escoubas, Loic Quinton and Edwin de Pauw

11h30 : “Etude de la formulation de produits complexes par ASAP-IMMS”

Caroline Barrère, Florian Maire, Pierre Giusti, Amandine Racaud et Carlos Afonso

11h45-12h05 : Intervention de Bruker

12h30 - 14h00 : Repas

14h00 : Après-midi libre ou activité « Pêche à pied »

19h00 : Repas

Jeudi 27 Mars 2014 :

Modérateur : Séverine Clavier

08h30 – 10h15 : " **Spectrométrie de Masse des Complexes Non-Covalents**"

Valérie Gabélica , Inserm - U869 ARNA – Inserm/Univ. Bordeaux Segalen, Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB), 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac

10h15-10h30 : Pause café

10h30-12h00 :

10h30 : "Caractérisation structurale de complexes protéiques non covalents par Echanges Hydrogène/Deutérium couplés à la Spectrométrie de Masse"

Guillaume Terral, Alain Van Dorsselaer, Sarah Cianférani

10h45 : "Location of adducted cations in electrosprayed PEO-PAMAM hybrid molecules: a combined MS/MS and ion mobility study"

Christophe Chendo, Aura Tintaru, Qi Wang, Stéphane Viel, Gilles Quéléver, Ling Peng, Paola Posocco, Sabrina Pricl, Laurence Charles

11h00 : "Comparaison de différents modes de focalisation des ions primaires en imagerie par spectrométrie de masse d'ions secondaires TOF-SIMS et optimisation de l'extraction retardée"

Quentin Vanbellingen; Nicolas Elie; David Touboul; Alain Brunelle

11h15 : " Analyses non ciblées pour la caractérisation moléculaire d'une variété originale de rose : 'Jardin de Granville'"

L. Riffault, E. Destandau, L. Pasquier, P. André, C. Elfakir

11h30 : “ Différenciation de topoisomères peptidiques par couplage spectrométrie de masse et mobilité ionique”

Kevin Jeanne Dit Fouque, Hélène Lavanant, Salomé Poyer, Séverine Zirah, Yanyan Li, Sylvie Rebuffat, Julian D. Hegemann, Marcel Zimmermann, Mohamed A. Marahiel, Carlos Afonso

11h45 : “Real-Time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility”

Johann Stojko, Stéphanie Petiot-Bécard, Sonia Fieulaine, Thierry Meinel, Alain Van Dorsselaer, Carmela Giglione and Sarah Cianférani

12h00-12h20 : Intervention de Christophe Siroit, Waters,
[Christophe Siroit@waters.com](mailto:Christophe.Siroit@waters.com)

12h30 - 14h00 : Repas

Modérateur : Salomé Poyer

14h00 – 15h45 : ””

Carlos Afonso, Université de Rouen, UMR 6014 COBRA / IRCOF, Rouen

15h45 - 16h00 : Goûter

16h00 - 17h30 :

16h00 : “ Détermination de l’incorporation isotopique par spectrométrie de masse, d'une protéine marquée ¹⁵N, produite dans un système d’expression racinaire”

R. Trouillard, M. Hubert-Roux, V. Tognetta L.Guilhaudis, C. Plasson, L. Menu-Bouaouiche, L. Coquet, J. Hardouin, J. Ele ekouna, F. Guérineau, P. Cosette, P. Lerouge, M. Boitel, C. Afonso et I. Ségalas-Milazzo

16h15 : "Mass spectrometry analysis of rat alveolar macrophages NR8383 secretomes and effect of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) down-regulation"

Marie Duhamel

16h30 : "Profiling the cysteine redox proteome by isobaric Tandem Mass Tag reagents "

Shakir Shakir, Chiappetta Giovanni, Vinh Joelle

16h45 : " Laboratory analogs of extraterrestrial organic residues: a key for the origin of organics in the Solar System"

P. Modica, D. Lesage, L. d'Hendecourt

16h45-17h05 : Intervention de Luc Arnaud, Agilent Technologies, luc_arnaud@agilent.com

19h00 : Repas et soirée « Gala »

Vendredi 28 Mars 2014 :

Modérateur : Shakir Shakir

8h30-10h15 : "Spectrométrie de Mobilité Ionique"

Valérie Gabélica , Inserm - U869 ARNA – Inserm/Univ. Bordeaux Segalen, Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB), 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac

10h15-10h30 : Pause Café

10h30-12h15 : " Spectrométrie de Masse des Polymères Synthétiques "

Laurence Charles, Institut de Chimie Radicalaire – SACS, Aix-Marseille Université, Campus de St Jérôme, avenue Escadrille, Normandie Niemen, case 511, 13397, Marseille

12h15-12h35 : Intervention de Cécile Busset, AB Sciex, Cecile.Busset@absciex.com

13h00 : Départ du bus pour Dieppe (Environ 1h de trajet)

Arrivée à la gare de Dieppe à 14h

Liste des participants

AFONSO Carlos
Université de Rouen
UMR 6014 COBRA / IRCOF
76131, Mont Saint Aignan
carlos.afonso@univ-rouen.fr

ARNAUD Luc
luc_arnaud@agilent.com

ALSAFRA Zouheir
Université de Liège
Rue Bassenge, N°40
4000, Liège, Belgique
Zouheir.alsafra@student.ulg.ac.be

BARRERE Caroline
Université de Rouen UMR 6014 COBRA
IRCOF, 1 rue Tesnières
76131 Mont Saint Aignan Cedex
caroline.barrere@univ-rouen.fr

BONAN Marc
Université de Rouen UMR 6014 COBRA
1 rue tesnière
76131 Mont Saint Aignan
bonan_marc@yahoo.fr

BOULICAULT Jean
UPMC/IPMC
4, place Jussieu
75005 PARIS
jean.boulicault@upmc.fr

BUSSET Cécile, AB Sciex
Cecile.Busset@absciex.com

CHARLES Laurence
Institut de Chimie Radicalaire – SACS
Campus de St Jérôme, avenue Escadrille
Normandie Niemen, case 511
13397, Marseille
laurence.charles@univ-amu.fr

CHENDO Christophe
Institut de Chimie Radicalaire – SACS
Campus de St Jérôme, avenue Escadrille
Normandie Niemen, case 511
13397, Marseille
christophe.chendo@univ-amu.fr

CLAVIER Séverine
Laboratoire des Biomolécules

UMR 7203 CNRS-UPMC-ENS
4, place Jussieu
75252 Paris Cedex 5
severine.clavier87@gmail.com

D'Atri Valentina
IECB – Institut Européen de Chimie et Biologie
2, Rue Robert Escarpit
33607 PESSAC
v.datri@iecb.u-bordeaux.fr

DEGUELDRE Michel
Laboratoire de Spectrométrie de Masse
Université de Liège
Allée de la Chimie, 3
4000, Liège, Belgique
mdegueldre@doct.ulg.ac.be

DELVAUX Cédric
Laboratoire de Spectrométrie de Masse,
Université de Liège
Allée du 6 Août, 15
4000, Liège, Belgique
c.delvaux@ulg.ac.be

DESPREZ Alain
Laboratoires IPREM / LCABIE
2, Avenue du Président Angot
64053 Pau
alain.desprez@univ-pau.fr

DEVAUX Stéphanie
Laboratoire de Spectrométrie de Masse
Biologique fondamentale et appliquée
Université Lille1, Bat SN3 1^{er} étage
59655 Villeneuve d'Ascq
stephanie.devaux@etudiant.univ-lille1.fr

DOMALAIN Virginie
Université de Rouen UMR 6014 COBRA
1, Rue Tesnières
76131 Mont Saint Aignan
virginie.domalain@etu.univ-rouen.fr

DUHAMEL Marie
Laboratoire de Spectrométrie de Masse
Biologique fondamentale et appliquée
Université Lille1, Bat SN3 1^{er} étage
59655 Villeneuve d'Ascq
marie.duhamel@etudiant.univ-lille1.fr

DUVAL Johanna

ICOA

Rue de Chartres

45100 Orléans

johanna.duval700@gmail.com**FARENC Matilde**

Université de Rouen UMR 6014 COBRA

1 rue tesnière

76131, Mont Saint Aignan

rafma@orange.fr**FATOU Benoit**

Laboratoire LSMBFA / PhLAM

Bâtiment SN3, Bâtiment CERLA, Cité

Scientifique

59655 Villeneuve d'Ascq

benoit.fatou@univ-lille1.fr**Gabelica Valérie**

Inserm - U869 ARNA – Inserm/Univ. Bordeaux

Segalen

Institut Européen de Chimie et de Biologie

(IECB)

2 rue Robert Escarpit

33607 Pessac

v.gabelica@iecb.u-bordeaux.fr**GRANIER Charlène**

USR CNRS 3290

Bâtiment C4, Cité Scientifique

59655 Villeneuve d'Ascq Cédex

Granier.charlene@gmail.com**HANOZIN Emeline**

Université de Liège (Laboratoire de spectrométrie de masse)

Allée de la Chimie, 3

4000, Liège, Belgique

ehanozin@ulg.ac.be**JEANNE DIT FOUQUE Kévin**

Université de Rouen UMR 6014 COBRA

1 rue Tesnière

76130, Mont Saint Aignan

kevin.jeanne-dit-fouque@etu.univ-rouen.fr**JADOUL Laure**

Université de Liège, Laboratoire de Spectrométrie de Masse (LSM)

Allée de la Chimie N°3 (Bât. B6c)

4000 Liège, Belgique

laure.jadoul@doct.ulg.ac.be**LERICHE Emma-Dune**

Université de Rouen, UMR 6014 COBRA

Rue Lucien Tesnière

76130 Mont Saint Aignan

lericheemmadune@yahoo.fr**LIGIERO Leticia**

Université de Pau et des pays de l'Adour

Res Gaston Phoebus Annexe 3

12, Avenue du Doyen Poplawsk

64000, Pau

leticia.medinaligiero@univ-pau.fr**MAOUT Etienne**etienne.maout@thermofisher.com**MARCHAND Adrien**

Inserm - U869 ARNA – Inserm/Univ. Bordeaux Segalen

Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB)

2 rue Robert Escarpit

33607 Pessac

adrien.marchand@inserm.fr**MEJEAN Marie**

Institut de Chimie des Substances Naturelles

ICSN, CNRS UPR 2301

1 avenue de la terrasse

91198 Gif-sur-Yvette

marie.mejean@gmail.com**MODICA Paola**

Institut d'Astrophysique Spatiale

Centre Universitaire d'Orsay Bât 120 – 121

91405 ORSAY Cedex

paola.modica@ias.u-psud.fr**MOUAIJAH Dounia**

Laboratoire LSMBFA

Bâtiment SN3, Bâtiment CERLA, Cité Scientifique

59655 Villeneuve d'Ascq

dounia.mouajjah@etudiant.univ-lille1.fr

PARIS Alain

INRA Paris
Unité Mét@risk- Méthodologies d'analyse du
risque alimentaire
16 rue Claude Bernard
75231 Paris Cedex 5
alain.paris@paris.inra.fr

POUSSIGUE Frédéric

Institut des Sciences Analytiques ISA
5, Rue de la Doua
69100 Villeurbanne
frederic.poussigue@univ-lyon1.fr

POYER Salomé

Université de Rouen UMR 6014 COBRA
IRCOF 1 rue Tesnière
76131 Mont Saint Aignan Cedex
salome.poyer@gmail.com

RIFFAULT Ludivine

Institut de Chimie Organique et Analytique,
Université d'Orléans
rue de Chartres, BP 6759
45067 Orléans cedex 2
ludivine.riffault@etu.univ-orleans.fr

ROSSATO Maxime

Institut des Biomolécules Max Mousseron
(IBMM) – UMR 5247 CNRS
1, Place Eugène Bataillon
34095 Montpellier
maxime.rossato@univ-montp2.fr

SHAKIR Shakir

SMBP - ESPCI
5 rue Vauquelin
75005 Paris
shakir.shakir@espci.fr

SIMON Anne-Laure

ILM-CNRS
5, Rue de la Doua
69100, Villeurbanne
anne-laure.simon@univ-lyon1.fr

SIROIT Christophe, Waters

Christophe_Siroit@waters.com

STOJKO Johann

LSMBO – Institut Pluridisciplinaire Hubert
Curien (Université de Strasbourg)
25 rue Becquerel Bâtiment R5 étage 0
67087 Strasbourg
johann.stojko@etu.unistra.fr

TERRAL Guillaume

LSMBO – Institut Pluridisciplinaire Hubert
Curien (Université de Strasbourg)
25 rue Becquerel Bâtiment R5 étage 0
67087 Strasbourg
guillaume.terral@etu.unistra.fr

TIQUET Mathieu

Laboratoire de spectrométrie de masse
Université de Liège
Allée de la Chimie, 3 - B6c
4000, Liège, Belgique
mathieu.tiquet@doct.ulg.ac.be

TROUILLARD Romain

Université de Rouen UMR 6014 Cobra
1 rue tesnière
76 130 Mont saint aignan
romain.trouillard@etu.uni-rouen.fr

VANBELLINGEN Quentin

Institut de Chimie des Substances Naturelles,
ICSN, CNRS, UPR 2301
1, Avenue de la Terrasse
91198 Gif-sur-Yvette cedex
quentin.vanbellinge@cnrs.fr

VARGAS Vicmary

IPREM/LCABIE
2, Avenue du Président Angot
64053 Pau
vicmary.vargas@univ-pau.fr

WESTERMANN Benoît

LSMBO
25, rue Becquerel Bât R5NO
67087 Strasbourg
benoit.westermann@etu.unistra.fr

Cours

Spectrométrie de Masse des Complexes Non-Covalents

Valérie Gabelica

U869 ARNA (Inserm/Univ. Bordeaux)

Institut Europeen de Chimie et Biologie, 2, rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France.

www.iecb.u-bordeaux.fr/teams/GABELICA

email : valerie.gabelica@inserm.fr

Cet exposé décrira la détection de complexes non-covalents par spectrométrie de masse, principalement à ionisation électrospray. Nous insisterons sur les similitudes et différences de tuning par rapport aux expériences d'électrospray classiques. En effet, la détection de complexes non-covalents est aujourd'hui possible sur à peu près tous les spectromètres ESI-MS, pourvu qu'il soit réglé de manière adéquate.

Une grande partie de l'exposé sera dédié à l'étude quantitative des complexes : comment à partir des intensités détectées peut-on déterminer une constante d'équilibre de dissociation en solution (K_D) ? Ces données obtenues par spectrométrie de masse sont-elles fiables ? Comment s'en assurer ?

Enfin, nous aborderons la préservation des interactions non-covalentes en phase gazeuse, et survolerons comment les étudier. Ceci nous permettra de formuler une réponse à l'une des questions les plus fréquentes posées par les néophytes : les études par spectrométrie de masse se faisant en phase gazeuse, comment peuvent-elles refléter ce qui se passe en solution ?

Références-clé :

- [1] R. D. Smith, K. J. Light-Wahl, The observation of non-covalent interactions in solution by electrospray ionization mass spectrometry: promise, pitfalls and prognosis. *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, 22, 493-501. → les questions que le domaine posait à ses débuts, et que certains se posent encore...
- [2] J. M. Daniel, S. D. Friess, S. Rajagopalan, S. Wendt, R. Zenobi, Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, 216 1-27. → excellent état de l'art raisonné, des débuts à 2002.
- [3] K. Breuker, The study of protein-ligand interactions by mass spectrometry - a personal view. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, 239, 33-41. → Absolument pas dépassée, une discussion de l'étude structurale et énergétique des complexes en solution et « en phase gazeuse » par spectrométrie de masse.
- [4] C. A. Schalley, A. Springer, *Mass Spectrometry and Gas-Phase Chemistry of Non-Covalent Complexes*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, **2009**. → Livre de référence sur le sujet, avec des exemples en chimie supramoléculaire et en analyse de complexes de biomolécules.
- [5] E. N. Kitova, A. El-Hawiet, P. D. Schnier, J. S. Klassen, Reliable determinations of protein-ligand interactions by direct ESI-MS measurements. Are we there yet? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, 23, 431-441. → Un article de la série « critical insight » sur la détermination de K_D 's par MS.

Spectrométrie de Mobilité Ionique

Valérie Gabelica

U869 ARNA (Inserm/Univ. Bordeaux)

Institut Europeen de Chimie et Biologie, 2, rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France.

www.iecb.u-bordeaux.fr/teams/GABELICA

email : valerie.gabelica@inserm.fr

L'exposé sera subdivisé en quatre parties. D'abord nous définirons ce qu'est **la mobilité d'un ion (symbole K)** : c'est la constante de proportionalité entre la vitesse d'un ion et le champ électrique lorsque cet ion se meut dans un milieu sous l'influence dudit champ électrique.

$$\vec{v} = K \cdot \vec{E}$$

Cette définition est très vaste et s'applique à de nombreux types d'expériences, depuis l'électrophorèse sur colonnes ou sur gels à la spectrométrie de mobilité ionique où le milieu offrant la friction est un milieu gazeux. Nous décrivons ensuite la spectrométrie de mobilité ionique proprement dit, telle que nous la connaissons couplée à la spectrométrie de masse. Nous classerons les différents types de dispositif instrumentaux, en distinguant par exemple séparation dans le temps ou dans l'espace, séparation à bas champ ou à haut champ, à champ électrique constant ou fluctuant. Ensuite, nous verrons comment, allant au-delà de la simple séparation qui présente par essence de nombreuses applications analytiques, on peut déterminer la valeur de K . Celle-ci est importante pour des applications en analyse structurale car elle donne, suivant la relation de Mason-Schamp rapelée ci-dessous, accès à la **section efficace de collision Ω** (aussi souvent notée CCS = collision cross section).

$$K = \frac{3}{16} \frac{1}{N} \left(\frac{2\pi}{\mu k_B T} \right)^{1/2} \frac{z \cdot e}{\Omega}$$

Nous nous accorderons du temps à dissenter ce qu'est la section efficace de collision, afin de bien comprendre dans quelle mesure on peut inférer des informations structurales à partir des mesures de spectrométrie de mobilité ionique, car là réside actuellement un verrou en chimie physique fondamentale et des enjeux pour la chimie et la biologie structurale. Enfin, nous exposerons quelques applications dans ce domaine de la biologie structurale.

Références-clé :

- [1] B. C. Bohrer, S. I. Merenbloom, S. L. Koeniger, A. E. Hilderbrand, D. E. Clemmer, Biomolecule analysis by ion mobility spectrometry, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 293-327. → Revue générale.
- [2] A. B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H. H. Hill, Ion mobility-mass spectrometry *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1-22. → Article de revue plus centré sur l'instrumentation.
- [3] C. Uetrecht, R. J. Rose, D. E. van, K. Lorenzen, A. J. Heck, Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1633-1655. → Revue centrée sur la biologie structurale.
- [4] T. Wyttenbach, C. Bleiholder, M. T. Bowers, Factors contributing to the collision cross section of polyatomic ions in the kilodalton to gigadalton range: application to ion mobility measurements. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2191-2199. → L'introduction de cet article est très intéressante pour comprendre la signification de la section efficace de collision mesurée en spectrométrie de mobilité ionique.

Spectrométrie de Masse des Polymères Synthétiques

Pr Laurence Charles

Institut de Chimie Radicalaire, Aix-Marseille Université

Ce cours a vocation à apporter les bases de l'analyse des polymères synthétiques par spectrométrie de masse à un public déjà au fait des aspects théoriques et appliqués de cette technique. Une première partie présente les spécificités des polymères et copolymères synthétiques (polymolécularité, solubilité, affinité cationique) et leurs incidences sur l'analyse de ces macromolécules par spectrométrie de masse. En réponse aux enjeux analytiques propres aux polymères synthétiques, seules les techniques d'ionisation les plus utilisées (*i.e.*, electrospray et MALDI) seront abordées. Dans une deuxième partie, la méthodologie d'exploitation des données obtenues en mode MS est détaillée pour permettre la détermination de la nature du monomère, de la masse globale des groupements terminaux, des paramètres de distribution, ainsi que la distinction entre homopolymères et copolymères. La fragmentométrie des polymères synthétiques, étape incontournable pour la caractérisation des groupements terminaux, fait l'objet de la troisième partie. Quelques exemples sont présentés pour illustrer les mécanismes de dissociation après activation collisionnelle et la nomenclature des ions fragments. La nécessité d'utiliser des techniques d'activation alternatives telles que l'ECD, l'ETD, ou l'EPD est également abordée. Une dernière partie résume brièvement l'apport de nouvelles techniques comme l'imagerie MALDI-MS et la spectrométrie de mobilité ionique dans le domaine des polymères synthétiques.

INTERVENTIONS INDUSTRIELS

**AB SCIEX SelexION™ Technology: A New Solution to Selectivity
Challenges in Quantitative Bioanalysis**
*Differential Mobility Separations Enhanced with Chemical Modifiers: A New
Dimension in Selectivity*

Cécile Busset

AB Sciex, 3 Avenue du Canada, 91940 Les Ulis

Présentation orale

High selectivity is a key component of successful quantitative bioanalysis. The ever increasing sensitivity and throughput requirements of bioanalytical assays often pose method development challenges. One of the most common issues encountered is the presence of a matrix interference which must be eliminated by adjusting HPLC conditions, or modifying sample preparation.

Interferences can be present as an un-resolved chromatographic peak, or as a high baseline. In some cases, separation of isomers is required. If a high baseline problem cannot be solved, LOQ's and dynamic range are adversely impacted. Resolving a difficult chromatographic interference can require slower chromatography or more complicated and labor intensive sample clean-up. It also slows down data review if peak integration has to be manually adjusted on a sample by sample basis.

Significant advances have been made in increasing MS/MS selectivity beyond the gold standard MRM. For example, MRM3 on the QTRAP® 5500 system adds additional selectivity by increasing the number of fragmentation steps. Ion mobility presents another attractive option by introducing additional selectivity during sample introduction, following atmospheric pressure ionization. Although ion mobility techniques have been used extensively for qualitative applications, they have traditionally lacked the required ruggedness and speed required for quantitative bioanalysis.

The AB SCIEX SelexION™ Technology with the QTRAP® 5500 system brings the power of differential ion mobility separation to complex bioanalysis, enabled by multiple new innovations in ion mobility.

Résumés

Electrospray mass spectrometry of G-quadruplexes in potassium

A. Marchand^{1,2} ; V. Gabelica^{1,2}

¹ *Univ. Bordeaux, IECB, ARNA Laboratory, F-33600 Pessac, France.*

² *Inserm, U869, ARNA Laboratory, F-33000 Bordeaux, France.*

A commonly used electrolyte in electrospray mass spectrometry (ESI-MS) of biomolecules is ammonium acetate (NH₄OAc). Although some nucleic acid structures such as duplexes require only physiologic ionic strength to be properly mimicked in ESI-MS conditions, some peculiar nucleic acid structures such as DNA G-quadruplexes also depends on direct binding of specific cations. For example, G-quadruplexes are mainly stabilized in cells by sodium or potassium cations. Here we developed ESI-MS compatible conditions that allow to observe DNA G-quadruplexes with K⁺ ions specifically bound between G-quartets. NH₄OAc was replaced with trimethylammonium acetate (TMAA), at concentrations up to 150 mM, and the solution was doped with KCl at concentrations up to 1 mM. The trimethylammonium ion is too large to intercalate between G-quartets, where only K⁺ ions bind. Compared to the equivalent NH₄OAc/KCl mixtures, the TMAA/KCl mixtures provide cleaner spectra by cleaning the nonspecific adducts, and also favor the formation of the same solution structure as in 100 mM KCl, i.e. physiologically relevant solution, for the polymorphic human telomeric DNA structures. This new sample preparation method can be exploited to determine the number of potassium binding sites and of G-quartets, to screen ligand binding to more physiologically relevant structures, and to transfer these relevant structures to the mass spectrometer for gas-phase structural probing.

Identification of defective structures of PAMAM dendrimer using various separation methods coupled with mass spectrometry: CE-MS, IM-MS, TLC-MS and LC-MS

Emma-Dune Leriche¹, Marie Hubert-Roux¹, Martin Grosselet², Catherine Lange¹, Carlos Afonso¹, Corinne Loutelier-Bourhis¹

¹ Normandie Univ UMR 6014, FR 3038; Univ Rouen; CNRS

² University of Southampton, School of chemistry, Highfield, Hants SO17 1BJ Southampton, UK

Polyamidoamines (PAMAMs) are synthetic dendrimers composed of a core, repeating units and terminal functional groups. They potentially have many applications in biological and biomedical fields as drug and acid nucleic carriers. The PAMAM synthesis is known to generate minor but various defects besides the ideal structure. The most common defective structures of PAMAM can show intramolecular cyclization (intramolecular loops), missing repeating units and/or intermolecular aggregates. The separation and the identification of defective and ideal first-generation (G1(N)) ammonia-cored PAMAM structures were performed using different analytical methods:

I) CE-MS: Off-line Capillary Electrophoresis-Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/ Time-of-Flight mass spectrometry.²

II) IM-MS: Ion-mobility mass spectrometry.³

III) TLC-MS: Direct coupling of Thin Layer Chromatography with MALDI mass spectrometry.⁴

IV) LC-MS: Liquid Chromatography-Electrospray Ionization mass spectrometry using a HILIC column and an ion trap mass spectrometer.⁵

The final aim of this study is to evaluate the potentiality of each approach to monitor the purity of PAMAM dendrimer samples.

The CE-MS, IM-MS, TLC-MS and LC-MS analyses permitted the separation of the ideal and of defective structures of the synthesized G1(N) PAMAM. The ideal structure still remained the major species. The structures of these few defects could be determined by MS/MS. Consequently, the main defective structure corresponding to the intramolecular cyclization product (60 Da missing) was evidenced.

The advantages and drawbacks of each method are discussed in this study. TLC-MALDI and IM-MS are faster and allow the use of less sample. The sensitivity is higher since no salt or buffer are present, contrary to the LC-MS or CE-MS approaches.

1- D. A. Tomalia and *al.*, *Polymer journal*, **1985**, 117-132.

2- E. D. Leriche and *al.* *Rapid communications in mass spectrometry*, **2012**, 1718-1724.

3- F. Maire et *al.*, *Journal of American society mass spectrometry*, **2013**, 24, 238-248.

4- E. D. Leriche and *al.* *Analytica Chimica Acta*, **2013**, **808**, 144-150.

J. Peterson et *al.*, *European Polymer Journal*, **2003**, 39, 33-42.

Imagerie par spectrométrie de masse MALDI-FT-ICR de la biodistribution d'un perturbateur endocrinien dans les zébrafishes

Mathieu TIQUET⁽¹⁾, Delphine DEBOIS⁽¹⁾, Benoist PRUVOT⁽²⁾, Marc MULLER⁽²⁾, Edwin DE PAUW⁽¹⁾

⁽¹⁾Département de chimie, Laboratoire de spectrométrie de masse (LSM-GIGA-R), Université de Liège, Liège, Belgique.

⁽²⁾Département des sciences de la vie, GIGA-R : Biologie et génétique moléculaire, Université de Liège, Liège, Belgique.

Dans le domaine agricole, de nombreux pesticides sont suspectés de posséder un effet perturbateur endocrinien. Leurs effets, notamment au niveau morphologique, sont étudiés à l'aide d'un modèle d'embryons de zébrafish (*Danio rerio*) [1]. Néanmoins, peu de recherches ont été entreprises au niveau moléculaire.

Le but de cette étude est donc de corréliser les perturbations morphologiques observées chez les zébrafishes intoxiqués à la biodistribution du pesticide et/ou de ses métabolites, obtenues par imagerie par spectrométrie de masse MALDI.

Le diazinon est un pesticide de la famille des organophosphates encore utilisé dans l'agriculture américaine et dont des traces sont retrouvées dans certains cours d'eau. Les zébrafishes ont été intoxiqués pendant 24h avec des solutions de diazinon dont la concentration était comprise entre 0,1 et 10 μM . Après enrobage des poissons en gélatine, des coupes (10 μm) ont été réalisées au cryostat. Après dépôt de la matrice (HCCA) par ImagePrep, les coupes ont été analysées avec un spectromètre de masse FT-ICR Solarix 9,4T (Bruker Daltonics).

Les images acquises sur des poissons intoxiqués n'ont pas permis de détecter le diazinon ni ses métabolites principaux. La raison suspectée est un effet de suppression ionique diminuant le rendement d'ionisation de ces molécules. Des modifications des profils moléculaires de différents organes ont également été investiguées mais aucun lien n'a pu être établi avec la présence du pesticide.

Cette impossibilité à détecter nos analytes d'intérêt nous a alors conduits à mener une étude plus systématique des paramètres physico-chimiques entrant en jeu lors de l'ionisation MALDI de composés de la même famille que le diazinon. Le but était d'établir une éventuelle relation ionisation – structure et ainsi obtenir des informations sur l'effet suppressif subi. Les résultats obtenus lors de l'analyse de standards sur plaque et sur tissu ont démontré que la présence de certains groupements fonctionnels dans la structure de la molécule, agissant sur la valeur du pKa du composé, influençaient grandement le rendement d'ionisation.

[1] B. Pruvot, Y. Quiroz, A. Voncken, N. Jeanray, A. Piot, J. A. Martial, M. Muller. *A panel of biological tests reveals developmental effects of pharmaceutical pollutants on late stage zebrafish embryos*. Reproductive Toxicology. **34** (2012) 568-583.

Chromatographie en phase supercritique couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse de substances naturelles à polarités variées

Marie Méjean, Alain Brunelle, David Touboul

Centre de recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

De nos jours, il devient nécessaire d'utiliser des techniques d'analyse ayant un faible impact environnemental et humain. Contrairement à la chromatographie en phase normale (NHPLC) très consommatrice de solvants néfastes pour l'environnement, la chromatographie de phase supercritique (SFC) est une technique « verte » puisque la phase mobile est principalement constituée de CO₂. Le CO₂ supercritique possède une faible viscosité et une haute diffusivité, ce qui permet d'obtenir des temps d'analyse et d'équilibration réduits.

Le système utilisé (SFC Agilent Technologies) est constitué d'une chaîne de chromatographie HPLC 1260 pourvue d'un module « Aurora fusion » permettant de générer du CO₂ dans un état supercritique. Ce système est couplé à un spectromètre de masse de type Q-TOF permettant d'obtenir de hautes précisions en masse (< 2 ppm) ainsi que des résolutions élevées (40 000 à m/z 922). Notre instrument est équipé de 3 sources d'ionisation (APPI, APCI et ESI), permettant d'analyser des composés dans une large gamme de polarité. Le travail présenté concernera la mise en place du couplage SFC-MS en prenant comme modèle la séparation de molécules de la famille des vitamines E, qui peuvent être ionisées par les trois types de source. Ces analyses sont étendues à d'autres classes de lipides comme des phospholipides, des sphingolipides, des stérols, qui ne sont pas détectés en UV et pour qui la spectrométrie de masse apparaît être une technique de choix. Les lipides analysés proviennent essentiellement de plasma animal. Le but est d'effectuer une analyse lipidomique, de séparer et détecter les lipides par classe, et chaque lipide par famille en utilisant ce couplage SFC-Q-TOF.

Complexe plasmatique humain RBP4 – TTR: caractérisation des protéines et du complexe

^a Charlène GRANIER, ^a Fabrice BRAY, ^b Christine DEFER, ^b Dominique DERNIS, ^a Caroline TOKARSKI, ^a Christian ROLANDO

USR CNRS 3290, Miniaturisation pour la Synthèse, l'Analyse & la Protéomique (MSAP), Université de Lille 1, Sciences et Technologie, 59655 Villeneuve d'Ascq (France)

^b Établissement Français du Sang Nord de France, Lille (France)

La retinol-binding-protein 4 ou RBP4 (masse de 21 kDa) est une protéine plasmatique responsable du transport du rétinol ou vitamine A au sein de l'organisme. La protéine RPB4 est complexée à une autre protéine plasmatique, la transthyrétine ou TTR (masse de 14 kDa) présente dans le plasma sous forme de tétramère évitant ainsi la filtration par le rein de la protéine RPB4 de basse masse. La formation et la dissociation de ce complexe sont liées à de nombreux paramètres tels que la fixation ou non du rétinol sur RBP4 ou les isoformes de TTR [1,2]. En dosant la protéine RPB4 libre, il a été constaté que la dissociation du complexe RPB4-(TTR)₄ peut être considérée comme un marqueur de dégradation du plasma transfusionnel. Cette étude vise à caractériser le complexe RPB4-(TTR)₄ et à comprendre les facteurs influençant sa dissociation.

Dans un premier temps, les protéines RBP4 et TTR ont été purifiées par immunoprécipitation afin d'isoler chacune d'entre elle ainsi que le complexe. Cette purification a été validée par gel d'électrophorèse SDS-PAGE mono-dimensionnelle et par analyse sur MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems 4800) des protéines intactes. Afin d'ajuster au mieux les quantités de protéines captées en fonction de la quantité d'anticorps, une étude de dose réponse a été menée, permettant ainsi d'optimiser les quantités décrites dans la littérature [3]. Afin de valider l'étape de purification des protéines, une digestion in gel des bandes par la trypsin a été effectuée et a permis de confirmer la présence des deux protéines après consultation des bases de données.

Les protéines immunoprécipitées ont été analysées par nanoESI-Qh-FT ICR (9.4 T, Bruker) en mode dénaturant puis déconvolués par MaxEntropy. Alors que la protéine RBP4 apparait essentiellement sous forme native, la protéine TTR présente de nombreuses isoformes ou modifications post-traductionnelles. L'analyse des spectres a notamment permis d'observer l'ajout d'une autre cystéine ou d'une cystéine et d'une glycine sur l'unique cystéine libre de la protéine. Ces modifications seraient responsables de l'association ainsi que de la dissociation des deux protéines. L'identification et la localisation de ces modifications sont en cours. La prochaine étape est donc l'étude du complexe RPB4-(TTR)₄ en utilisant la source ESI (Electro Spray Ionization) en mode non-dénaturant. Ces expériences seront conduites sur un spectromètre Q-q-TOF.

Cette étude est un élément du projet du laboratoire visant à identifier le complexome du plasma humain et à comprendre son rôle dans le cadre de la médecine transfusionnelle.

- [1] Interactions amongst plasma retinol-binding protein, transthyretin and their ligands implications in vitamin A homeostasis and transthyretin amyloidosis. Raghu P, Sivakumar B. *Biochimica Biophysica Acta* 2004: 1 – 9
- [2] The transthyretin-retinol-binding protein complex Monaco HL. *Biochimica Biophysica Acta* 2000: 65 – 72
- [3] Proteomics applied to transfusion plasma: the beginning of the story. Ortiz A, Richa L, Defer C, Derris D, Huart JJ, Tokarski C, Rolando C. *Vox Sanguinis* 2013: 275 – 291
- [4] Isoforms of retinol binding protein 4 (RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver. Frey SK, Nagl B, Henze A, Raila1 J, Schlosser B, Berg T, Tepel M, Zidek W, O Weickert M, Pfeiffer AFH, Schweigert FJ. *Lipids Health Disease* 2008: 7:29

Conformational evolution of peptides following the opening of disulfide bridges using ion mobility coupled with mass spectrometry

Hanozin Emeline, Morsa Denis, De Pauw Edwin

Mass Spectrometry Laboratory, University of Liège

The three-dimensional structure of peptides is closely related to their biological functions. Different kinds of interactions are established inside a peptide and most of them have been proved to play a great part in the stabilization of the peptides shape. Among them, the role of disulfide bridges is however still not clearly established: “*are they the driving force for peptide folding and formation of a specific tertiary structure or are they formed as a consequence of the folding driven by weak interactions?*”

Here, we focused on a small peptide, the α -Cn1a conotoxin, which contains two disulfide bonds (1-3/2-4 pattern) and studied the evolution of its structure after bonds cleavage. This process was induced either by chemical reduction in solution or by electron transfer in the gas phase (ETD)¹. Its structural evolution was probed using ion mobility coupled with mass spectrometry (IM-MS). In the case where disulfide bridges plays a role in the stabilization of the peptide shape, their rupture should imply some structural rearrangements and the consecutive isomerization should be spotted using IM-MS.

We first focused on the 3+ charge state of the peptide and compared populations formed upon chemical and ETD reductions. In both case, the arrival time distributions *ATD* resulting from the ion mobility separation highlighted different species corresponding to the oxidized (no disulfide bridge opening), partially reduced (one bridge opened) and completely reduced (two bridges opened) ions². Whatever the reduction process, the oxidized species appeared at lower drift time t_d than their reduced counterparts, supporting a deployment of the structure upon ruptures of disulfide bridge(s).

In a second time, we investigated the conformational evolution of reduced species upon collisional heating localized before the IMS cell. In the case of ETD reduced-forms, an increase of voltage intensity leads to a population redistribution among the partially reduced conformers. Indeed, the structure obtained after bridges scrambling seems to be favored at high accelerative voltages. This observation could be the witness of a radical cascade mechanism implying a radical transfer along the peptide chain. This hypothesis still has to be confirmed.

¹ Cole, S. R., et al., Electron transfer dissociation (ETD) of peptides containing intrachain disulfide bonds, 2012, J. Am. Soc. Mass. Spect., 23(2), 310-320.

² Echterbille, J., et al., Ion mobility mass spectrometry as a potential tool to assign disulfide bonds arrangements in peptides with multiple disulfide bridges, 2013, Anal. Chem., 85(9), 4405–4413.

Utilisation de nouvelles matrices pour l'analyse de Polyoxoanions fonctionnalisés en MALDI-TOF

Jean Boulicault, Sandra Alves, Richard Cole

CSOB/IPCM, UPMC, 4 place Jussieu, 75005 Paris

La rapidité des analyses, couplée à sa gamme de masse élevée, font du MALDI-TOF une technique très utilisée dans divers domaines d'applications, principalement dans l'analyse de macromolécules synthétiques et/ou biologiques. Plusieurs modèles théoriques, souvent complétifs, tentent d'expliquer le principe de formation des ions en MALDI¹. Les connaissances dans ce domaine s'acquièrent surtout par empirisme car, à l'heure actuelle, aucun modèle théorique ne permet, par exemple, l'élaboration d'une préparation d'échantillon systématique et efficace pour toutes sortes de molécule. Dans cette optique il est intéressant d'étudier le mode négatif de cette technique, qui est bien moins développé, souvent ignoré, et cela dans le but d'apporter des connaissances supplémentaires en vue de réaliser des modèles théoriques décrivant son fonctionnement.

Dans notre projet, nous cherchons à développer une méthode d'analyse de Polyoxométalates (POMs). Ces composés ont la particularité d'être multichargés négativement ce qui les prédisposent aux études en mode négatif. Néanmoins, il n'y a guère d'études qui ont montré la possibilité de les étudier par la technique MALDI², notamment pour des POM fonctionnalisés. Les POMs analysés contiennent des fonctionnalisations organiques, utiles à leurs propriétés catalytiques, or ces groupements sont aisément perdus lors du processus MALDI. L'ajout de cations métalliques réduit l'état de charge de l'ion en phase gazeuse et a permis d'observer des ions moléculaires.

De nombreux essais systématiques ont été menés afin d'obtenir des ions moléculaires de POMs fonctionnalisés. Bien que de nombreuses matrices classiques donnent des signaux lorsqu'elles sont utilisées de façon particulière, les meilleurs résultats furent obtenus grâce à une matrice peu commune³. Il s'agit du 9-anthracène-carbonitrile qui s'est montré être la matrice la plus apte à permettre l'obtention d'ions moléculaires monochargés majoritaires. Ces anions apparaissent sous forme d'adduits avec des cations métalliques multichargés. Des études concernant la fragmentation de ces POM dans différentes matrices ont montré des différences de comportement selon la nature des matrices ainsi que des différences de fragmentations en source suivant les cations utilisés. Cette étude ouvre des nouvelles possibilités pour les analyses en MALDI-TOF en mode négatif avec la perspective de mieux caractériser les POMs.

1. Knochenmuss, R., MALDI Ionization Mechanisms: An Overview. In *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc.: 2010; pp 147-183.

2. Mayer, Cédric R.; Hervé, M.; Lavanant, H.; Blais, J.-C.; Sécheresse, F., Hybrid Cyclic Dimers of Divacant Heteropolyanions: Synthesis, Mass Spectrometry (MALDI-TOF and ESI-MS) and NMR Multinuclear Characterisation. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2004**, 2004 (5), 973-977.

3. Robins, C.; Limbach, P. A., The use of nonpolar matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of high boiling crude oil fractions. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **2003**, 17 (24), 2839-45.

Proteomic analyses along the rostro-caudal axis of injured spinal cord

Stéphanie Devaux¹, Dasa Cizkova², Françoise Le Marrec-Croq¹, Julien Franck¹, Lucia Slovinska², Ivana Grulova², Christophe Lefebvre¹, Isabelle Fournier¹,
Michel Salzet^{1**}

¹*Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée - EA 4550, Bât SN3, 1er étage,
Université de Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France*

²*Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Center of Excellence for Brain Research,
University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Soltesovej 4-6 Kocise, Slovakia*

Based on proteomic analyses we investigated the differences of the secretomes from rostral to caudal segments of injured spinal cord (SCI) at 3days. Proteins secreted from each spinal cord segment, incubated 24hr in vitro were analyzed by shot-gun using nanoLC coupled to orbitrap. Results showed some specific proteins at each site of the lesion. Among proteins from rostral and lesion segments, some are related to chemokines or to neurogenesis factors. In contrast, proteins from caudal segments are more related to necrosis factors. The effects of secretomes released from each segment of injured spinal cord have been tested on microglial BV2 cells in chemotaxis assays showing regionalization-dependent impact. Furthermore, chemotaxis assays and morphological studies confirmed the role of MSCs in immune response modulation of BV2 cells. A decrease of BV2 activation was observed when MSCs secretome has been added in culture. Proteomic analyses confirmed the presence of immune modulators and trophic factors. These data document that MSCs may act as regulators of microglial cell activation during SCI. Taken together, these data demonstrated that a polarization in the inflammatory and neurotrophic responses occurs between rostral and caudal segment in SCI. Study was supported by: APVV SK-FR 0019-11 (DC) Stefanic(MS), APVV 0472-11, Université de Lille 1 Région Nord Pas de Calais.

Structure of polyphenol clusters: an ion mobility study

Frédéric Poussigue¹, Arnaud Vernier^{1,2}, Jérôme Lemoine¹, Philippe Dugourd², and Fabien Chirot¹

CNRS & Université Lyon I, ¹UMR 5280 Institut des Sciences Analytiques and ²UMR 5306 ILM, 69622 Villeurbanne Cedex, France

Polyphenol clusters known as tannins have been identified as potentially involved in the early steps of the aggregation of salivary proteins, in relation with astringency¹. We used Ion Mobility Spectrometry and Mass Spectrometry techniques to investigate the structure and stability of the tannin clusters formed in solution as a function of their size. Our experimental setup was built by coupling an ion mobility drift-tube to a commercial micro-TOFQ. Using this device, two polyphenols systems were investigated, displaying different sizes and structural complexity: epicatechin (Ec) and epigallocatechin-gallate (EgCG). Those two analytes formed non covalent complexes of increasing complexity, according to the mass spectra recorded. Dominant species observed are doubly charged then, after a certain threshold reached, triply and quadruply charged, depending on the size of the tannin. Upon fragmentation, it appears that Ec aggregates tend to lose sequentially neutral molecules. On the contrary, fragmentation of EgCG clusters leads preferentially to dimers and trimers. Arrival Time Distributions and Collision Cross Sections (CCS) were then measured on each specie observed. It seems that only one structural family exists for each aggregate, for a given charge state, and that the CCS increase quite regularly with the number of constituents. CCS of higher charge state clusters are slightly higher but they follow the same evolution. Globally, we noticed that this evolution is slower than the one expected for unidimensional stacking, but does not correspond neither to a strict spherical structure. To understand this, structures of lowest energy were simulated using molecular dynamics methods and CCS were calculated on them using the trajectory method developed by Mesleh *et al.*². Computations reproduced fairly well the evolution observed and it seemed that clusters progressively take a spherical form, growing around a common neutral core of 3 tannins, allowing addition of new charges. That interpretation is also coherent with experimental data. Now, we investigate the interactions of the clusters with some peptides derived from a human salivary protein, the proline-rich intrinsically unfolded IB5.

1. Canon, F.; Ballivian, R.; Chirot, F.; Antoine, R.; Sarni-Manchado, P.; Lemoine, J.; Dugourd, P. Folding of a Salivary Intrinsically Disordered Protein upon Binding to Tannins. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7847–7852.
2. Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F. Structural Information from Ion Mobility Measurements: Effects of the Long-Range Potential. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16082–16086

Development of Laser Ablation and Droplet Capture towards a new ambient mass spectrometry technique

Benoit Fatou^{1,2}; Maxence Wisztorski¹; Cristian Focsa²; Michel Salzet¹; Michael Ziskind² ;
Isabelle Fournier¹

¹*Laboratoire de Spectrométrie de Masse Fondamentale, Biologique et Appliquée (FABMS), EA 4550, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France*

²*Laboratoire de Physique des Laser, Atomes et Molécules (PhLAM), CNRS UMR 8523, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France*

Ambient Mass Spectrometry techniques have known an important development over the past decade because of their versatility in terms of applications. In particular, it allows analyzing crude samples by direct access to native compounds with minimal sample preparation. Laser ablation coupled to MS (LA MS) is one of possible ambient strategy. In LA, the use of a laser beam has the advantage to decrease the area of sample studied. Here we present the development of a laser ablation/ droplet capture (LADC) ambient system. In this system, LA is performed in the visible wavelength at 532nm and the ablated material is subsequently captured in a droplet of solvent prior to analysis using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS). First we searched for optimization of the LADC system by studying several families of biomolecules such as lipids, peptides and proteins. Primarily, we optimized instrumental setup, laser energy, number of pulses, sample/droplet distance, and effect of the nature of sample support. These optimizations have shown that LADC followed by MALDI-MS analysis permits to differentiate the families of molecules according to the parameters described above. Obtained data from standard biomolecules demonstrate the potentiality of LADC for analyzing samples under ambient conditions. In addition, LADC can also be coupled to ESI-MS to avoid any matrix effect. Finally, this strategy could be a good way to analyze small area of samples and could find powerful applications in the field of clinics for comparison of molecular profiles from two closed regions of different cell phenotypes in tissue samples.

Action FRET: Probing the molecular conformation of mass-selected gas phase ions with FRET detected by mass-spectrometry only.

Steven Daly^{1,2}, Frederic Poussigue^{1,3}, Anne-Laure Simon^{1,2}, Luke MacAleese^{1,2}, Fabien Chiro^{1,3}, Rodolphe Antoine^{1,2}, Philippe Dugourd^{1,2}.

¹ Université de Lyon, F-69622, Lyon, France

² CNRS et Université Lyon 1, UMR5306, Institut Lumière Matière

³ CNRS et Université Lyon 1 UMR 5280, Institut des Sciences Analytiques

The use of Förster-resonance energy transfer (FRET) as a probe of the structure of biological molecules through fluorescence measurements in solution is well attested [1-4]. The transposition of this technique to the gas phase is appealing since it opens the perspective of combining the structural accuracy of FRET with the specificity and selectivity of mass spectrometry (MS). Recent works proved that FRET measurements can be achieved on trapped mass-selected ions [5-8]. However, fluorescence measurements under these conditions are challenging and rely on significant modification of standard MS equipment which impacts both sensitivity and resolution, and has made wide-ranging use of this technique difficult. Here, we present a methodology for measuring FRET in the gas-phase based on the detection of specific photo-fragmentation rather than fluorescence. This approach has the advantage of requiring only minor instrumental modification on a standard mass spectrometer. The structural sensitivity of the method was tested using commercially-available chromophores (QSY 7 and rhodamine 575) grafted on a series of small alanine based peptides. The light-induced fragmentation of these systems was investigated through action-spectroscopy, and their conformations were probed using ion mobility spectrometry (IMS) and Monte Carlo (MC) simulations. We show that specific excitation of the donor chromophore results in the observation of fragments that are specific to the electronic excitation of the acceptor chromophore when both chromophores are grafted on a small (3 residue) peptide. This shows that energy transfer took place between the two chromophores. Moreover, comparison with IMS and MC results gives evidence for a decrease of the fragmentation efficiency as the inter-chromophore distance increases, and shows that such action-FRET techniques is a new and sensitive probe of the structure of gas phase biomolecules. It opens new perspectives for the integration of mass spectrometry in structural biology.

[1] S. Weiss, *Science*, 283, 1676 (1999).

[2] P. R. Selvin, *Nature Structural Biology*, 7, 730 (2000).

[3] B. Schuler, E. A. Lipman, W. A. Eaton, *Nature*, 419, 743 (2002).

[4] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science*, 312, 217 (2006).

[5] A. S. Danell, J. H. Parks, *International Journal of Mass Spectrometry*, 229, 35 (2003).

[6] M. Dashtiev, V. Azov, V. Frankevich, L. Scharfenberg, R. Zenobi, *International Journal of Mass Spectrometry*, 16, 1481 (2005).

[7] F. O. Talbot, A. Rullo, H. Yao, R. A. Jockusch, *JACS*, 132, 16156 (2010).

[8] Macaleese, L.; Chiro^t, F.; Bazus, L.; Bertorelle, F.; Antione, R.; Lemoine, J.; Dugourd, P. *ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. Vancouver, 2012.

Développement d'une méthode de quantification des lipides par imagerie par spectrométrie de masse MALDI

Laure Jadoul^{1,*}, Rémi Longuespée¹, Delphine Debois¹, Gauthier Eppe², Edwin De Pauw¹

¹ *Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Département de Chimie, Université de Liège, 4000 Liège, Belgique*

² *Laboratoire de Chimie Analytique Inorganique, Département de Chimie, 4000 Liège, Belgique*

L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) couplée à une source de désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) permet de visualiser la distribution de molécules d'intérêt au sein de coupes de tissus biologiques. Cette technique relativement récente est aujourd'hui utilisée avec succès pour analyser qualitativement une importante variété d'espèces moléculaires. En revanche, la mise en œuvre de l'imagerie MALDI à des fins quantitatives reste difficile en raison de fortes variations du rendement d'ionisation liées à des effets de suppression/compétition d'ions qui surviennent lors de l'analyse d'échantillons biologiques complexes.

Au cours de ce travail, le développement d'une méthode de quantification des lipides par IMS MALDI a été entrepris. Notre approche repose sur l'utilisation d'une matrice de composition homogène qui résulte du broyage d'un tissu biologique d'intérêt à l'aide d'une technique appropriée. Après sa mise au point, cette matrice a été utilisée pour étudier des paramètres jugés comme étant critiques pour la quantification par MALDI car ils sont susceptibles d'influencer le rendement d'ionisation des molécules. Cette étude a porté principalement sur l'influence des conditions de préparation des échantillons ainsi que de l'environnement chimique et biologique qui existe dans ces échantillons. Parallèlement, nous avons amorcé le développement d'une méthode de quantification des lipides qui repose sur l'analyse simultanée d'une coupe biologique d'intérêt et de coupes de matrice homogène préalablement dopée avec un standard marqué isotopiquement.

Dans le futur, une telle méthode trouverait comme application l'étude *in situ* des modifications de profils lipidiques associées à des processus pathologiques. Elle pourrait également être appliquée à d'autres petites molécules permettant, par exemple, l'étude de la distribution de médicaments dans des zones saines, ou pathologiques, d'un tissu biologique.

Development of an analytical strategy for isomer separation of selenium compounds in selenium-rich yeast by tridimensional liquid chromatography coupled to high resolution ion mobility – mass spectrometry

Cédric Delvaux, Johann Far, Gauthier Eppe, Edwin de Pauw

Laboratoire de spectrométrie de masse, Université de Liège

Selenium is an essential oligo-element involved in numerous metabolic functions, mainly against oxidative stress. The common population Se-deficiency is often counteracted by a supplementation based on 'selenized' *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Different clinical trials suggested that Se supplementation helps to protect against various kinds of cancers¹ (e.g. prostate cancer) only if Se is provided as Se-rich yeast. Nowadays, more than 50 Se-containing species were identified in water yeast extracts². One, several or even putative metabolites of these species should be responsible for the observed protective effects. Moreover, some Se-containing compounds identified in Se-rich yeast are also found as structural isomer mixtures. Up to now, no analytical tool has the performances required to achieve the isomer ratio determination of such compounds.

The goal of my work was to develop a new versatile analytical strategy to separate the structural isomers of Se-species in Se-rich yeast in order to make the proof of concept that isomer ratios can be obtained. Multidimensional liquid chromatography allowed the pre-concentration of the most abundant Se-species presenting structural isomers. Ion mobility-mass spectrometry was the key step for the separation of the structural isomers and the determination of their ratio. The separation was attempted by ion-mobility of the native compounds and by ion-mobility after formation of specific complex to one of the isomer using a crown ether.

In the case of the native compounds, mobility data showed that both isomers of the selected compound were not resolved by Ion Mobility (IMS). Indeed, their Collision Cross Sections (CCS) were too close to allow their separation by IMS. In order to increase the difference in CCS, we decided to use complexation to specifically shift arrival times and improve IMS separation.

After specific complexation, mobility data indicated that the isomers were fully resolved by IMS. MS/MS spectra of both forms taken at their respective drift times showed the presence of fragments considered as characteristic and allowed to assign the isomers' structures. Two different methods of quantification permitted the ratio determination of free versus complexed form.

1. Lippman *et al*, Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: The selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *JAMA* **2009**, *301* (1), 39-51.
2. (a) Casal *et al*, Study of the Se-containing metabolomes in Se-rich yeast by size-exclusion—cation-exchange HPLC with the parallel ICP MS and electrospray orbital ion trap detection. *Metallomics* **2010**, *2* (8), 535-548;
(b) Preud'homme *et al*, Large-scale identification of selenium metabolites by online size-exclusion-reversed phase liquid chromatography with combined inductively coupled plasma (ICP-MS) and electrospray ionization linear trap-Orbitrap mass spectrometry (ESI-MSⁿ). *Metallomics* **2012**, *4* (5), 422-432.

Intégration de données protéomique et transcriptomique en vue du séquençage *de novo* à haut débit de toxines animales

Michel DEGUELDRE¹, Marion VERDNAUD², Frédéric DUCANCEL², Sheila ZUNIGA³, Juan Carlos TRIVINO³, Pierre ESCOUBAS⁴, Loïc QUINTON¹ and Edwin de PAUW¹

¹ *Laboratory of Mass Spectrometry, Department of Chemistry, University of Liege, Liege, Belgium*

² *iBiTEc-S/SPI Antibody Engineering for Health Laboratory (LIAS), CEA, 91191 Gif-sur-Yvette, France*

³ *Departments of New Technologies, R+D+I and Bioinformatics, Sistemas Genomicos Ltd, Valencia, Spain*

⁴ *Venometech, 06560 Valbonne, France*

Les animaux venimeux ont développé, au fil de l'évolution, un vaste arsenal de protéines et peptides réticulés par des ponts disulfures dans un but de défense ou de prédation. De par leurs séquences peptidiques, leurs repliements et leurs cibles biologiques, ces toxines représentent une grande diversité structurale et pharmacologique; ce qui en fait des candidats sérieux pour la recherche de médicaments novateurs [1,2].

Le projet européen Venomics (www.venomics.eu) propose une nouvelle approche haut débit permettant de non seulement caractériser d'un point de vue structural la multitude de composés bioactifs présents dans cette biodiversité (combinaison de techniques transcriptomiques et protéomiques), mais aussi de décrire finement leur activité biologique (synthèse chimique/biochimique et tests biologiques haut-débits). Cette approche sera appliquée à 200 espèces venimeuses distinctes.

Au niveau transcriptomique, les mRNAs sont extraits des glandes venimeuses et sont séquencés via une plateforme Illumina/Solexa. Les données sont ensuite annotées par différents outils bio-informatiques afin de prédire de potentielles toxines retrouvées dans le transcriptome, constituant ainsi une base de données utilisable pour filtrer les données générées en protéomique.

Le protocole suivi en protéomique repose tout d'abord sur l'extraction du venin à partir des glandes à venin. Les toxines sont alors séparées par μ HPLC puis réduites à l'aide d'un agent chimique. Chaque fraction primaire réduite est alors analysée par nano-LC-MS/MS. Le spectromètre utilisé, un Q-Exactive Orbitrap (Thermo, Waltham, MA, USA), permet d'obtenir une grande précision sur la mesure de masse (<5ppm) et un excellent rendement de fragmentation, notamment en mode HCD (High Collisional Dissociation). Les données MS/MS ainsi générées sont traitées par le programme de séquençage *de novo* Peaks 6 [3].

Les séquences peptidiques obtenues sont comparées aux séquences prédites par l'analyse transcriptomique. Ce travail a permis de mettre clairement en évidence qu'une séquence peptidique donnée, détectée en transcriptomique, est retrouvée dans le venin par protéomique sous la forme de plusieurs isoformes exprimées à des degrés différents de modification post-traductionnelles.

- [1] RJ. Lewis, ML. Garcia. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov.* 2(10): 790-802, 2003.
- [2] Vetter, I., et al., Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino acids*, 40(1): 15-28, 2010.
- [3] Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada : PEAKS, complete software for proteomics. (www.bioinfor.com)

Etude de la formulation de produits complexes par ASAP-IMMS

Caroline Barrère,¹ Florian Maire,¹ Pierre Giusti,² Amandine Racaud³ et Carlos Afonso¹

¹ Normandie Université, COBRA, UMR 6014 and FR3038, Université de Rouen; INSA de Rouen; CNRS, IRCOF, 1 rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

² TOTAL Refining & Chemicals, Total Research & Technology Gonfreville, BP 27, 76700 Harfleur, France

³ TOTAL Marketing Services, Research Center, 69360 Solaize, France.

Depuis la prise de conscience des risques liés à la présence d'un perturbateur endocrinien, le bisphénol A, dans les plastiques destinés aux nourrissons en 2010, l'identification des additifs dans ces matériaux est devenue un enjeu sociétal majeur. Par ailleurs, outre le contrôle qualité de produits finis, l'étude de la formulation des produits issus de la pétrochimie, tels que les plastiques ou les lubrifiants, est une étape essentielle au développement et à l'amélioration des produits, via des études de vieillissement par exemple. Bien qu'indispensable, l'étude de la formulation n'en reste pas moins un réel challenge analytique. En effet, la caractérisation des matériaux plastiques s'avère particulièrement difficile puisque d'une part ce sont des mélanges complexes, et d'autre part ils sont souvent très peu solubles dans les solvants usuels. De nombreuses stratégies d'analyse ont été reportées par spectrométrie de masse, mais s'avèrent longues et contraignantes à mettre en œuvre, puisqu'elles présentent des étapes d'extractions des additifs de la matrice polymérique.

Les travaux de recherches présentés ici ont permis de mettre au point une stratégie analytique innovante, rapide et sans préparation d'échantillon, basée sur l'utilisation d'une sonde d'analyse de solide à pression atmosphérique (ASAP) couplée à la mobilité ionique (IM) et la spectrométrie de masse (MS), pour l'identification d'additifs dans des matrices polymériques complexes, telles que des polypropylènes commerciaux (plastiques parmi les plus utilisés) ou des lubrifiants. En effet, puisqu'elle permet d'ioniser des composés sur une large gamme de polarité, la sonde ASAP s'est avérée particulièrement bien adaptée à l'étude de tels mélanges complexes. Les additifs ont ensuite été mis en évidence sur une carte 2D (m/z vs temps de dérive) obtenu par IM-MS.

Caractérisation structurale de complexes protéiques non covalents par Echanges Hydrogène/Deutérium couplés à la Spectrométrie de Masse

Guillaume Terral, Alain Van Dorsselaer, Sarah Cianférani

Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS UMR7178; 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

La caractérisation structurale de complexes protéiques est essentielle pour la compréhension des mécanismes biologiques qui peuvent y être associés. La spectrométrie de masse et plus précisément l'approche d'échanges hydrogène deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS) est une technique biophysique de choix pour ces études structurales¹.

Cette approche permet de déterminer les zones d'interactions² ou d'étudier la conformation³ des différents partenaires d'un complexe. Les informations sont ici déterminées en réalisant une comparaison de l'incorporation en deutérium sur les peptides issus d'une digestion pepsique en ligne suivie d'une analyse par LC-MS. Cette méthode se veut complémentaire d'autres techniques de biologie structurale pour ce type d'études comme la cristallographie ou la résonance magnétique nucléaire (RMN), et peut permettre de contourner les écueils de ces dernières (difficulté à produire des cristaux, la grande quantité de matériel biologique nécessaire ou encore la taille des édifices analysables). L'approche HDX-MS permet également d'accéder à des informations de dynamique en solution⁴.

Cette approche HDX-MS a été utilisée au laboratoire dans le cadre de plusieurs projets, notamment l'étude des zones d'interactions entre des anticorps thérapeutiques et de leurs antigènes associés. Ceci nous a permis de déterminer les épitopes alors qu'il reste encore très difficile de cristalliser ce type de protéines. Nous avons aussi appliqué cette démarche pour l'étude structurale d'un complexe catalytique à boîtes C/D impliquant des ARN et protéines nucléaires. Actuellement, la caractérisation structurale de certaines protéines impliquées dans cette machinerie d'assemblage par RMN ou cristallographie se heurte aux problèmes cités en amont. Il était ici question de déterminer les zones d'interactions afin de déterminer des bornes limites pour guider la production de protéines tronquées dans le but d'obtenir des cristaux.

1: Wei H, et al., Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications, *Drug Disc. Today*, (2014), 19, 95-102

2: Malito E., Faleri A. et al, Defining a protective epitope on factor H binding protein, a key meningococcal virulence factor and vaccine antigen, *PNAS* (2013), 110, 3304-3309

3: Engen J., Analysis of protein conformation and dynamics by HDX-MS, *Anal. Chem.* (2009), 81, 7870-7875

4: Houde D. et al., The utility of HDX-MS in biopharmaceutical comparability studies, *J. Pharm. Sciences* (2011), 100, 2071-2086

Location of adducted cations in electrosprayed PEO-PAMAM hybrid molecules: a combined MS/MS and ion mobility study

Christophe Chendo,¹ Aura Tintaru,¹ Qi Wang,¹ Stéphane Viel,¹ Gilles Quéléver,¹ Ling Peng,¹ Paola Posocco,² Sabrina Pricl,² Laurence Charles¹

¹ Aix-Marseille Université, Marseille, France – ² University of Trieste, Trieste, Italy

To improve the specificity of drug delivery, a poly(ethylene oxide) (PEO) polymer was functionalized with a poly(amido)amine (PAMAM) dendrimer to generate so-called PEO-PAMAM hybrid molecules, to be conjugated with antibody or peptide ligands. However, interactions experienced by PEO-PAMAM molecules with different cations in cell compartments during ligand transportation may affect their conformation and hence, their host properties.

Gas phase techniques such as mass spectrometry and ion mobility operating on cationized species were tested here for their ability to indicate charge location in doubly charged molecules generated by electrospray ionization. Owing to the nature of each part of these hybrid molecules, H⁺ and Li⁺ were first chosen as model cations in this preliminary study.

A PEO-like fragmentation behavior, usually described as a charge-assisted process, was observed upon activation of doubly protonated precursors. However, a detailed analysis indicates that most fragments, no longer holding the ω termination, were produced according to charge-remote reactions, thus suggesting that protons strongly interact with the dendritic α end-group. In contrast, location of the two adducted lithium on the PEO chain would account for the production of only a few doubly charged fragments typically arising from dissociation of the dendrimer. These results are consistent with the affinity of each segment of the molecules towards the studied cations and were further supported by molecular modeling and collision cross section calculation found to agree with ion mobility experiments. As compared to protonated molecules, alkali adducts would have a less compact conformation, consistent with polymer unfolding due to electrostatic repulsions when both charges are located on the PEO segment. Interestingly, NMR experiments also indicated preferential interaction of protons with the dendritic part in solution, suggesting that conformation adopted by PEO-PAMAM molecules in acidified media would not be strongly modified upon their transfer into the gas phase by electrospray.

Comparaison de différents modes de focalisation des ions primaires en imagerie par spectrométrie de masse d'ions secondaires TOF-SIMS et optimisation de l'extraction retardée

Quentin Vanbellingen; Nicolas Elie; David Touboul; Alain Brunelle

Centre de recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

La spectrométrie de masse d'ions secondaire (TOF-SIMS) est basée sur l'émission d'ions depuis une surface bombardée par des ions primaires. Il se produit lors de l'impact de ceux-ci un phénomène de désorption/ionisation. Les ions secondaires résultants sont extraits vers un analyseur à temps de vol (TOF). Cette méthode est particulièrement bien adaptée pour l'imagerie, car le faisceau pulsé d'ions primaires peut être focalisé à l'aide de lentilles électrostatiques [1-2].

Plusieurs modes de focalisation du faisceau d'ions primaires ont été comparés :

- Le mode *Burst Alignment* (BA), où une résolution spatiale inférieure au micron est atteinte, au prix d'une résolution en masse très modeste (~ 350 à m/z 385), à cause de la grande durée des impulsions d'ions primaires.
- Le mode *High Current Bunched Mode* (HCBM), où de courtes impulsions d'ions primaires permettent une bonne résolution en masse (~ 7000 à m/z 385), mais au détriment de la résolution spatiale ($\sim 3\mu\text{m}$).

Cependant, il existe aussi une extraction retardée dont l'utilisation est restée jusqu'à présent anecdotique en imagerie TOF-SIMS, alors que celle-ci permettrait d'améliorer la résolution en masse en mode BA [3].

Un spectromètre de masse TOF-SIMS IV (ION TOF GmbH) équipé d'une source délivrant des agrégats de bismuth (l'ion Bi_3^+ est sélectionné) à 25 keV et d'une extraction retardée a été employé pour ce travail. Le délai d'extraction en mode BA a été optimisé avec des pics d'ions de lipides détectés dans la zone du cervelet sur une coupe de cerveau de rat de $16\mu\text{m}$ d'épaisseur. Le diamètre du faisceau d'ions a été mesuré pour chaque mode de focalisation, et des images ioniques ont été enregistrées. L'utilisation de l'extraction retardée se révèle être un bon compromis, combinant à la fois une bonne résolution spatiale ($\sim 1\mu\text{m}$) et une résolution en masse suffisante pour l'attribution des pics (~ 2800 à m/z 385).

[1] Brunelle *et al* Journal of Mass Spectrometry 2005, 40 : 985-999

[2] Touboul *et al* Current Opinion in Chemical Biology 2011, 15 : 725-735

[3] Cersoy *et al* Journal of Mass Spectrometry 2012, 47 : 338-346

Analyses non ciblées pour la caractérisation moléculaire d'une variété originale de rose : 'Jardin de Granville'

L. Riffault^{1,2}, E. Destandau¹, L. Pasquier², P. André³, C. Elfakir¹

¹Univ. Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067 Orléans, France.

²LVMH Recherche, département Innovation Ethnobotanique, 185 avenue de Verdun, 45800 Saint-Jean-de-Braye, France.

³BOTANICOSM'ETHIC, 45170 Neuville Aux Bois, France.

La variété de rose 'Jardin de Granville', créée pour répondre aux attentes de Parfums Christian Dior, allie vigueur, résistance aux maladies, beauté et floraisons abondantes. De plus, cette variété a prouvé sa capacité à lutter contre les processus inflammatoires, permettant ainsi d'obtenir un ingrédient cosmétique de choix. Afin de mieux comprendre ce qui confère à 'Jardin de Granville' une telle activité biologique, un screening complet de la plante a été réalisé. L'objectif étant d'élaborer une cartographie moléculaire la plus exhaustive possible.

Dans un premier temps, pour chaque organe végétal, des extractions assistées par microondes ont été réalisées dans plusieurs solvants (éthanol, acétate d'éthyle et heptane) couvrant une large gamme de polarité afin d'extraire au mieux les différentes familles moléculaires susceptibles d'être présentes. Différentes techniques analytiques ont été ensuite développées pour déterminer la composition chimique de ces extraits bruts. Un premier screening par HPTLC a été mis en place, utilisant des révélateurs spécifiques des familles moléculaires. Puis des profils plus fins par HPLC-DAD-DEDL ont été réalisés pour détecter plus précisément les molécules au sein de chaque famille. Enfin deux méthodes par UHPLC-HRMS ont été mises au point pour caractériser les molécules : l'une par ESI-Q-TOF utilisée pour l'analyse des familles polaires et l'autre faisant appel à une source APPI pour les familles les moins polaires. Ainsi, une description fine des polyphénols, famille déjà bien connue dans la rose, a été réalisée avec l'identification de tanins galliques notamment et de dérivés de kaempférol et de quercétine. Concernant les familles moins polaires, rarement décrites, des triterpènes, des acides gras, des chlorophylles, des stérols, des glycolipides, des sphingolipides et des triglycérides ont été détectés et identifiés. Le grand nombre de structures moléculaires ainsi mis en évidence montre toute la richesse de 'Jardin de Granville' et donc son potentiel à posséder d'intéressants composés actifs.

Différenciation de topoisomères peptidiques par couplage spectrométrie de masse et mobilité ionique

Kevin Jeanne Dit Fouque,¹ Hélène Lavanant,¹ Salomé Poyer,¹ Séverine Zirah,² Yanyan Li,² Sylvie Rebuffat,² Julian D. Hegemann,³ Marcel Zimmermann,³ Mohamed A. Marahiel,³ Carlos Afonso¹

¹Normandie Univ UMR 6014, FR 3038; Univ Rouen; CNRS, Mont-Saint-Aignan, France

²National Museum of Natural History; UMR 7245 CNRS, Paris, France;

³Department of Chemistry, Biochemistry, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany

Les peptides lasso constituent une classe structurellement unique de peptides bioactifs bactériens, dont la topologie entrelacée est indispensable à l'activité biologique. Ces peptides sont caractérisés par un cycle macrolactame N-terminal dans lequel la queue C-terminale est insérée et piégée stériquement par des acides aminés encombrants. La topologie dite « cyclique branchée » dans laquelle la queue C-terminale n'est plus piégée par le cycle macrolactame est biologiquement inactive. Il est donc nécessaire de pouvoir mettre en évidence rapidement la topologie lasso du peptide étudié.

Nous avons utilisé pour cela, un couplage spectrométrie de masse et mobilité ionique (IM-MS) et étudié l'évolution des sections efficaces de collision en fonction de l'état de charge. En ce qui concerne les molécules multi-protonées de bas états de charge ($[M+2H]^{2+}$ et $[M+3H]^{3+}$), aucune séparation des topoisomères en mobilité ionique n'a été observée. Il apparaît que les sections efficaces de collision sont similaires et donc que la structure du peptide cyclique branché est repliée en phase gazeuse probablement en raison de la solvatation des charges. Cependant, pour les molécules multi-protonées de plus hauts états de charge ($[M+4H]^{4+}$), on observe une différence significative des temps de dérive des deux topoisomères, et donc une augmentation de la section efficace de collision du peptide cyclique branché. En effet, les répulsions de Coulomb deviennent prépondérantes, ce qui induit le dépliement de la queue C-terminale non piégée du peptide cyclique branché. Afin d'augmenter les états de charge des molécules protonées, du sulfolane ou du *m*-nitrobenzyl alcohol ont été ajoutés aux solutions comme proposé par Williams *et al.*¹. Aucune modification des temps de dérive n'a, par ailleurs, été observée suite à l'ajout de ces agents « superchargeants ».

¹ H. J. Sterling, M. P. Daly, G. K. Feld, K. L. Thoren, A. F. Kintzer, B. A. Krantz, and E. R. Williams, *JASMS*, **2010**, *21*, 1762-1774.

Real-Time conformational characterization of protein-ligand complexes by Native MS coupled to Ion Mobility

Johann Stojko¹, Stéphanie Petiot-Bécard¹, Sonia Fieulaine², Thierry Meinzel², Alain Van Dorsselaer¹, Carmela Giglione² and Sarah Cianférani^{1*}

¹ *Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS UMR7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France.*

² *CNRS, Centre de Recherche de Gif, Institut des Sciences du Végétal, Bâtiment 23A, 1 avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.*

Native Mass Spectrometry has become a powerful analytical technique to characterize non covalent assemblies, providing a dynamic gas phase snapshot of in-solution equilibrium species in terms of stoichiometry, relative affinities and specificities ¹. More recently, ion mobility (IM) implementation on last generation mass spectrometers has pushed the technology one step forward, offering an integrated approach to separate ions according to their size and conformation ². This additional conformational information also provides a spatial characterization of native ions through their collision cross sections (CCS) measurements ³, rendering this biophysical technique complementary to NMR, SAXS and X-ray crystallography.

Here, we will focus on native MS and IM-MS developments to decipher the interaction mechanism between Peptide Deformylase enzymes (PDF), anti-bacterial target proteins involved in the co-translational maturation of both eukaryotic and prokaryotic proteins, and selected inhibitors. Interestingly, we will focus on the ability of three potential inhibitors, actinonin, Ras358 and AB47, to interact with PDF1b, an extensively-studied eukaryotic model expressed in *Arabidopsis thaliana*. The aim of the project is to bring definitive evidences of the existence of a slow tight binding mechanism of some inhibitors to PDF1b, a process defined by the existence of different very close conformers.

In a first part, native MS efficiency to bring pivotal information for in-depth characterization of PDF1b-ligand complexes will be demonstrated. Based on titration and competition experiments monitored upon time, binding stoichiometries and specificities, as well as gas phase stabilities and solution affinities allowed us to get in-depth insights into dynamics of the ligand binding to PDF1b.

The second part of the presentation will highlight benefits of adding an additional level of conformational characterization by IM-MS for protein/ligand systems. Thanks to careful instrumental optimizations aimed at enhancing Ion Mobility resolution while preserving native interactions and conformations ⁴, we will see how this additional dimension of separation can be used to trap subtle conformational changes (< 1% in CCS) as a function of the studied ligand.

Altogether, our results, in agreement with crystallographic data ⁵, provide a supplementary proof of a slow tight binding mechanism existence between some inhibitors and PDF1b.

1: Arno Wortmann, Matthias C. Jecklin, David Touboul, Martin Badertscher, Renato Zenobi, Binding Constant Determination of High-Affinity Protein-Ligand Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Ligand Competition, *J. Mass Spectrom.*, 2008, 43:600-608.

2: François Debaene, Elsa Wagner-Rousset, Olivier Colas, Daniel Ayoub, Nathalie Corvaia, Alain Van Dorsselaer, Alain Beck, and Sarah Cianférani, Time Resolved Native Ion-Mobility Mass Spectrometry to Monitor Dynamics of IgG4 Fab Arm Exchange and “Bispecific” Monoclonal Antibody Formation, *Anal. Chem.*, 2013, 85 (20), pp 9785–9792.

3: Matthew F. Bush, Zoe Hall, Kevin Giles, John Hoyes, Carol V. Robinson, and Brandon T. Ruotolo, Collision Cross Sections of Proteins and Their Complexes: A Calibration Framework and Database for Gas-Phase Structural Biology, *Anal. Chem.*, 2010, 82 (22), pp 9557–9565.

4: Cedric Atmanene, Stephanie Petiot-Becard, Denis Zeyer, Alain Van Dorsselaer, Valerie Vivat Hannah, and Sarah Sanglier-Cianferani, Exploring Key Parameters to Detect Subtle Ligand-Induced Protein Conformational Changes Using Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2012, 84, 4703–4710.

5: Sonia Fieulaine, Adrien Boularot, Isabelle Artaud, Michel Desmadril, Frederic Dardel, Thierry Meinel, Carmela Giglione, Trapping Conformational States Along Ligand-Binding Dynamics of Peptide Deformylase: The Impact of Induced Fit on Enzyme Catalysis, *PLoS Biol.*, 2011, 9(5).

Détermination de l'incorporation isotopique par spectrométrie de masse, d'une protéine marquée ^{15}N , produite dans un système d'expression racinaire

R. Trouillard^a, M. Hubert-Roux^a, V. Tognetti^a, L. Guilhaudis^a, C. Plasson^b, L. Menu-Bouaouiche^b, L. Coquet^c, J. Hardouin^c, J. Ele ekouna^d, F. Guérineau^d, P. Cosette^c, P. Lerouge^b, M. Boitel^d, C. Afonso^a et I. Ségalas-Milazzo^a

^a Université de Rouen, COBRA, UMR 6014 CNRS, IRIB

^b Université de Rouen, Glyco-MEV EA 4358, IRIB

^c Université de Rouen, PBS, UMR 6270 CNRS, IRIB

^d Université d'Amiens, Biopi EA 3900

La glycosylation est la modification post-traductionnelle la plus répandue chez les protéines, pourtant son impact au niveau structural est très peu abordé. Deux grandes techniques, nécessitant une grande quantité de matériel, permettent de déterminer la structure 3D des protéines : la cristallographie et la résonance magnétique nucléaire (RMN). L'obtention de cristaux de protéines glycosylées étant très complexe, la RMN semble être la technique alternative, mais elle demande la production de protéines marquées avec des isotopes ^{15}N et ^{13}C . Un système efficace de production de protéines recombinantes est donc primordial afin d'obtenir les quantités de matériel marqué requis pour les analyses.

Le système d'expression le plus utilisé, *E. coli*, permet de produire de grandes quantités de protéines actives, mais n'assure pas la glycosylation. Aussi, nous avons entrepris d'explorer la possibilité de réaliser un marquage ^{15}N et/ou $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ de protéines exogènes glycosylées dans des racines, un système végétal en émergence. La GFP (Green Fluorescent Protein), protéine non glycosylée, a été utilisée comme modèle afin de trouver les conditions assurant un marquage optimal, avec un coût minimal, et n'entravant pas la croissance racinaire.

Dans un premier temps, nous avons débuté par la mise en place d'un protocole avec un simple marquage ^{15}N . Pour déterminer les meilleures conditions de marquage, il est indispensable de calculer l'efficacité de celui-ci, à savoir l'incorporation isotopique dans les protéines. La technique de choix pour cela est la spectrométrie de masse. Après digestion de la protéine par la trypsine, les peptides ont été analysés par MALDI-TOF. Au vu des massifs isotopiques complexes qui ont été obtenus, une méthode permettant de calculer de façon absolue la proportion de marquage isotopique de l'azote, a été mise au point. Ainsi l'incorporation isotopique ^{15}N de différentes conditions a pu être comparée, permettant l'élaboration d'un protocole de marquage plus efficace.

Mass spectrometry analysis of rat alveolar macrophages NR8383 secretomes and effect of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) down-regulation

Marie Duhamel

Laboratoire de spectrométrie de masse biologique, fondamentale et appliquée, Cité Scientifique, bâtiment SN3, 59655, Villeneuve d'Ascq

The proprotein convertase 1/3 (PC1/3) is known for its role in the activation of precursor proteins within the regulated secretory pathway in the nervous system and recently for its possible implication in innate immunity^{1, 2}. PC1/3 knock-out mice express a dysfunctional phenotype characterized by uncontrolled cytokine secretion without stimulation³. In a model macrophage cell line, NR8383 cells expressing PC1/3, similar results were observed. With the use of ELISA technique, an uncontrolled cytokines secretion was highlighting in NR8383 down-regulated for PC1/3 compared with NR8383 wild-type⁴. Our study aims to analyse the secretomes of NR8383 knock-out for PC1/3 and NR8383 wild-type by a proteomic study in order to obtain a global vision of secreted proteins overtime with a particular attention to chemokines and cytokines considered as members of the deep proteome. Secretome analysis were for a long time based on techniques employing antibodies necessitating to know what to track. In contrast, proteomic analyses offer to get a complete pattern of proteins implicated in a biological process. However, mass spectrometry based methods to detect low abundance proteins in complex secreted mixtures still remain a challenge. A shotgun approach has been undertaken and proteins in supernatants of macrophages were digested with lysC-trypsin and mixtures were directly analyzed by LC-MS. Chemokines and some cytokines have been selectively identified in course of analyses reflecting secretory pathways dependent or independent of PC1/3. Our data highlights the key role of PC1/3 in pro-inflammatory response regulation and macrophage polarization.

- (1) Lansac, G.; Dong, W.; Dubois, C. M.; Benlarbi, N.; Afonso, C.; Fournier, I.; Salzet, M.; Day, R. *J Neuroimmunol* **2006**, *171*, 57-71.
- (2) Day, R.; Salzet, M. *Cytokines: Stress and Immunity* **2006**, 283.
- (3) Refaie, S.; Gagnon, S.; Gagnon, H.; Desjardins, R.; D'Anjou, F.; D'Orleans-Juste, P.; Zhu, X.; Steiner, D. F.; Seidah, N. G.; Lazure, C.; Salzet, M.; Day, R. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 14703-14717.
- (4) Gagnon, H.; Refaie, S.; Gagnon, S.; Desjardins, R.; Salzet, M.; Day, R. *PLoS One* **2013**, *8*, e61557.

Profiling the cysteine redox proteome by isobaric Tandem Mass Tag reagents

Shakir Shakir, Chiappetta Giovanni, Vinh Joelle

ESPCI-ParisTech, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, CNRS USR 3149, 10 rue Vauquelin 75231 Paris, France

Reversible cysteine oxidation to form disulfide (-S-S-), sulfenic acid (-SOH-), S-nitroso (-SNO-) is a post-translational modification serving in many cellular functions. A systematic characterization of the cysteine redox state at proteomic scale (redoxome) is a key step to understand the thiol-redox based molecular mechanisms. Nowadays many strategies are available to reach this aim, meaning that the study of the redoxome is an important field of application of proteomics. The major issue of this kind of analysis is the high percentage of reduced cysteines in the cytoplasmic and nuclear fractions that could constitute 64% of the proteome. Moreover, among the shotgun proteomics strategies available, little attention has been paid to the changes in protein expression between control and treated samples. Our group has already developed a proteomic strategy, called OcSILAC, allowing to profile protein expression and cysteine oxidation.

In order to extend the field of application achievable also to samples unsuitable to SILAC protocols (tissues, sera, etc...) here we show an adaptation of OcSILAC workflow using isobaric Iodoacetyl-Tandem Mass Tag (iTMT) reagents.

Laboratory analogs of extraterrestrial organic residues: a key for the origin of organics in the Solar System

P. Modica, D. Lesage, L. d'Hendecourt

*IAS, UPMC, Institut d'Astrophysique Spatiale
Centre universitaire d'Orsay Bât 120 – 121, 91405 ORSAY CEDEX, 91400 Orsay*

In extraterrestrial environments, such as molecular clouds and protoplanetary disks, dust particles are coated by volatile icy mantles, with H₂O, CH₃OH, NH₃, CO, and CO₂, as the main molecular components. These mantles, during their lifetime, undergo several energetic processing which modify the pristine ices forming more complex molecules and non volatile structures called organic refractory residues. Comets and asteroids are thought to be formed by the aggregation of dust particles in the protoplanetary disk and to preserve almost unaltered the organic matter synthesized on dust particles. These bodies, bombarding the Earth after its formation, are thought to have seeded our planet with complex organic material and water which contributed to prebiotic processes.

In our laboratory we reproduce the physical conditions of extraterrestrial environments simulating the accretion of ices, their photo- and thermo-processing, and the formation of organic refractory residues. Starting with simple gas mixtures (H₂O, CH₃OH, NH₃) we end with soluble solid samples of organic refractory residues of high molecular complexity. Several analytical methods can be combined to infer their chemical composition and structure. Here we report the analysis by Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance/mass spectrometry (FTICR) on laboratory samples of organic refractory residue and on meteoritic samples of soluble organic matter. FTICR allows the analysis of these samples by direct infusion, without prior separation, and provides the study of the whole ionizable molecules in a wide mass range. In the laboratory samples we searched for specific organic molecules such as free amino acids and hexamethylenetetramine, and for unspecified large macromolecular structures; then we searched for the same kind of molecules in the meteoritic sample and compared the results.