



FRAGMENTATION DANS UNE SOURCE A ÉLECTRONÉBULISATION

Corinne Bure

► To cite this version:

Corinne Bure. FRAGMENTATION DANS UNE SOURCE A ÉLECTRONÉBULISATION. Autre.
Université d'Orléans, 2005. Français. NNT : . tel-00010600

HAL Id: tel-00010600

<https://theses.hal.science/tel-00010600>

Submitted on 13 Oct 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE D'ORLEANS

**THESE PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS**

Chimie analytique

PAR

Corinne BURÉ

**Fragmentation dans une source à électronébulisation
de biomolécules de synthèse :
Peptides thioester, acétal, aldéhyde et oligonucléotides bromés.**

Soutenue le : 30 juin 2005

MEMBRES DU JURY:

- Paul VIGNY	Professeur des Universités, détaché au CNRS	président
- Jeanine TORTAJADA	Directeur de Recherches, CNRS, Université d'Évry Val d'Essonne	rapporteur
- Olivier LAPRÉVOTE	Directeur de Recherches, CNRS, Gif sur Yvette	rapporteur
- Michel LAFOSSE	Professeur, Université d'Orléans	examineur
- Catherine LANGE	Professeur, Université de Rouen	co-directeur de thèse
- Agnès DELMAS	Directeur de Recherches, CNRS, Orléans	co-directeur de thèse

Le savoir que l'on ne complète pas chaque jour diminue tous les jours.

(Inconnu)

A Stéphane et Pierre,

A mes parents,

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Centre de Biophysique Moléculaire (CNRS – Orléans), dirigé par Monsieur Paul Vigny puis par Monsieur Jean-Claude Beloeil. Je les remercie de leur soutien et de m'avoir donné cette opportunité.

Je remercie vivement Madame Jeanine Tortajada, Directeur de Recherches à l'Université d'Evry, et Monsieur Olivier Laprévôte, Directeur de Recherches à l'ICSN de Gif-sur Yvette, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur Michel Lafosse, Professeur à l'Université d'Orléans, et Monsieur Paul Vigny, Professeur des Universités, détaché au CNRS, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame Agnès Delmas, Directeur de Recherches au CBM, de m'avoir encadrée et guidée durant ces années et de m'avoir permis de concilier ce travail de recherche avec l'activité de l'équipe de spectrométrie de masse.

Je remercie infiniment Madame Catherine Lange, Professeur à l'Université de Rouen, de m'avoir fait découvrir la spectrométrie de masse et d'avoir guidé et affirmé mes pas dans cette discipline.

Je voudrais exprimer ma gratitude à toutes les équipes du CBM, y compris leurs stagiaires, avec lesquelles j'ai été amenée à collaborer au cours de ce travail : 'Peptides et protéines de synthèse', 'Exobiologie', 'RMN' et 'Cristallographie'.

Je voudrais remercier les stagiaires que j'ai encadrés et qui ont contribué à ce travail, Wilfried Gobert et Olivier Boujard, ainsi que Stéphane Venot.

Je remercie également Madame Martine Cadène, Chargée de Recherches au CBM, d'avoir accepté de me laisser finir ce travail dans de bonnes conditions.

Un grand merci à Isabelle Frapart, notre bibliothécaire, pour m'avoir trouvé des références introuvables (et gratuites !), à l'équipe administrative et surtout à l'équipe technique et informatique (eh oui, encore une panne !).

Enfin, je remercie toutes les personnes, du CBM et d'ailleurs, qui ont contribué par leur soutien moral à rendre ces quatre années de thèse agréables. J'aurais une pensée particulière aux utilisateurs du service de spectrométrie de masse et à ma bande de filles...

Merci à mes parents pour leur soutien constant.

Merci à Stéphane pour son aide, son soutien et tout le reste (et il y en a beaucoup) et à mon petit Pierre, toujours prêt à me distraire et à dessiner sur mon manuscrit.

Liste des abréviations

BBI : Broad band Inverse (Inverse à large bande)
CID : Collision induced dissociation (Dissociation induite par collision)
CRM : Charge residue model ("Modèle du résidu chargé")
 E_{cm} : Center of mass energy (Energie de collision au centre des masses)
 E_{lab} : Laboratory energy (Energie de laboratoire)
ESI : Electrospray ionisation (Ionisation Electrospray)
eV : électronvolt
FAB : Fast atom bombardment (Bombardement par des atomes rapides)
For : formyl
Fpg : Formamidopyrimidine-DNA glycosylase
HPLC : High performance liquid chromatography (Chromatographie liquide haute performance)
ICRMS : Ion cyclotron resonance mass spectrometry (Spectromètre de masse à résonance cyclotronique)
IEM : Ion evaporation model ("Mécanisme d'évaporation de l'ion")
IT : Ion trap (Trappe ionique)
LSIMS : Liquid secondary ion mass spectrometry (Spectrométrie de masse d'ions secondaires d'échantillon liquide)
MAD : Multi wavelength anomalous dispersion (dispersion anormale par multi-longueur d'ondes)
MALDI : Matrix assisted laser desorption ionisation (Ionisation désorption laser assistée par matrice)
 m_i : Ion mass (Masse de l'ion)
MS : Mass spectrometry (Spectrométrie de masse)
MS/MS ou MS^2 : Tandem mass spectrometry (Spectrométrie de masse en tandem)
MS/MS/MS ou MS^3 : Three stage of mass spectrometry (Spectrométrie de masse à trois étages)
 m_{tg} : Target mass (Masse du gaz cible)
m/z : Rapport de la masse sur l'état de charges
ODN : oligodeoxynucleotide (oligodésoxynucléotide)
Pbf : pentaméthylidihydrobenzofuransulfonyl

PSD : Post-source decay (Décomposition en ion métastable)
Q : quadripôle
r.f. : radio fréquence
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SID : Surface-induced dissociation (Dissociation induite en surface)
tBu : tertibutyl
TFA : Trifluoroacetic acid (Acide trifluoroacétique)
TOF : Time of flight (Temps de vol)
TQ : Triple quadripôle
UV : Ultra violet
Vc : Tension appliquée sur le cône d'échantillonnage
Vcell : Tension appliquée sur la cellule de collision
Vop : Tension appliquée sur l' 'orifice plate'
z : état de charges

Nomenclature des acides aminés :

A	Alanine (Ala)
D	Acide aspartique (Asp)
E	Acide glutamique (Glu)
F	Phénylalanine (Phe)
G	Glycine (Gly)
H	Histidine (His)
I	Isoleucine (Ile)
K	Lysine (Lys)
L	Leucine (Leu)
P	Proline (Pro)
R	Arginine (Arg)
S	Sérine (Ser)
T	Thréonine (Thr)
V	Valine (Val)
W	Tryptophane (Trp)
Y	Tyrosine (Tyr)

Nomenclature des nucléotides :

BrdC	5-bromodésoxycytidine
BrdU	5-bromodésoxyuridine
dA	Désoxyadénosine
dC	Désoxycytidine
dG	Désoxyguanosine
dT	Désoxythymidine
dU	Désoxyuridine

Sommaire

INTRODUCTION	4
---------------------------	----------

CHAPITRE I : INTRODUCTION A LA FRAGMENTATION DE BIOMOLECULES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE EN IONISATION ELECTROSPRAY	6
---	----------

I. Spectromètre de masse quadripolaire en ionisation électrospray (ESI-MS)	7
I.1. Principe de l'ionisation électrospray (ESI)	7
I.2. Spectres de masse obtenus par ionisation électrospray.....	9
I.3. Principe de l'analyseur quadripolaire (Q)	11
II. Dissociation induite par collision (CID).....	13
II.1. Processus de collision.....	13
II.2. Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	15
II.2.a. Collision à haute énergie	15
II.2.b. Collision à basse énergie	16
II.2.c. Spectromètre de masse triple quadripolaire (TQ)	17
II.3. Dissociation induite par collision dans la source	19
II.3.a. Principe de la collision dans la source.....	20
II.3.b. Paramètres influençant la CID dans la source	21
II.3.b.1. Tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (Vc) ou sur l' 'orifice plate' (Vop).....	21
II.3.b.2. Géométrie de la source	21
II.3.b.3. Gaz résiduel	22
II.3.b.4. Température et pression dans la source.....	23
II.3.b.5. Phase mobile.....	23
II.4. Comparaison entre la CID dans la cellule de collision et la CID dans la source	24
II.4.a. Comparaison entre les deux modes de fragmentation	24
II.4.b. Conclusion.....	25
III. Fragmentation de biomolécules en spectrométrie de masse.....	26
III.1. Les peptides	26
III.1.a. Schémas de fragmentation.....	26
III.1.b. Composition de la séquence	29
III.1.c. Modèle du 'proton mobile'	35
III.2. Les oligonucléotides	36
III.2.a. Schémas de fragmentation.....	37
III.2.b. Composition de la séquence	37
IV. Revue.....	39

CHAPITRE II : COMPARAISON DE LA FRAGMENTATION DANS LA SOURCE ELECTROSPRAY ET DANS LA CELLULE DE COLLISION	52
--	-----------

I. Présentation des peptides thioester modèles	52
II. Comparaison de la fragmentation dans la source avec la fragmentation obtenue dans la cellule de collision	53
III. Efficacité de fragmentation en fonction de la longueur du peptide.....	58

IV.	Conclusion	59
V.	Publication	60

CHAPITRE III : FRAGMENTATION DANS LA SOURCE ELECTROSPRAY DE PEPTIDES ALDEHYDE ET ACETAL..... 66

I.	Fragmentation de peptides acétal et aldéhyde	67
I.1.	Présentation des peptides étudiés.....	67
I.2.	Comparaison entre les peptides acétal et les peptides aldéhyde	68
I.3.	Comparaison de la fragmentation des peptides acétal et aldéhyde dans la source et dans la cellule de collision	71
I.4.	Etude de la fragmentation dans la source des peptides acétal et aldéhyde	75
I.5.	Publication	77
I.6.	Mécanisme de fragmentation des peptides acétal et aldéhyde	85
II.	Hydratation de peptides aldéhyde et cétone et réaction d'oximation	98
II.1.	Etude de l'hydratation de peptides aldéhyde et cétone	98
II.1.a.	Peptides modèles	99
II.1.a.1.	Présentation des peptides modèles	99
II.1.a.2.	Etude de l'hydratation des peptides par fragmentation dans la source	100
II.1.a.3.	Etude de l'hydratation des peptides par résonance magnétique nucléaire (RMN)	104
II.1.b.	Peptides naturels	107
II.1.b.1.	Présentation des peptides	107
II.1.b.2.	Etude de l'hydratation des peptides par fragmentation dans la source	108
II.1.b.3.	Etude de l'hydratation des peptides par résonance magnétique nucléaire.....	112
II.1.c.	Discussion	114
II.2.	Ligation chimique par liaison oxime	116
II.2.a.	Cinétique de la réaction de ligation suivie par HPLC	118
II.2.a.1.	Cinétique de la réaction de ligation suivie par HPLC pour les peptides modèles.....	119
II.2.a.2.	Cinétique de la réaction de ligation suivie par HPLC pour les peptides naturels.....	122
II.2.b.	Discussion	126
II.2.c.	Conclusion	129

CHAPITRE IV : FRAGMENTATION DANS LA SOURCE ELECTROSPRAY D'OLIGODESOXYNUCLEOTIDES BROMES 131

I.	Présentation des oligodésoxynucléotides	131
II.	Publication	133
III.	Résultat complémentaire	155
IV.	Conclusion	156

CONCLUSION 157

PARTIE EXPERIMENTALE 159

I.	Etude de peptides thioester (chapitre II).....	159
II.	Etude de peptides acétal et aldéhyde (paragraphe I du chapitre II).....	160
II.1.	Obtention des peptides aldéhyde	160
II.2.	Paramètres d'analyse en spectrométrie de masse.....	160
III.	Etude des peptides aldéhyde et cétone (paragraphe II du chapitre II).....	161
III.1.	Obtention des peptides aldéhyde à partir de peptides acétal	161
III.2.	Quantification des peptides aldéhyde.....	161

III.3.	Paramètres d'analyse en spectrométrie de masse	162
III.4.	Paramètres d'analyse en RMN	162
III.5.	Ligation chimique suivie par HPLC	163
III.5.a.	Ligation chimique	163
III.5.b.	Méthode chromatographique.....	163
IV.	Etude des oligodésoxynucléotides (chapitre IV)	164

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....165

Introduction

L'ionisation par électrospray (ESI) est un processus d'ionisation 'doux' qui a permis, dans les années 80, d'obtenir l'information sur la masse de biomolécules [Meng et coll. 1988, Fenn et coll. 1988 et 1989]. L'ESI associée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) [De Hoffmann 1996] est un outil très puissant pour obtenir des informations structurales sur des biomolécules telles que la séquence primaire de peptides, en particulier lorsque leur N-terminal est bloqué, l'identification de modifications post-traductionnelles de protéines ou la localisation de ponts disulfure. Cet intérêt pour la fragmentation par spectrométrie de masse en tandem a eu pour conséquence de développer de nouveaux instruments, toujours plus performants.

En parallèle, des observations intéressantes ont été faites sur le comportement des enveloppes d'ions multichargés en faisant varier certains paramètres de la source d'ionisation, entre autres la tension appliquée sur une lentille de la source située dans une zone intermédiaire de pression [Loo et coll. 1988]. Des effets de collision ont été observés sur ces ions et ce phénomène a été nommé 'dissociation induite par collision (CID) dans la source'.

La CID dans la source est un phénomène mal connu et sujet à débat, d'où les comparaisons avec la CID obtenue par MS/MS [Harrison 1999b, Van Dongen et coll. 1999, Sadagopan et Watson 2000]. Nous avons voulu montrer que la CID dans la source, tout comme la CID dans une cellule de collision, pouvait 'apporter sa pierre à l'édifice' et qu'il était également possible, par des études de fragmentation dans la source, d'apporter des éléments de compréhension à des mécanismes de fragmentation ou réactionnel.

Le chapitre d'introduction rappelle le fonctionnement de l'ionisation électrospray et l'appareil utilisé. Nous avons effectué une comparaison bibliographique entre la CID dans la source et la CID dans une cellule de collision. Puis, nous avons rassemblé quelques paramètres influençant la fragmentation de biomolécules (peptides et oligonucléotides).

Ce mémoire présente ensuite nos résultats en trois parties.

La première partie consiste à évaluer notre instrument, un triple quadripôle Quattro II (Micromass), avec des peptides thioester, modèles monochargés de séquence simple, pour les deux modes de fragmentation: CID dans la source et CID dans la cellule de collision.

La deuxième partie porte sur la fragmentation dans la source de peptides acétal et aldéhyde. La particularité de ces peptides étant la perte d'une et de deux molécules de méthanol et d'eau, nous avons pensé que ces peptides se fragmentaient selon un mécanisme similaire que nous avons étudié. Puis, l'observation de la forme hydratée de l'ion peptide aldéhyde en phase gazeuse nous a conduit à comparer l'hydratation de peptides aldéhyde et cétone en solution par résonance magnétique nucléaire et en phase gazeuse par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ont permis une meilleure compréhension du mécanisme d'une réaction qui fait intervenir peptide aldéhyde et cétone comme partenaire électrophile, la réaction d'oximation.

La dernière partie consiste en la fragmentation dans la source mais, cette fois-ci, en mode négatif, d'oligodésoxynucléotides bromés dont la fragmentation principale correspond à la perte de la base bromée.

Chapitre I : Introduction à la fragmentation de biomolécules par spectrométrie de masse en ionisation électrospray

Jusque dans les années 80, les processus d'ionisation existant en spectrométrie de masse permettaient d'obtenir des informations sur des molécules moyennement thermolabiles, telles que leurs masses (ionisation chimique, bombardement par des atomes rapides) et leurs structures (impact électronique, FAB) grâce à un processus énergétique conduisant à la fragmentation.

A la fin des années 80, l'apparition de deux processus d'ionisation 'doux', c'est-à-dire peu énergétiques, a révolutionné la spectrométrie de masse, surtout dans le domaine des biomolécules. Ces deux processus sont la désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) [Tanaka et coll. 1987 et 1988, Karas et Hillenkamp 1988, Karas et coll. 1989] et l'ionisation électrospray (ESI: ElectroSpray Ionisation) [Meng et coll. 1988, Fenn et coll. 1989]. Ces deux méthodes sont complémentaires dans l'approche de l'analyse des biomolécules.

Le MALDI produit majoritairement des ions monochargés après irradiation laser de l'analyte co-cristallisé avec une matrice, petit composé organique qui absorbe à la longueur d'onde du laser. L'analyseur de masse couplé au MALDI doit pouvoir analyser des masses allant jusqu'à 100 à 200 kilodaltons. Il s'agit typiquement d'un analyseur à temps de vol (TOF: Time-Of-Flight).

L'ESI produit des ions multichargés en phase gazeuse, ce qui ne nécessite pas le couplage avec un analyseur possédant une gamme de masse très étendue. La source ESI peut être couplée à tout type d'analyseur. Comme l'ionisation électrospray requiert la mise en solution

de l'échantillon à analyser, elle permet un couplage direct avec des instruments de chromatographie liquide ou d'électrophorèse capillaire.

Grâce à ces deux processus d'ionisation, l'analyse de biomolécules connaît alors un essor considérable. Nous ne nous intéresserons dans ce mémoire qu'à l'ionisation électrospray.

I. Spectromètre de masse quadripolaire en ionisation électrospray (ESI-MS)

I.1. Principe de l'ionisation électrospray (ESI)

L'ionisation électrospray consiste à désolvater progressivement l'analyte ionisé en solution. Cependant, certains mécanismes impliqués dans le processus de l'ionisation électrospray sont encore mal connus et font l'objet de nombreux débats [Cole 2000, Kobarle 2000]. Le principe proposé de ce mode d'ionisation est le suivant:

L'analyte en solution est introduit dans la source à travers un capillaire métallique (figure 1). Entre ce capillaire et la contre-électrode (quelques millimètres) est appliquée une différence de potentiel de 3 à 6 kV induisant un fort champ électrique. En mode positif, ce champ électrique induit la migration des ions positifs du capillaire vers la contre-électrode. A la sortie du capillaire, les charges positives s'accumulent à la surface du liquide. Quand la répulsion entre les charges positives combinée à l'attraction du champ électrique dépasse la tension de surface du liquide, il y a formation d'un cône de Taylor [Kobarle 2000].

Toujours sous l'effet du champ électrique, le cône de Taylor se rompt pour former un filament qui produit des gouttelettes hautement chargées. Sous l'effet conjugué des gaz séchant et de nébulisation, du chauffage et du gradient de pression dans la source, le solvant des gouttelettes est évaporé (désolvatation), conduisant à des gouttelettes de plus en plus petites et de charge constante (figure 1).

Il est probable que la désolvatation ait lieu dans la zone de vide intermédiaire de la source, entre le cône d'échantillonnage et le 'skimmer' pour la source ESI de Micromass (figure 1) ou entre l' 'orifice plate' et le 'skimmer' pour la source ESI de PE Sciex, où la pression est de l'ordre du millibar. La désolvatation est d'autant plus efficace qu'on augmente la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage, V_c , ou la tension appliquée sur l' 'orifice plate', V_{op} , induisant un processus de collision plus efficace avec le gaz résiduel. De nombreuses études concernant la collision induite par dissociation (CID) dans la source ont été réalisées en faisant varier V_c ou V_{op} . Cette partie sera développée dans le paragraphe II.2.

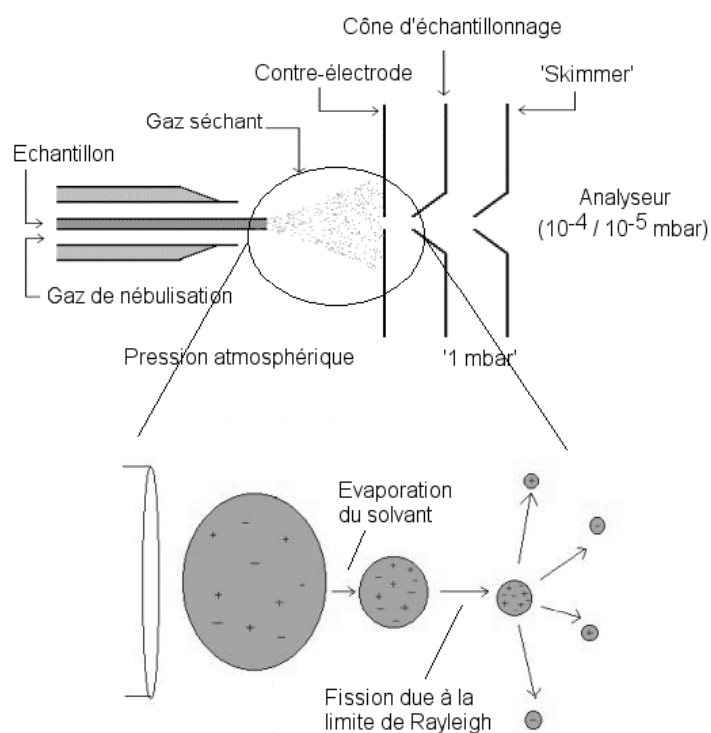


Figure 1 : Production de gouttelettes à l'interface de la source électrospray (Micromass).

Les gouttelettes explosent (explosion Coulombienne) quand la densité de la charge est suffisamment importante pour dépasser la tension de surface qui maintient les gouttelettes ensemble (limite de Rayleigh). Pour ce dernier point, deux théories principales se dégagent (figure 2). La première, proposée par Dole et coll. [1968] (figure 2a), est connue sous le nom du "modèle du résidu chargé" (CRM). D'après cette théorie, il se produit une série de fissions conduisant à des micro-gouttelettes finales comportant une ou plusieurs charges en excès

mais seulement une molécule d'analyte. La seconde théorie, proposée par Iribarne et Thomson [1976] (figure 2b), est nommée "mécanisme d'évaporation de l'ion" (IEM). D'après Iribarne et Thomson, quand l'évaporation du solvant et une série de fissions ont réduit la taille des microgouttelettes finales à un rayon de 10 à 20 nm, le phénomène qui prédomine est l'extraction directe des ions en phase gazeuse.

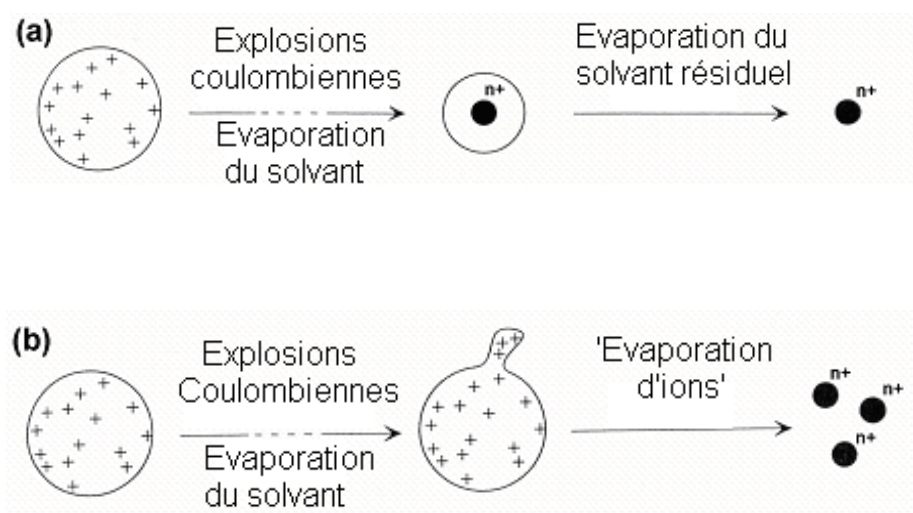


Figure 2 : Représentation schématique du modèle de Dole et coll. (a) et du modèle d'Iribarne et Thomson (b).

1.2. Spectres de masse obtenus par ionisation électrospray

L'ionisation électrospray conduit à la production d'ions multichargés, $[M+zH]^{z+}$, en phase gazeuse dans le cas des macromolécules biologiques. Ceci se traduit sur le spectre de masse par une enveloppe comportant plusieurs pics (figure 3), correspondant à une distribution statistique de charges qui dépend de la stabilité des ions multiprotonés en phase gazeuse. La masse moléculaire peut être déterminée à partir de deux pics consécutifs en considérant que les charges sont dues à des protons, avec une précision de 0,01%. Le calcul de la masse moléculaire est donné par l'équation 1 et correspond à la figure 3. M est la masse moléculaire, m correspond à un rapport m/z et n à un état de charge. Nous posons pour deux pics consécutifs:

$$m_1 = (M+z_1)/z_1 \text{ et } m_2 = (M+z_2)/z_2, \text{ avec } z_2=z_1+1$$

alors

$$M = \frac{m_1 - 1}{m_1 - m_2} \times (m_2 - 1)$$

Equation (1)

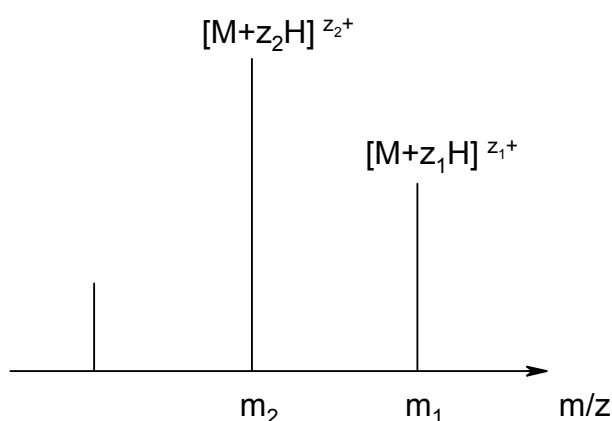


Figure 3 : Spectre de masse électrospray simplifié en mode positif.

Loo et coll. [1988] ont mis au point un prototype de source ESI comportant un 'nozzle orifice' et un 'skimmer' et ont montré que la tension appliquée sur le 'skimmer' avait une grande influence sur la forme de l'enveloppe constituée par tous les pics caractéristiques d'une biomolécule. En augmentant la tension appliquée sur le 'skimmer', cette enveloppe est déplacée vers les plus hautes valeurs de m/z et alors une diminution de sensibilité est observée pour les biomolécules (figure 4). Cette diminution de sensibilité peut être due à une fragmentation des ions multichargés et/ou au fait que les ions de faible m/z sont mieux détectés.

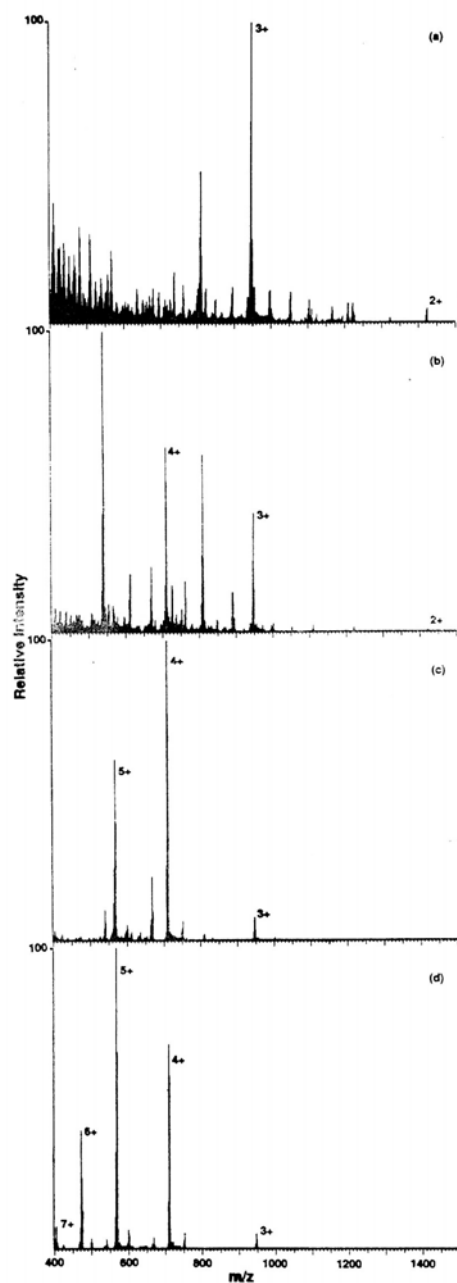


Figure 4 : Spectres de masse ESI en mode positif de la melittine avec une tension appliquée sur le 'skimmer' de (a) 370V, (b) 270V, (c) 220V et (d) 170V (d'après Loo et coll. [1988]).

I.3. Principe de l'analyseur quadripolaire (Q)

Plusieurs types d'analyseurs peuvent être couplés à une source électrospray: quadripolaire (Q), électromagnétique, temps de vol (TOF), trappe ionique (IT) et à résonance cyclotronique

(ICRMS). Celui que nous avons utilisé est un analyseur quadripolaire dont le principe a été décrit par Paul et Steinwedel [1953].

Les analyseurs quadripolaires sont des analyseurs à balayage. Ils sont constitués de quatre barres identiques connectées deux à deux électriquement (figure 5) et séparent les ions en fonction de leur rapport m/z .

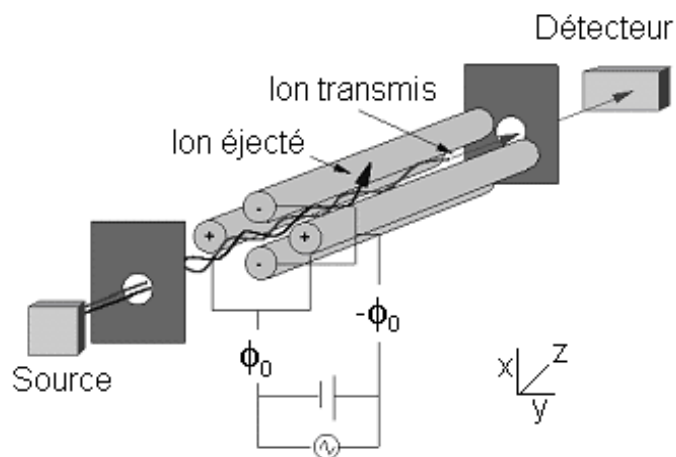


Figure 5 : Analyseur quadripolaire.

Les ions traversent le quadripôle selon l'axe z . Ils sont soumis au potentiel appliqué sur les barres (Φ_0 et $-\Phi_0$) qui comprend une composante continue U et une composante sinusoïdale $V\cos(\omega t)$:

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

ω : fréquence angulaire

En l'absence de tension continue ($U=0$), le quadripôle fonctionne en mode radio-fréquence uniquement.

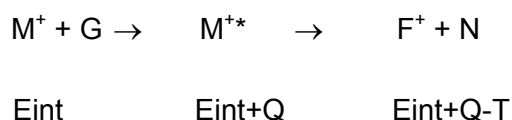
Pour séparer les ions en fonction de leur rapport m/z , on fait varier les valeurs de U et V tout en maintenant le rapport U/V constant. Les tensions appliquées affectent la trajectoire des

ions traversant les quatre barres. Pour des potentiels Φ_0 et $-\Phi_0$ donnés, seuls les ions possédant un certain rapport masse/charge passent à travers le filtre quadripolaire, les autres ions étant projetés hors de leur chemin originel. En effet, tant que simultanément les coordonnées x et y de l'ion, qui mesurent la distance par rapport au centre des barres, restent inférieures à r_0 (moitié de la distance entre deux barres opposées), l'ion pourra traverser le quadripôle sans toucher les barres. Dans le cas contraire, il s'y décharge et ne sera pas détecté.

II. Dissociation induite par collision (CID)

II.1. Processus de collision

Le processus de collision s'effectue en deux étapes. La première correspond à la collision entre l'ion et le gaz cible amenant une partie de l'énergie cinétique de l'ion à se convertir en énergie interne et conduisant l'ion à un état d'excitation. La deuxième étape correspond à une décomposition unimoléculaire de l'ion activé.



Au cours de l'activation, le niveau d'énergie interne de l'ion passe de E_{int} à $E_{int}+Q$ après transformation de l'énergie cinétique en énergie vibrationnelle et/ou électronique. Lors de la dissociation, l'excès d'énergie interne est en partie perdu sous forme d'énergie cinétique T .

La conservation de la quantité de mouvement et de l'énergie lors de la collision entre un ion et un atome de gaz implique que seule une fraction de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne pour les collisions inélastiques. L'énergie de collision au centre des masses (E_{cm}) est donnée par la formule suivante:

$$E_{cm} = E_{lab} \times \frac{m_{tg}}{m_{tg} + m_i}$$

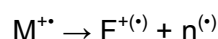
Equation (2)

où E_{lab} (énergie de laboratoire) est la quantité d'énergie cinétique de l'ion dans le référentiel du laboratoire, m_{tg} correspond à la masse du gaz cible et m_i à la masse de l'ion [Griffiths et coll. 2001b, Shukla et Futrell 2000].

Le rendement de collision dépend de la probabilité de décomposition de l'ion précurseur activé selon la théorie du quasi équilibre ou RRKM. En effet, deux théories presque identiques permettant de rendre compte des phénomènes observés pour des réactions monomoléculaires en phase gazeuse sous un vide poussé ont été proposées en 1952 : la théorie du quasi-équilibre (quasi-equilibrium theory : QET) [Rosenstock et coll. 1952] et la théorie RRKM (Rice, Rampsberger, Kassel, Marcus) [Marcus 1952]. Ces théories sont fondées sur quatre suppositions :

- le temps nécessaire à la dissociation de l'ion moléculaire dans sa structure initiale est plus long que le temps nécessaire à sa formation et son excitation
- la vitesse de dissociation est faible devant celle de la redistribution de l'énergie excitatrice initiale sur tous les degrés de liberté
- les fragments sont formés par une série de réactions unimoléculaires consécutives et compétitives
- les ions produits dans un spectromètre de masse représentent des systèmes isolés en état 'd'équilibre interne'

Soit une réaction de décomposition :



$k(E)$

où M^{+*} est l'ion moléculaire, $F^{+(*)}$ un fragment ionique, n un fragment neutre et $k(E)$ la constante de vitesse.

Par approximation de la théorie du quasi-équilibre, la constante de vitesse k est liée à l'énergie interne :

$$k(E) = \nu [(E_{int}-E_0)/E_{int}]^{S-1}$$

où ν est le facteur de fréquence qui caractérise l'état de transition de la réaction, E_{int} l'énergie interne de l'ion moléculaire avant fragmentation, E_0 l'énergie d'activation et S le nombre des oscillateurs.

Cette théorie nous indique que la constante de vitesse de la réaction de décomposition dépend de l'énergie interne de l'ion et du nombre d'oscillateurs. Ainsi, le type des ions fragments observés sur un spectre de masse MS/MS dépend, entre autres, de l'énergie interne de l'ion précurseur. Il peut être contrôlé par l'énergie de collision et le nombre de collisions [De Hoffmann 1996].

II.2. Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

La technique classique pour fragmenter des ions est la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Elle se décompose en trois catégories d'instruments: la MS/MS dans l'espace (deux analyseurs séparés par une cellule de collision, i.e. triple quadripôle, secteurs magnétiques et spectromètres de masse hybrides dont les plus courants sont actuellement les Q-TOF et Q-IT), la MS/MS dans le temps (un seul analyseur, i.e. trappe ionique, spectromètre de masse à résonance cyclotronique) et le cas particulier du PSD (Post-Source Decay sur les instruments de type MALDI-TOF) qui est un mélange des deux précédents.

II.2.a. Collision à haute énergie

Seuls les appareils électromagnétiques ou hybrides sont capables de travailler à de hauts potentiels d'accélération, donnant aux ions une énergie cinétique de l'ordre du

kiloélectronvolt (keV). A haute énergie, l'excitation de l'ion est principalement électronique. En effet, la conversion de l'énergie cinétique en énergie interne se déroule le plus efficacement quand le temps d'interaction de collision et la période du mode interne qui subit l'excitation sont comparables. Puis l'énergie acquise est ensuite redistribuée sous forme d'énergie vibrationnelle. Il en résulte une rupture des liaisons.

L'hélium est le gaz cible le plus commun utilisé dans des études CID à haute énergie. Il est efficace pour transférer de l'énergie via une excitation électronique et la perte d'ions fragments par dispersion angulaire est minimisée. Les réactions d'échange de charge sont relativement inopérantes en raison de l'énergie d'ionisation de l'hélium ($E_I=24.6$ eV). L'utilisation de gaz de poids moléculaire plus élevé peut entraîner plus de fragmentations sans nécessairement apporter plus d'informations. Il a néanmoins été montré que l'argon permettait d'augmenter les proportions d'ions fragments pour des peptides de masse > 1000 Da.

11.2.b. Collision à basse énergie

Les spectres de masse CID à basse énergie sont réalisés sur des instruments de type triple quadripôle, trappe ionique ou hybride avec une énergie de collision correspondant à quelques dizaines d'électronvolts, fournissant à l'ion des énergies cinétiques de 10 à 100 eV. La cellule de collision est le plus souvent un quadripôle fonctionnant en mode 'radio-fréquence uniquement' qui permet de focaliser les ions dispersés angulairement par la collision. A basse énergie, l'excitation des ions est principalement de nature vibrationnelle.

Les rendements en collision sont extrêmement élevés, en raison des fortes propriétés de focalisation du champ de radio-fréquence et à cause de la longueur de la cellule de collision qui permet des collisions multiples.

La nature du gaz de collision est plus importante pour les collisions à basses énergies que pour les hautes énergies. Utiliser un gaz plus lourd tel que l'argon ou le xénon permet

d'augmenter le rendement de fragmentation. En effet, ces gaz permettent d'obtenir des énergies internes plus élevées et, de par leur surface plus importante, un temps d'interaction avec la molécule plus long.

A de hautes énergies de collision, la fragmentation se produisant en une étape va dominer alors qu'à de faibles énergies, les fragments résultant de dissociations consécutives sont plus importants en raison du temps de résidence des ions plus long et de la pression plus importante dans la cellule de collision. Les fragmentations qui impliquent un réarrangement sont plus importantes sur des spectres obtenus à basse énergie car le temps de résidence des ions est plus élevé.

Nous allons développer le principe du spectromètre de masse triple quadripolaire, induisant des fragmentations à basse énergie, qui est l'instrument utilisé dans notre étude.

II.2.c. Spectromètre de masse triple quadripolaire (TQ)

Un spectromètre de masse triple quadripolaire (figure 6) comporte deux filtres quadripolaires, Q1 et Q3, séparés par une cellule de collision, Q2, construite initialement à partir d'un quadripôle, qui opère en radio-fréquences (r.f.) uniquement. Enfermer un quadripôle dans une cellule permet à la pression d'être augmentée à un niveau qui permet des collisions multiples de basse énergie. Les ions subissant des collisions multiples de basse énergie dans un temps relativement long (1-10 ms) vont avoir suffisamment d'énergie vibrationnelle pour se fragmenter, ce qui se caractérise dans un quadripôle par des fragmentations consécutives. De plus, la cellule de collision a la possibilité de recentrer les ions [Yates 1998].

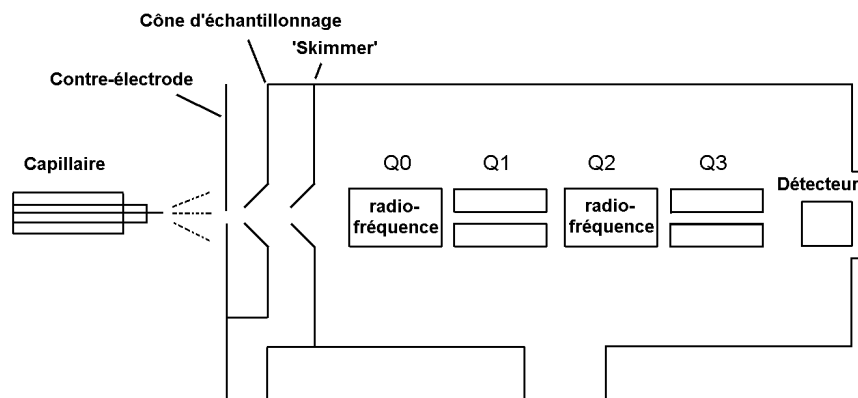
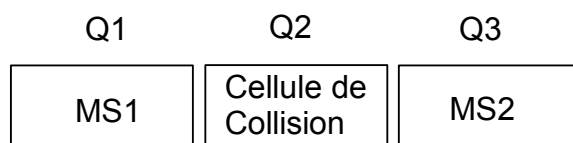


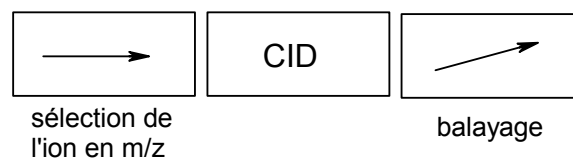
Figure 6 : Spectromètre de masse triple quadripolaire (Micromass).

Les deux analyseurs étant physiquement séparés par une cellule de collision, trois modes de balayages peuvent être réalisés (figure 7) [De Hoffmann 1996]:

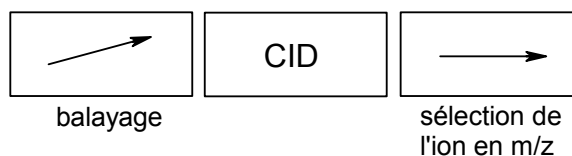
- (i) **le balayage des ions produits (ou ions fils).** L'ion précurseur (ou l'ion parent), sélectionné dans le premier analyseur, est fragmenté contre un gaz de collision dans la cellule de collision et les ions produits sont balayés.
- (ii) **le balayage des ions précurseurs (ou ions parents).** Les ions précurseurs sont balayés dans le premier analyseur et un ion produit est sélectionné dans le deuxième analyseur. Le spectre de masse résultant montre les ions précurseurs de l'ion produit choisi.
- (iii) **le balayage d'une perte de neutre.** Les deux analyseurs sont balayés en parallèle avec une compensation entre eux équivalente à la perte de neutre à observer. Seuls les ions qui se fragmentent avec cette perte de neutre sont détectés.



(a) Balayage d'ion produit



(b) Balayage d'ion précurseur



(c) Balayage d'une perte de neutre

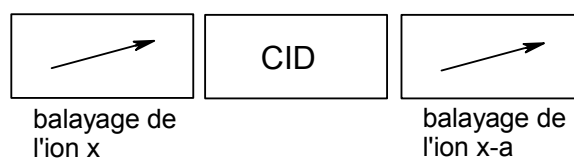


Figure 7 : Spectrométrie de masse en tandem dans l'espace avec ses trois modes de balayage: balayage d'ion produit ou ion fils (a), balayage d'ion précurseur ou ion parent (b) et balayage d'une perte de neutre (c).

II.3. Dissociation induite par collision dans la source

L'ionisation électrospray est un processus d'ionisation 'doux' qui ne génère pas d'ions fragments. Cependant, en 1988, Loo et coll. ont montré qu'il était possible de fragmenter des ions multichargés de grosses molécules en faisant varier la tension appliquée sur le 'skimmer'.

11.3.a. Principe de la collision dans la source

En spectrométrie de masse en ionisation à pression atmosphérique, les ions quittant le capillaire peuvent subir des collisions avec le gaz résiduel contenu dans la source (gaz séchant) et la fragmentation peut se produire en augmentant l'énergie interne de l'ion dans une des régions de plus haute pression à l'intérieur de la source. Par conséquent, l'accélération des ions peut être produite en faisant varier la tension appliquée sur le 'skimmer' sur un prototype [Loo et coll. 1988], en faisant varier la tension appliquée à la sortie du capillaire sur un instrument ZAB-E (Micromass) [Meng et coll. 1990], en faisant varier la tension appliquée sur l' 'orifice plate' sur un instrument API 165 (PE Sciex) [Collette et coll. 1998b, Weinmann et coll. 2001] ou en faisant varier la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (Vc) sur des instruments VG Platform (Micromass) [Collette et coll. 1998b, Harrison 1999b] (figure 8). Dans la suite de ce mémoire, nous nous intéresserons surtout à la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (instruments Micromass) et à la tension appliquée sur l' 'orifice plate' (instruments PE Sciex).

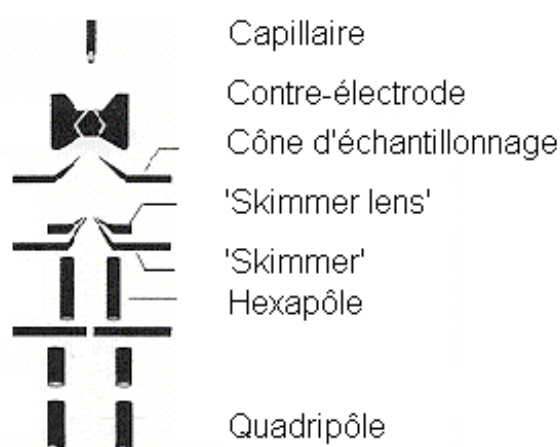


Figure 8 : Représentation schématique des lentilles d'une source électrospray construite par Micromass (VG Platform).

Plus le champ électrique dans cette région est augmenté, plus l'énergie interne impartie dans la décomposition des ions est importante. Ce phénomène est variablement nommé 'in-source CID', 'up-front CID', 'cone-voltage CID', 'nozzle-skimmer dissociation' ou 'nozzle-

skimmer fragmentation'. Nous l'appellerons CID dans la source. La CID dans la source est un processus de basse énergie.

II.3.b. Paramètres influençant la CID dans la source

II.3.b.1. Tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (Vc) ou sur l' 'orifice plate' (Vop)

De nombreuses études concernant la CID dans la source ont été réalisées en faisant varier la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (Vc) ou sur l' 'orifice plate' (Vop). L'augmentation de Vc ou Vop induit une accélération des ions dans la région de pression intermédiaire qui permet la CID au contact des molécules de gaz résiduel. Le taux de fragmentation dépend de l'énergie cinétique que les ions peuvent acquérir par collisions avec le gaz résiduel. Plus Vc ou Vop sera élevé, plus le taux de fragmentation sera important [Collette et coll. 1998b, Collette et De Pauw 1998a]. Weinmann et coll. [2001] ont comparé trois instruments différents (API 365, 2000 et 3000) provenant du même constructeur (PE Sciex) et ont établi avec de petites molécules des courbes de tension de correspondance pour les trois instruments, ce qui montre que la valeur de Vc ou Vop est dépendante de l'instrument. Cependant, il serait intéressant de vérifier s'il est possible de généraliser ces courbes de concordance.

II.3.b.2. Géométrie de la source

La géométrie de la source influe également sur la fragmentation. Les constructeurs proposent des géométries de source différentes qui modifie l'énergie impliquée dans la fragmentation de l'ion.

Collette et coll. [1998b] ont comparé les distributions en énergie interne obtenues avec deux sources électrospray différentes provenant de deux constructeurs différents (Micromass et PE Sciex) en maintenant la même tension (35V) pour les deux instruments, i.e. sur le cône

d'échantillonnage (Micromass) et sur l' 'orifice plate' (PE Sciex). Ils montrent que la distribution en énergie interne obtenue avec l'instrument Micromass est déplacée vers de plus hautes énergies que celle obtenue avec l'instrument PE Sciex. L'énergie interne ne dépend donc pas seulement de la tension appliquée dans la région d'accélération mais aussi d'autres paramètres expérimentaux. Ils supposent alors que les tensions appliquées sur les différentes lentilles, telles que l'anneau de focalisation (PE Sciex) ou la tension d' 'offset' entre le cône et le 'skimmer' (Micromass), ont un énorme effet sur la fragmentation. Les différences de fragmentation entre les deux instruments peuvent être attribuées à l'optique de l'instrument. La transmission des ions dépend également de cette optique. Ainsi, les expériences montrent qu'une calibration en énergie interne des ions basée sur la théorie RRKM est nécessaire afin de pouvoir comparer deux instruments différents.

Schneider et coll. [2001] ont mis au point un prototype de source ESI comportant un 'orifice plate' et un 'skimmer' et s'appuient sur des calculs théoriques pour montrer que le diamètre du trou du 'skimmer' doit être diminué afin d'augmenter le taux de fragmentation dans le cas d'un gaz monoatomique. En effet, un diamètre plus large favorise la formation d'agrégats. L'ion précurseur s'incorpore dans un agrégat et y dépose son énergie interne. Ainsi, l'énergie est répartie au sein de cet ensemble [agrégat+ion] et il est nécessaire d'augmenter la différence de potentiel pour fragmenter. Cependant, plus le diamètre de l'orifice est petit, plus la transmission des ions est faible et par conséquent, plus la sensibilité diminue.

II.3.b.3. Gaz résiduel

La masse du gaz résiduel a un rôle important dans le processus de fragmentation. D'après l'équation (2) page 16, plus la masse des molécules de gaz est importante, plus le taux de fragmentation de la molécule étudiée augmente. Cependant, Schneider et coll. [2001] ont montré qu'en comparant l'azote, l'argon et le krypton, ils obtenaient des taux de fragmentation inversés. Ce résultat inattendu proviendrait d'un phénomène de condensation des gaz monoatomiques entre l' 'orifice plate' et le 'skimmer'.

Collette et De Pauw [1998a] ont comparé deux gaz proches en masse, l'argon et le dioxyde de carbone, conduisant à des taux différents de fragmentation. Cela proviendrait du fait qu'une partie de l'énergie lors de la collision serait transférée en énergie vibrationnelle du dioxyde de carbone.

II.3.b.4. Température et pression dans la source

Ces deux paramètres influent sur la formation d'agrégats dans la source et, par conséquent, sur la collision et sur le taux de fragmentation. Des pressions et des températures élevées dans la source vont défavoriser la formation d'agrégats [Schneider et coll. 2001] et ainsi favoriser la fragmentation par le même phénomène évoqué précédemment dans le paragraphe II.2.b.2.

II.3.b.5. Phase mobile

La composition de la phase mobile (pourcentage de solvant organique et de tampon volatil, pH) a un rôle important sur la désorption de l'ion en spectrométrie de masse en ionisation électrospray. La composition de la phase mobile ne semble pas avoir d'influence sur le processus de fragmentation lorsqu'il s'agit de solvants classiques tels que le méthanol, l'acétonitrile ou l'eau [Bogusz et coll. 1999, Weinmann et coll. 1999].

Cependant, Collette et De Pauw [1998a] ont montré que l'utilisation d'un co-solvant tel que le glycérol pouvait influencer sur la fragmentation. Le glycérol a une plus faible tension de vapeur que les solvants classiques utilisés en ESI mais une viscosité plus importante, ce qui l'empêche d'être utilisé pur. La présence de glycérol (10%) dans la phase mobile, avec $V_c=15V$, déplace la distribution en énergie interne vers de plus hautes valeurs. Pendant le processus d'évaporation, l'eau s'évapore avant le glycérol, ce qui induit une surface des gouttelettes enrichie en glycérol où les ions se trouvent piégés. Trois hypothèses sont émises pour expliquer un plus fort taux de fragmentation en présence de glycérol. La première dit que les ions sont émis en phase gazeuse par désorption de champ avec une

énergie cinétique locale plus importante induisant des collisions plus énergétiques. La deuxième est basée sur le fait que la couche de glycérol ne peut pas se dissiper par évaporation de la chaleur de friction causée par le déplacement de la gouttelette dans le champ électrique à pression atmosphérique. Ainsi, la température en surface des gouttelettes est augmentée et de ce fait l'énergie interne des ions. La troisième concerne l'énergie de désolvatation qui est plus importante pour les agrégats entre les ions et le glycérol. Cette dernière hypothèse n'a pas été retenue car les agrégats n'ont pas été observés sur les spectres.

II.4. Comparaison entre la CID dans la cellule de collision et la CID dans la source

II.4.a. Comparaison entre les deux modes de fragmentation

La différence majeure entre la collision dans la source et la collision dans une cellule est le processus de désolvatation qui intervient dans la source et n'intervient pas dans la cellule de collision. La fragmentation dans la source est un phénomène encore mal connu. Nous ne savons pas (i) quand interviennent précisément le processus de désolvatation et le processus de collision, ces deux phénomènes étant également liés au type d'appareillage, (ii) quelle est la part d'énergie de collision, induite par l'augmentation de la tension appliquée sur une lentille de la source, utilisée dans le processus de désolvatation et dans le processus de fragmentation et (iii) quelle est l'influence de la pression intermédiaire dans la source.

Ces deux processus de fragmentation sont de basse énergie. Le meilleur moyen de les comparer est d'utiliser des graphes de fragmentation, i.e. des graphes représentant l'intensité des ions fragments en fonction des tensions appliquées sur les lentilles [Harrison 1999a, 1999b, Makowiecki et coll. 2001 and Pais et coll. 1997]. Dans les deux modes de fragmentation, les schémas de fragmentation sont en général similaires. La même information structurale peut être obtenue pour des peptides [Harrison 1999b, Van Dongen et coll. 1999, Sadagopan et Watson 2000] et des petites molécules chimiques [Harrison 1999a, Makowiecki et coll. 2001, Doerge et Bajic 1995]. Même si un ion fragment est commun dans les deux modes, l'intensité peut être différente. En comparant les deux processus de fragmentation, les ions fragments de faible m/z obtenus dans la source sont plus abondants

qu'en MS/MS [Harrison 1999b, Voyksner et Pack 1991]. D'après Harrison [1999b], des énergies internes effectives plus importantes peuvent être obtenues en source plutôt qu'en MS/MS. De plus, il observe que s'il augmente trop la pression en gaz de collision et l'énergie de collision, la transmission des ions diminue de façon drastique.

II.4.b. Conclusion

La collision dans la source apparaît être un processus de basse énergie à multiples collisions. Les ions fragments produits dans la source sont similaires à ceux observés en spectrométrie de masse en tandem, conduite dans des conditions de basse énergie (TQ, IT, Q-TOF, ICRMS), alors qu'ils sont différents mais complémentaires des ions fragments obtenus en MS/MS à de haute énergie (secteurs électromagnétiques). En particulier, la collision dans la source semble avoir un processus de fragmentation similaire à celui de la spectrométrie de masse en tandem de basse énergie lorsque l'instrument est un triple quadripôle (même type d'énergie).

La collision dans la source peut générer des informations structurales fiables à condition que l'échantillon à analyser soit pur. Dans ce cas, l'utilisation de la collision dans la source a l'avantage d'être plus rapide et plus facile d'utilisation puisqu'il y a moins de paramètres à faire varier. Faire de la collision dans la source nécessite, dans notre cas, de faire varier la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage. Dans la cellule de collision, il faut d'abord optimiser la valeur de V_c pour augmenter le courant ionique de l'ion précurseur, puis optimiser la pression en gaz de collision et enfin faire varier la tension appliquée sur la cellule de collision. Les réglages de l'appareil sont un peu plus contraignants en MS/MS. Cependant, les appareils récents sont de plus en plus faciles d'utilisation.

La maîtrise de la fragmentation dans la source apporte également l'avantage de pouvoir continuer à travailler en 'pseudo-MS²' en l'absence de deuxième analyseur.

Les résultats obtenus en utilisant ces deux techniques peuvent amener à penser à de futures stratégies, i.e. faire de la 'pseudo-MS³' avec un instrument de configuration MS² [Chen et coll. 2001 sur un ESI-TQ, Ginter et coll. 2004 sur un ESI-Q-TOF].

III. Fragmentation de biomolécules en spectrométrie de masse

Afin de faciliter la compréhension des parties suivantes, nous préférons rappeler la nomenclature des ions fragments que nous utiliserons lorsque nous aborderons la partie concernant les résultats. Cette partie concernera uniquement les molécules biologiques étudiées: les peptides et les oligonucléotides.

III.1. Les peptides

III.1.a. Schémas de fragmentation

La nomenclature a tout d'abord été suggérée par Roepstorff et Fohlman [1984], puis modifiée par Biemann [1988]. Nous avons choisi cette dernière.

La rupture d'une liaison de la chaîne peptidique peut avoir lieu au niveau de trois types de liaisons C α -C, C-N ou N-C α pour donner six types de fragments désignés par a_n, b_n et c_n si la charge positive est retenue par le côté N-terminal et par x_n, y_n et z_n si la charge positive est retenue par le côté C-terminal. Pour les ions c_n et y_n, il y a un transfert de deux atomes d'hydrogène supplémentaires. Le nombre en indice correspond au nombre d'acides aminés contenus dans le fragment (schéma 1).

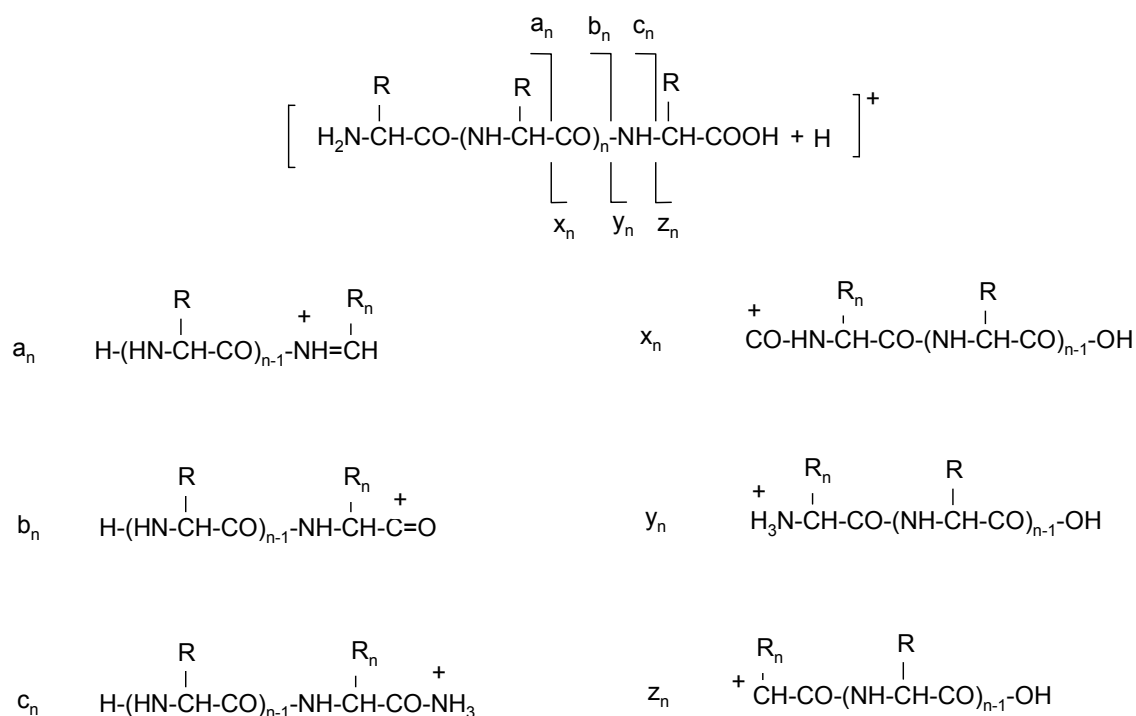


Schéma 1 : Voie de fragmentation séquentielle des peptides obtenue par CID à basse et haute énergie. R correspond à la chaîne latérale de l'acide aminé.

Les spectres de masse CID à basse et haute énergie des peptides montre la fragmentation du squelette peptidique. Bordoli et Bateman [1992] ont observé, sur un instrument de type FAB-secteurs magnétiques en tandem (AutoSpec-T, VG Analytical) et en utilisant de l'hélium comme gaz de collision, que la rupture du squelette peptidique correspond à une E_{cm} en dessous de 20 eV.

Yalcin et coll. [1995 et 1996] ont montré que les ions b_n ne sont pas des ions acylium acycliques mais semblent se réarranger en des structures plus stables pendant leur formation, structures comparables à des oxazolones protonées (schéma 2).

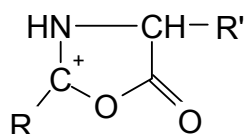


Schéma 2 : Ions fragments b cycliques d'après Yalcin et coll. [1996].

Deux autres types d'ions fragments observés dans la plupart des spectres résultent de la rupture d'au moins deux liaisons internes de la chaîne peptidique (schéma 3). Le premier type d'ion fragment provenant de ruptures multiples de la chaîne peptidique apparaît dans les basses masses du spectre. Ce sont les ions immoniums des acides aminés, représentés sur les spectres par une lettre correspondant au code des acides aminés dont ils dérivent. Cependant, ces ions sont rarement observés pour tous les acides aminés du peptide. Le second type d'ion fragment est appelé ion fragment interne car ils ont perdu les côtés N et C-terminaux initiaux. Ils sont représentés sur les spectres par une série de simples lettres correspondant à la séquence du fragment.

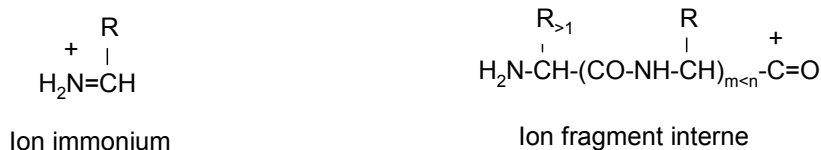


Schéma 3 : Ions fragments obtenus par rupture de deux liaisons de la chaîne peptidique, à basse et haute énergie.

Trois autres types d'ions fragments issus de la rupture de la chaîne peptidique et de la chaîne latérale de l'acide aminé ont été mis en évidence avec des processus à haute énergie uniquement (schéma 4).

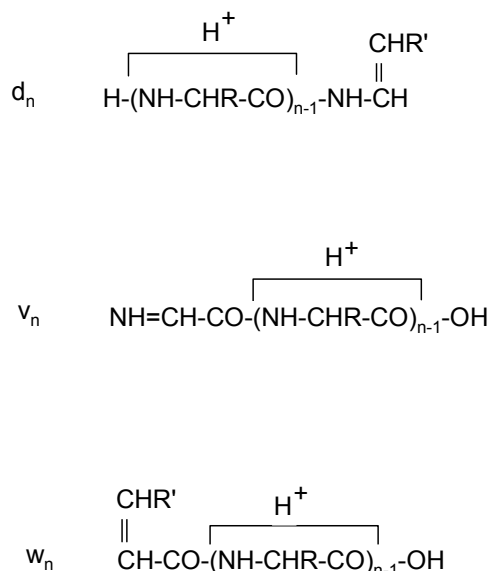


Schéma 4 : Ions fragments caractéristiques des chaînes latérales des acides aminés, obtenus avec des processus à haute énergie.

Bordoli et Bateman [1992] ont montré, sur un instrument de type FAB-secteurs magnétiques en tandem (AutoSpec-T, VG Analytical) et en utilisant de l'air comme gaz de collision, que pour pouvoir fragmenter les chaînes latérales, une E_{cm} de 20-25 eV est nécessaire. Ces ions fragments sont utiles pour différencier les isomères leucine et isoleucine.

III.1.b. Composition de la séquence

*** Cas des séquences contenant une proline**

Il est connu que la protonation et la rupture de la liaison amide située en N-terminal d'une proline est favorable. Les ions fragments y et b correspondants peuvent dominer le spectre de masse CID de peptides alors que la rupture de la liaison amide en C-terminal d'une proline est rarement observée. Ce phénomène est appelé l' 'effet proline' [Tang et coll. 1993, Adamczyk et coll. 1999]. De même, une rupture favorable de la liaison Gln-Gly (ions y et b) a été observée par Griffiths et Jonsson [2001a] surtout lorsque le motif Gln-Gly-Pro est présent dans la séquence.

*** Nature et localisation des acides aminés basiques dans la séquence de peptide**

L'équipe de Wysocki [Jones et coll. 1994, Dongré et coll. 1996] a mis en évidence que la position de l'acide aminé basique avait une influence sur les ions fragments observés. La localisation d'un acide aminé basique à une extrémité du peptide oriente la nature des ions fragments obtenus, b ou y [Tang et Boyd 1992, Tang et coll. 1993, Tsaprailis et coll. 2000, Downard et Biemann 1994]. Dans le cas des peptides tryptiques [Tang et Boyd 1992], un acide aminé basique est localisé en C-terminal (figure 9a): les ions y, caractéristiques du côté C-terminal où la charge est retenue, dominant sur le spectre de masse CID. De façon similaire, la localisation d'un acide aminé basique du côté N-terminal induit une prédominance des ions b [Tang et coll. 1993] (figure 9b). Cependant, si le résidu basique est localisé à l'intérieur de la séquence [Tang et coll. 1993], aucune série d'ions fragments n'est favorisée.

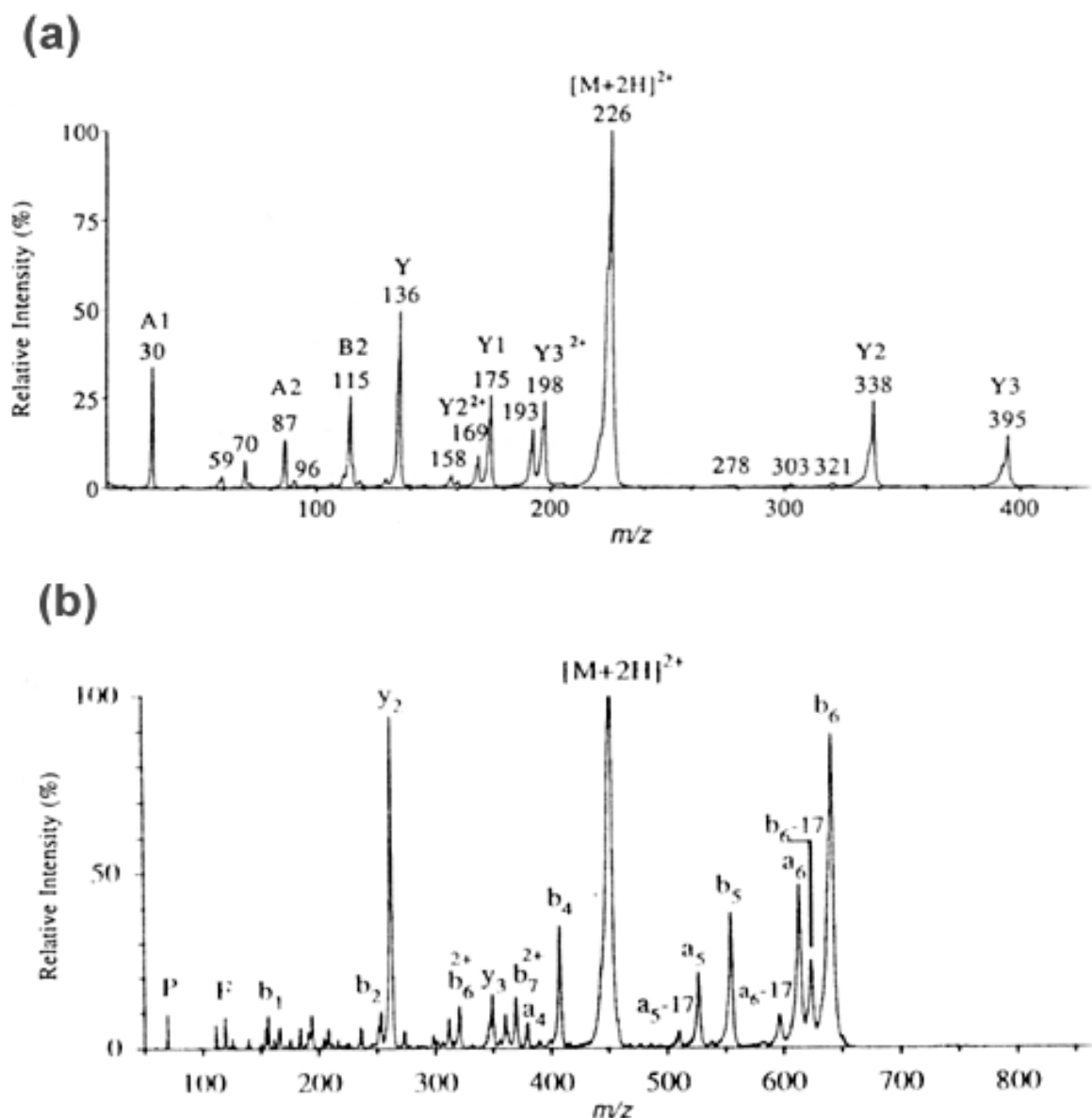


Figure 9 : Spectres de masse CID, obtenus par ESI-TQ, sur l'ion $[M+2H]^{2+}$ du **peptide GGYR** (a) (d'après Tang et coll. [1992]) et du **peptide RPPGFSPF** (b) (d'après Tang et coll. [1993]).

L'équipe de Wysocki [Jones et coll. 1994, Dongré et coll. 1996] a étudié le comportement de plusieurs peptides lors de leur fragmentation. Ces peptides ne comportent pas d'acides aminés basiques ou bien en possèdent à différentes positions dans la séquence. Ils ont

montré que la nature des acides aminés basiques avait une influence sur le processus de fragmentation. Les expériences ont été réalisées par ESI/SID-TQ.

Jones et coll. [1994] ont comparé le peptide YGGFL avec les peptides YGGFLK, YGGFLR et RYGGFL grâce à des courbes d'efficacité de fragmentation dont l'abscisse correspond au rapport de l'énergie de collision obtenue en SID (dissociation induite en surface) sur le degré de liberté de la molécule étudiée et dont l'ordonnée correspond au rapport de la somme des intensités des ions fragments sur la somme des intensités de tous les ions. Ils ont remarqué que les peptides sans acide aminé basique fragmentent plus facilement à une énergie de collision donnée que des peptides contenant un acide aminé basique (arginine R ou lysine K). Le peptide contenant une lysine, YGGFLK, se dissocie plus facilement que les peptides contenant une arginine, YGGFLR et RYGGFL. En effet, les peptides comportant une arginine ont une affinité protonique supérieure aux peptides comportant une lysine qui eux-même ont une affinité protonique supérieure aux peptides ne comportant aucun acide aminé basique. Ainsi, l'ion précurseur MH^+ d'un peptide comportant une arginine est plus stable que l'ion précurseur MH^+ d'un peptide comportant une lysine et aura besoin d'une énergie cinétique plus importante pour se fragmenter. Lorsqu'ils ont comparé le peptide AAAAA avec les peptides KAAAA et RAAAA, Dongré et coll. [1996] ont confirmé ces résultats.

Les peptides KYGGFL, KAAAA, YGGFLR et PPGFSPFR ont besoin d'une plus grande énergie pour fragmenter que les peptides correspondants YGGFLK, AAAAK, RYGGFL et RPPGFSPF. Ainsi, l'efficacité de fragmentation dépend de la position de l'acide aminé basique dans la séquence [Dongré et coll. 1996]. Cependant, le peptide YAAAAK a besoin d'une plus grande énergie pour fragmenter comparé à KYAAAA, ce qui montre que l'efficacité de fragmentation dépend également de la séquence.

Les peptides RPPGFSPF et PPGFSPFR ont des énergies de fragmentation (78.3 et 78.8 eV) différentes de celles des peptides RYGGFL (60.9 eV) et YGGFLR (62.4 eV), ce qui est certainement dû à leur plus grand nombre de degrés de liberté. En effet, ces molécules, comportant des modes vibrationnels et rotationnels plus importants, ont besoin d'une plus grande énergie pour se fragmenter que les molécules comportant un plus petit nombre de degrés de liberté.

La structure formée en ESI d'un peptide comportant un acide aminé basique peut être celle du peptide protoné sur la chaîne latérale basique ou bien une forme comportant une liaison hydrogène intramoléculaire entre la chaîne latérale de l'acide aminé basique (R ou K) et le NH₂ terminal [Jones et coll. 1994, Dongré et coll. 1996]. Dans le cas de RYGGFL, la chaîne latérale de l'arginine peut interagir, via une liaison hydrogène, avec le N-terminal pour former une structure stable et cyclique. Il en est de même pour les peptides YGGFLK et YGGFLR. Si cette liaison hydrogène intervient, la modification de la structure du peptide devrait donner une idée de l'efficacité de fragmentation. Des expériences réalisées sur le peptide RPPGFSPF et son analogue diacétylé sur l'arginine en N-terminal montrent qu'une énergie de fragmentation plus faible est obtenue pour le peptide RPPGFSPF diacétylé. Ce résultat est en accord avec la diminution en basicité et/ou la disparition d'un site possible de liaison hydrogène due à l'acétylation [Jones et coll. 1994].

En résumé, l'énergie E requise pour fragmenter des peptides contenant un acide aminé basique peut être classée comme suit: Epeptide contenant une arginine > Epeptide contenant une lysine > Epeptide sans acide aminé basique, ce qui correspond à l'ordre des affinités protoniques des acides aminés basiques. Cette énergie dépend de la position de l'acide aminé basique dans la séquence, de la séquence du peptide et du nombre de degré de liberté de la molécule.

*** Dérivation de peptide pour induire un ion préformé**

Dans le cas d'un manque de sensibilité et d'une difficulté dans l'interprétation des spectres MS/MS, le seul moyen de caractériser des peptides est de les dériver pour induire un ion préformé généralement positif, chargé en N-terminal ou en C-terminal (figure 10). Plusieurs types de dérivation ont été développés dans les années 1980 [Roth et coll. 1998], tels que les fonctions ammonium ou phosphonium quaternaires. Les analyses de ces peptides ont été effectuées par FAB (Fast Atom Bombardment), LSIMS (Liquid Secondary-Ionization Mass Spectrometry) ou MALDI plutôt qu'en électrospray [Roth et coll. 1998]. En effet, les peptides qui ont été dérivés ont besoin de plus d'énergie pour fragmenter que les peptides non-dérivés et l'ionisation par électrospray ne permet pas d'apporter une énergie interne assez élevée.

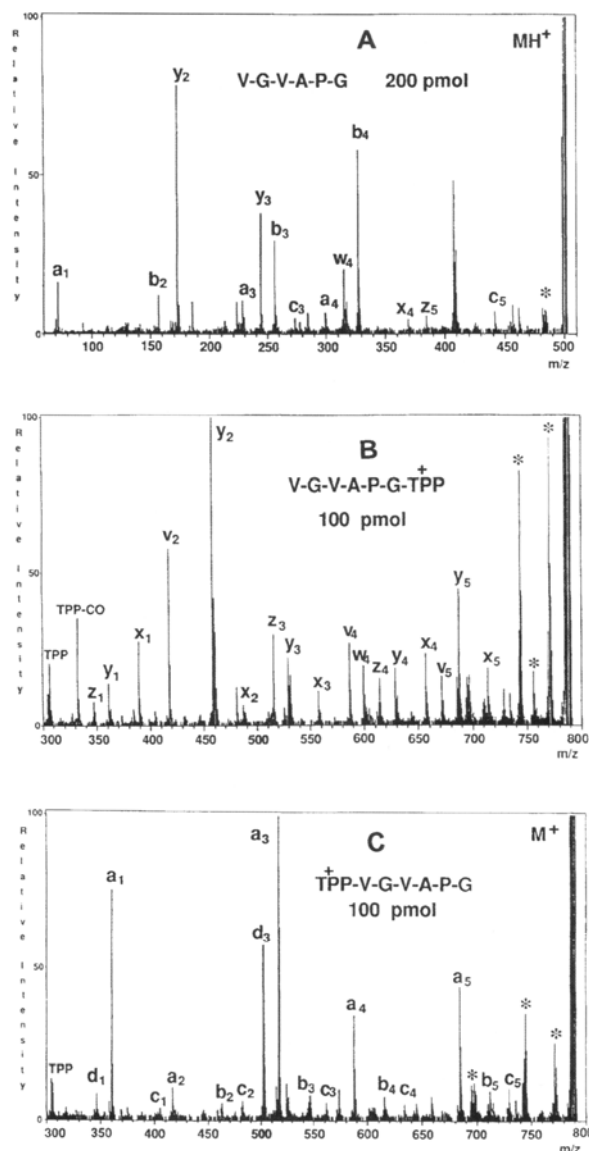


Figure 10 : Spectres de masse réalisés en FAB-MS/MS de haute énergie du **peptide VGVAPG** (a) du peptide VGVAPG dérivé par un **groupement triphenylphosphonium en C-terminal** (b) et du peptide VGVAPG dérivé par un **groupement triphenylphosphonium en N-terminal** (c), d'après Roth et coll. [1998].

* Taille des peptides

La taille des peptides a une influence sur l'efficacité de fragmentation (effet de masse). Dongré et coll. [1996] ont comparé trois peptides comportant cinq acides aminés (AAAAA,

YGGFL et VEEAE) et ont montré que l'efficacité de fragmentation dépend de la masse du peptide (373, 556 et 576 Da respectivement). Plus la masse est faible, plus le peptide fragmente facilement. L'énergie au point d'inflexion des courbes d'efficacité de fragmentation obtenue en ESI/SID est de 25,4, 33,2 et 34,5 eV respectivement. Ainsi, il n'est pas surprenant que les peptides monochargés avec des masses proches aient des énergies de fragmentation similaires. Le même commentaire a été suggéré par Yeh et coll. [1991] sur des peptides de longueur croissante avec les mêmes acides aminés (polyalanine et polyglycine).

*** Effet de l'état de charge**

Les observations mentionnées précédemment concernant l'influence de la composition du peptide (nature et localisation des acides aminés, dérivation pour induire un ion préformé, taille) sur sa fragmentation peut être appliquée non seulement aux ions monochargés mais aussi aux ions multichargés [Downard et Biemann 1994]. Il faut noter que les ions fragments provenant d'ions multichargés peuvent être semblables à ceux obtenus à partir des ions monochargés et/ou supplémentaires [Downard et Biemann 1994]. Fragmenter des ions multichargés induit des ions fragments multichargés en plus des ions fragments monochargés, ce qui complique énormément l'interprétation des spectres de masse CID.

Cox et coll. [1996] ont observé, en MS/MS, que les espèces $[M+2H]^{2+}$ donnent une dissociation significative à une énergie de collision supérieure à celle requise pour les espèces $[M+3H]^{3+}$. D'après eux, la dissociation des espèces simplement ou multichargées dépend fortement de la localisation des sites de protonation. Plus l'espèce est chargée, plus il existe de sites de protonation sur le squelette peptidique, ce qui favorise la fragmentation. De même, Loo et coll. [1988] ont montré que les molécules hautement chargées se fragmentent plus facilement que les molécules de plus bas états de charges car l'énergie de collision est proportionnelle au nombre de charge pour un m/z donné. Ainsi, l'efficacité de fragmentation dépend de l'état de charge de l'ion.

III.1.c. Modèle du 'proton mobile'

Actuellement, le modèle du 'proton mobile' explique le mieux la dissociation des peptides protonnés. Ce modèle est le résultat de la réflexion de plusieurs équipes dont celles d'Harrison [Tsang et Harrison 1976, Harrison et Yalcin 1997], de Gaskell [Burlet et coll. 1992, Cox et coll. 1996], de Wysocki [Jones et coll. 1994, Dongré et coll. 1996, Tsaprailis et coll. 1999, Wysocki et coll. 2000] et de Boyd [Tang et Boyd 1992, Tang et coll. 1993].

La nature des acides aminés (surtout basiques) et leur localisation dans la séquence, ou la dérivation des peptides pour induire des ions préformés, orientent la nature des ions fragments du squelette peptidique obtenus. Retenir une telle charge devrait induire une rupture à cet endroit. Cette fragmentation localisée existe mais d'autres ions fragments apparaissent sur les spectres de masse, correspondants généralement au côté du peptide (N ou C-terminal) où la charge est localisée, comme nous avons déjà vu.

D'après l'hypothèse du 'proton mobile', la charge (sous la forme d'un proton ou parfois seule), initialement localisée sur un acide aminé basique, est finalement transférée sur des sites moins basiques du peptide via les liaisons amide le long du squelette peptidique (figure 11a) ou via un transfert direct sur le site de fragmentation localisé sur les liaisons amides du squelette (figure 11b). Ce phénomène permet d'obtenir plusieurs formes protonnées du même peptide et induit des coupures sur le squelette [Tang et coll. 1993, Dongré et coll. 1996, Johnson et coll. 1995, Wysocki et coll. 2000]. Ainsi, les ions complémentaires y et b apparaissent sur les spectres de masse CID.

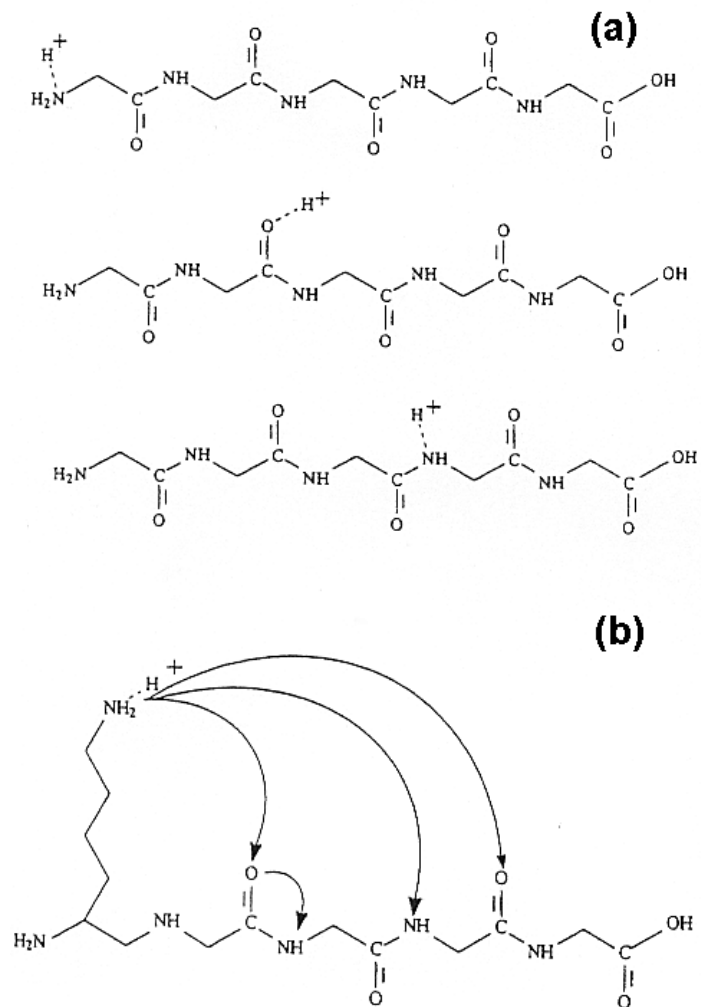


Figure 11 : Modèle du proton mobile, d'après Dongré et coll. [1996].

III.2. Les oligonucléotides

Les études concernant la fragmentation d'oligonucléotides sont moins abondantes que celles concernant les peptides.

III.2.a. Schémas de fragmentation

La nomenclature que nous allons utiliser a été développée par Mc Luckey et coll. [1992] et les localisations potentielles des coupures de liaisons sont montrées sur le schéma 5. B_n représente la base en position n et l'ion (a_n-B_n) correspond à l'ion a_n qui a perdu sa base.

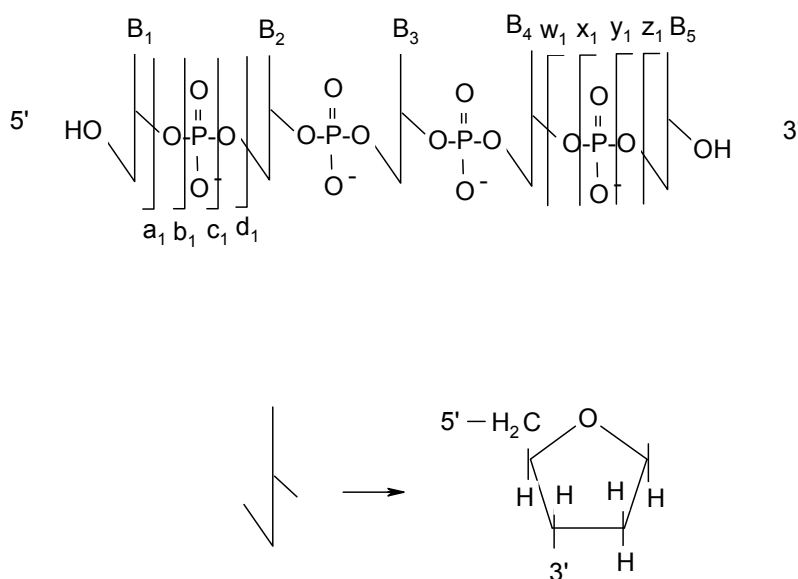


Schéma 5 : Nomenclature des ions fragments développée par Mc Luckey et coll. [1992].

III.2.b. Composition de la séquence

* Nature de l'acide nucléique et localisation dans la séquence

En étudiant la décomposition par MS/MS d'anions multi chargés d'oligonucléotides, Mc Luckey et coll. [1992, 1993] ont montré que les oligonucléotides fragmentent d'abord en perdant la base d'un acide nucléique, dont l'ordre de préférence est $A > T > G, C$ en ce qui concerne les oligonucléotides qu'ils ont étudiés. Cette perte est suivie par la coupure en 3' de la liaison C-O du sucre à partir de laquelle la base est perdue. Ces résultats ne concluent pas que l'absence de la perte de base induit une absence de fragmentation de

l'oligonucléotide. Pomerantz et Mc Closkey [1995] ont réalisé des expériences de collision sur un oligonucléotide contenant seulement des nucléosides 'pseudouridine' (ψ), isomère de l'uridine (schéma 6), dont la base est réputée pour ne pas se couper lors des analyses par spectrométrie de masse, et ont prouvé que le squelette de l'oligonucléotide peut tout de même être coupé.

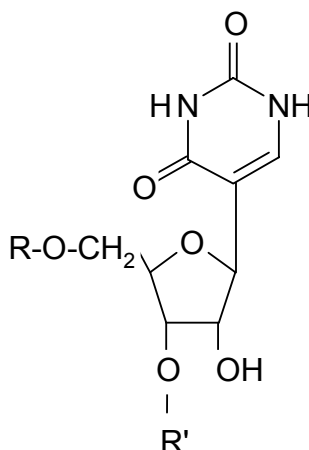


Schéma 6 : Formule de la 'pseudouridine'.

En ce qui concerne les bases modifiées des acides nucléiques, Mc Luckey et Habibi-Goudarzi [1994] ont comparé deux oligonucléotides hexamères isomères, 5'-d(N-6meATGCAT)-3' et 5'-d(ATG5meCAT)-3', et ont trouvé que la base modifiée, l'adénine méthylée et la cytosine méthylée, peut être identifiée mais seulement l'adénine méthylée peut être localisée dans la séquence. L'étude par MS³, avec un instrument de type trappe à ions, d'oligonucléotides comportant une guanine méthylée spécifiquement a permis à Marzilli et coll. [1999] de déterminer la position de toutes les bases guanines. Concernant la localisation d'une rupture spécifique dans la séquence, il apparaît que la perte de la base sur le résidu en 3' est défavorable [Mc Luckey et Habibi-Goudarzi 1994, Little et Mc Lafferty 1995, Crain et coll. 1996].

* Effet de l'état de charge

Comme pour les peptides, les ions hautement chargés ont besoin de moins d'énergie pour se dissocier que les ions faiblement chargés pour les mêmes raisons évoquées dans le paragraphe III.1.b. [Barry et coll. 1995, Premstaller et Huber 2001] et l'information structurale peut être obtenue par collision des ions de différents états de charge.

Cependant, les ions fragments peuvent être différents si l'ion sélectionné est hautement ou faiblement chargé comme dans le cas de 5'-d(CCCAp)-3', où p indique une phosphorylation à l'extrémité 3' [Mc Luckey et Habibi-Goudarzi 1993]. Dans cet exemple, la fragmentation de l'ion $[M-4H]^{4+}$ donne majoritairement les ions complémentaires A^- et $[M-4H-A]^{3-}$ alors que la fragmentation de l'ion $[M-2H]^{2+}$ donne majoritairement la perte de PO_3^- .

IV. Revue

'Comparaison of dissociation of ions in an electrospray source, or a collision cell in tandem mass spectrometry'

Corinne Buré and Catherine Lange

Curr. Org. Chem., 2003, 7, 1613-1624.

Comparison of Dissociation of Ions in an Electrospray Source, or a Collision Cell in Tandem Mass Spectrometry

Corinne Buré^{1*}, Catherine Lange^{2*}

¹Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301 affiliated to the University of Orléans and to INSERM, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France

²Spectrométrie de Masse Bio-Organique, CNRS-UMR 6014, Université de Rouen, (F)76821 Mont-Saint-Aignan cedex

Abstract: Electrospray ionization (ESI) is a soft ionization technique well suited for producing gas phase ions of biological macromolecules. The use of ESI when combined with collision-induced dissociation and mass analysis can give structural information about biomolecules. Traditionally, collisional fragmentation is carried out by tandem mass spectrometry. Several commercially available instruments permit tandem mass spectrometric experiments in space, in time or by post-source decay. Parameters influencing these processes and some applications are discussed in this article. It has been observed that in nearly all API sources, fragmentation of ions can arise by increasing the potential difference applied to the inlet and outlet orifices in the sampling region of the electrospray source kept under low vacuum. This process, called by variety of names, such as in-source collision-induced dissociation (CID), up-front CID, cone-voltage CID or nozzle-skimmer dissociation, is less well understood than the traditional tandem mass spectrometric technique. Thanks to in-source CID, it is possible to obtain structural information with a single quadrupole instrument or to achieve a method close to MS/MS/MS with a triple quadrupole instrument. Results from a few studies comparing in-source CID in an electrospray ion source and CID in the collision gas cell of a tandem mass spectrometer have been published. These studies show that results from the both processes are generally comparable. The advantages and the drawbacks of each technique will be developed thereafter. In this article, the comparisons are reviewed and suggestions are made to help the reader to make a choice between the two fragmentation processes depending on the nature of the sample.



INTRODUCTION

The last twenty years has seen great improvements in mass spectrometry, which has become a powerful method for the characterization and identification of synthetic and biological molecules. The 1980s saw an exponential growth in the use of electrospray ionization mass spectrometry [1,2] since it was recognized as one of the "soft" techniques for measuring the mass of large and fragile biomolecules. Later, tandem mass spectrometry was developed to identify these biomolecules by fragmentation. Recently, growing interest in subjects such as proteomics and post-genomics has stimulated mass spectrometer manufacturers to develop tandem mass spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. The numerous reviews concerning tandem mass spectrometry show the interest of this method, mainly as a result of the availability of new instruments. Traditional tandem mass spectrometry is conducted by mass-selection of a precursor ion which is collided with a neutral gas to produce fragment ions. Several instruments have been developed to do these experiments, such as tandem mass spectrometer in space, tandem mass spectrometer in time or post-source decay [3].

Another method in mass spectrometry permitting elucidation of the molecule structure is in-source collision-induced dissociation [4,5]. This process is less well

understood than tandem mass spectrometry. It corresponds to a low-energy process and results obtained are comparable to fragmentation induced under low-energy tandem mass spectrometry. There are only a few published comparisons between the two methods. Depending on the instrument used, the fragment ions derived in source are similar to those obtained under a low-energy process, but different to those attained under high-energy collisional conditions.

This review is aimed at providing an overview of fragmentation and at showing that collision-induced dissociation can be achieved in-source too, rather than using the traditional tandem mass spectrometers. This process, which is cheaper than using MS/MS instruments, can give somewhat similar information in favorable cases. The goal is also to make a choice between both processes, as a function of their abilities and the laboratory's needs.

The literature regarding collision-induced dissociation (CID) is very large; we will, therefore, confine our review to ion derived under electrospray ionization (ESI) conditions [1,6-9].

I – TANDEM MASS SPECTROMETRY

The classical technique to fragment ions, generally in order to obtain structural information on molecules, is tandem mass spectrometry (MS/MS). This denomination of MS/MS comes from the fact that the pioneer instruments were composed of two analyzers. The first experiments, named "MS/MS in space", were performed on multiple sector and hybrid instruments (BEBE, EBQ) at the end of the

*Address correspondence to this author at the ¹Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301 affiliated to the University of Orléans and to INSERM, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France; Tel: 33 2 38 25 54 57; Fax: 33 2 38 63 15 17; E-mail: bure@cnrs-orleans.fr

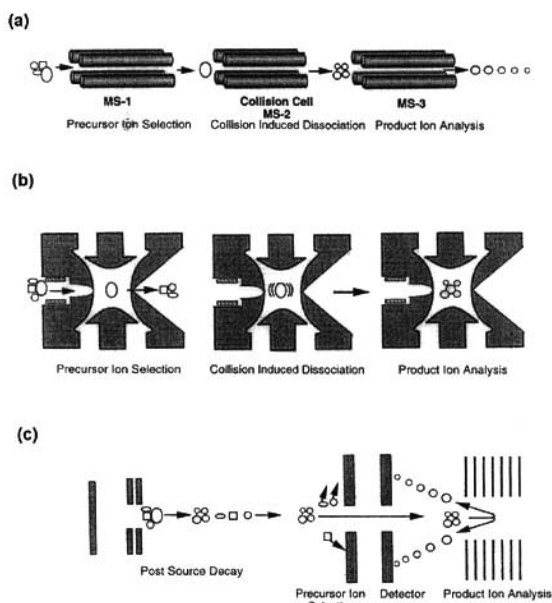


Fig. (1). Schematic representation of tandem mass spectrometry (a) in space with a triple quadrupole mass spectrometer, (b) in time with an ion trap mass spectrometer, where the precursor ion is first isolated by ejecting all other ions from the trap volume through resonance excitation, and (c) post-source decay performed with a reflectron time-of-flight mass spectrometer. Ion of a particular m/z value is selected by timing the arrival of ions at an electronic gate. (Ref [3], copyright 1998 by John Wiley and Sons, Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons Limited).

1960s. However, such instruments are of high complexity, cost and size. Thus, "MS/MS in time", *i.e.* MS/MS with only one analyzer (IT, ICRMS), was developed. Figure 1 illustrates three instruments performing tandem mass spectrometry in three different ways : MS/MS in space, MS/MS in time and a particular way of fragmentation, the PSD (Post-Source Decay in maldi-tof instrument) which is a mixture of both.

I – 1 – Principles of Tandem Mass Spectrometry

I – 1 – a – Tandem Mass Spectrometry in Space

In this case, the mass analyzers are arranged spatially in series (Fig. 1a). The two analyzers are physically separated by a collision cell and three scan modes can be achieved for most of them (Fig. 2) [10]: (i) **the product scan** or daughter scan. The precursor ion (or parent ion) is selected in the first

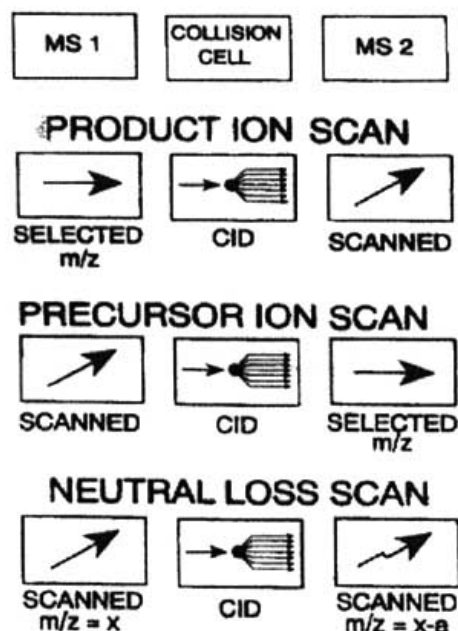


Fig. (2). Tandem mass spectrometry in space when recording the three possible scan modes : product scan or daughter scan, precursor scan or parent scan and neutral loss scan. (Ref [10], copyright 1996 by John Wiley and Sons, Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons Limited).

analyzer, collided against a collision gas in the collision cell and then the second analyzer is scanned for product ions. (ii) **the precursor scan** or parent scan. The first analyzer is scanned while one product ion is selected in the second analyzer. The resultant spectrum shows the precursors of the chosen product ion. (iii) **the neutral loss scan**. The two analyzers are scanned in parallel with an offset between them equivalent to the neutral loss to be observed. Only ions which fragment with this neutral loss are detected.

Tandem mass spectrometry instruments in space contain a collision gas cell, constructed initially from a quadrupole (now replaced by a hexapole and even an octopole), which operates at radio frequencies (r.f.). Enclosure of the quadrupole in a cell allows the pressure to be raised to a level that permits multiple low-energy collisions. Ions undergoing multiple low-energy collisions in a short time-frame will become sufficiently activated to fragment. In addition, the quadrupole collision gas cell has the ability to re-focus ions scattered from collisions with the neutral gases [3].

Table 1 summarizes the scan modes that usual instruments are able to achieve. The most common

Table 1: Scan modes used in tandem mass spectrometry.

Analyzers	MS/MS in space				MS/MS in time		
	TQ	electromagnetic		o-Q-tof	IT	ICRMS	PSD
		linked scans	real MS/MS				
Product ion scan	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Precursor ion scan	✓	✓	✓	✓			
Neutral loss scan	✓	✓		✓			

instrument used in "MS/MS in space" is the triple quadrupole, mainly because of its relatively low price. The electromagnetic instruments are more expensive. Application of a new generation of hybrid instrument o-Q-tof (a quadrupole is coupled to a time-of-flight in orthogonal geometry) is expanding fast, mainly because of the demands of proteomics and post-genomics.

I – 1 – b – Tandem Mass Spectrometry in Time

Tandem mass spectrometry in this way is achieved with only one analyzer without a separate collision gas cell (Fig. 1b). Ions are generated in the source or injected from an external source. The precursor ion is first isolated by ejecting all other ions from the trap volume through resonance excitation. A pulse of gas is introduced into the trap. By varying the amplitude of the resonating frequency, the motion of the selected precursor ion is increased, causing multiple low-energy collisions with the gas. The resulting fragment ions are then ejected, in turn, from the ion trap into a detector [3,11].

Tandem mass spectrometry in time can be conducted only with analyzers with a trap, *i.e.* ion trap (IT), and ion cyclotron resonance mass spectrometry (ICRMS). Only the product scan mode can be achieved (Table 1). However, MSⁿ analysis can be carried out by repeating the cycle described above *n* times. To our knowledge, the cycle has been repeated up to eight times [12].

I – 1 – c – Post-Source Decay (PSD)

An intermediate MS/MS, using time and space, consists of the PSD mode in maldi tof instruments. According to Figure 1c, ions are accelerated from the ion source into the field-free region of the flight tube. Ion of a particular *m/z* value is selected by timing the arrival of ions at an electronic gate and the metastable decomposition occurs in the field-free region of the flight tube. The separation between the precursor ion and its fragment ions is based on the *m/z* value and is effected in the reflectron (Fig. 1c). By this method, only product ions can be obtained in the mass spectra (Table 1). In the case of the PSD mode, no gas cell is required. However, recent maldi tof instruments can include a collision cell permitting real MS/MS. Tof mass analyzers, alone, are not often used for tandem mass spectrometry but can appear as the second analyzer (o-Q-tof, EB-tof).

I – 2 – High and Low Collision Energy

The CID process occurs in two steps. The first one corresponds to the collision between the ion and the target gas when a fraction of the ion translational energy is converted into internal energy, bringing the ion into an excited state. The second step corresponds to the unimolecular decomposition of the activated ion. The maximum energy fraction converted into internal energy is called the center of mass collision energy (E_{cm}) and is given by:

$$E_{cm} = E_{lab} \times \frac{m_{tg}}{m_{tg} + m_i} \quad (1)$$

where E_{lab} (laboratory energy) is the ion translational energy, m_{tg} corresponds to the target gas mass and m_i the ion mass [13,14].

Only electromagnetic instruments operate at high accelerating potentials, giving ions keV translational energy.

Helium is the most common target gas used in CID studies at high energy but it is not very efficient in transferring internal energy. The use of a heavier gas, such as argon or xenon, allows the collision yield to be increased. High-energy CID mass spectra of peptides contain fragment ions formed by backbone and side-chain cleavages. Bordoli and Bateman [15] have shown that, to achieve side-chain fragmentation, a center of mass collision energy of 20-25 eV is required.

Low-energy CID mass spectra are measured using triple-quadrupole, hybrid instrument or ion trap with collision energies corresponding to a few tens of eV, providing ion translational energies in the 10 to 100 eV range. The nature of the collision gas is more important than it is for high-energy collisions. Normally, heavier gases such as argon or xenon are preferred as they allow the transfer of more energy. Low energy CID mass spectra of peptides show the fragmentation of the backbone. The pattern of the fragments observed in a mass spectrum depends on the internal energy of the precursor ion. It is controlled by the collision energy and the number of collisions [10]. At low collision energy, fragmentation occurring in one step will dominate, while at high energy, fragments resulting from consecutive fragmentations are more important. Moreover, fragmentations that involve rearrangement are more important in spectra recorded at low energy.

Concerning peptide fragmentation, the side-chain cleavage tends to determine the level of energy (high or low) involved. High-collision energies cleave the peptide side-chain and correspond to a center of mass energy above 25 eV, whereas low-collision energy corresponds to a center of mass energy below 20 eV.

I – 3 – Parameters Influencing Tandem Mass Spectrometry

I – 3 – a – Resolution

In MS/MS, resolution is an important parameter linked to the signal-to-noise ratio and mass accuracy. In the case of low-resolution instruments (triple quadrupole, ion trap), resolution is sacrificed in order to record weak daughter-ion spectra [16] that lead, in turn, to a poor accuracy in mass assignment and ambiguous sequence information. Thus, it is difficult to attribute a mass difference of 113.5 Da in *b* or *y* series ions [17] on tandem mass spectra, knowing that the masses of Asn residue (114 Da) and Ile/Leu residues (113 Da) are close.

Working on high-resolution instruments (electromagnetic, o-Q-tof, ICRMS) leads to higher mass accuracy on fragment ions and on precursor ions but also to more information on the charge-state of ions that facilitate mass spectra interpretation.

I – 3 – b – High and Low Collision Energy

Low collision energy corresponds to a vibrational excitation state of the ion and uses a weak Elab. The effective section of collision gas is important. When the collision gas used is heavy, it induces a high E_{cm} . On the other hand, the high-energy process is different. It corresponds to vibrational and electronic excitation states of the ion. The energy states used are higher and thus the size of collision gas needed is smaller. High and low collision energies reflect the energy deposited at the center of mass and thus a different fragmentation process. Whatever the

nature of the molecule (synthetic or biological), this process induces differences in mass spectra and gives different structural information.

Fragment ions obtained at high energy correspond to side-chain fragmentations of peptides: for example, leucine and isoleucine, giving different w ions [17] when recording with a sector instrument, can be differentiated.

At high energies, colliding heavier and heavier gas with peptides induces an enhancement of side-chain fragmentation and x and z series ions [18]. In the case where the fragmentations were directed on the C-terminal side, an increase in the mass of the target gas induces the disappearance of N-terminal fragments. To obtain maximum structural information from CID spectra, it is advisable to carry out experiments with Ecm values of at least 20-30 eV [15]. Thus, it would appear that heavier gases are preferred to helium at precursor masses greater than 1000 Da.

Nizigiyimana *et al* [19] have compared low and high energy CID tandem mass spectrometry on Ricinoleic and Ricinelaic acids ($M = 298$ Da). The results obtained on the fragmentation of the $[M-H]^-$ ion show that low-energy CID fragmentation produced loss of water and heptaldehyde, and that high-energy CID fragmentation revealed not only the loss of water and heptaldehyde, but also the additional loss of H_2 and H_2 resulting from the first losses and other ions coming from cleavage of the fatty acyl chain.

With regards to peptide fragmentation, the difference of information obtained from mass spectra as a function of the collision energy has been discussed above.

I – 3 – c – Collision Gas

The precursor ion generated by ESI has generally not enough internal energy to decompose itself. To activate its energy, it has to be collided with a target gas. The gas usually used can be inert (helium, argon, xenon, krypton) or polyatomic (CH_4 , NH_3 , CH_3NH_2 , N_2). Whatever the nature of the molecule (synthetic or biological), the nature and the pressure of the collision gas used affects the resulting CID mass spectra.

Numerous studies concerning the fragmentation of small molecules attested that the use of a heavier gas than helium is preferred in order to obtain maximum structural information.

Regarding a study carried out on a ion trap [20], it appears that the nature and the pressure of the collision gas have an effect on the trapping efficiency since the higher pressure increases up to 10^{-4} Torr, the higher the efficiency. Moreover, above this value, at the same high pressure of the target gas, argon is more efficient than krypton and xenon, which decrease dramatically. Moreover, the mass of the collision gas has a direct effect on the degree of fragmentation occurring in the precursor ion since, in the same experimental conditions, more efficient collisions and higher Elab are produced with a heavier target gas.

I – 4 – Applications to Tandem Mass Spectrometry

Applications to tandem mass spectrometry are extremely numerous. In chemistry, it is usually used to observe ion/molecule reactions to differentiate isomers [21,22], to study mechanisms of fragmentation and to obtain structural information of unknown chemical molecules [23]. In

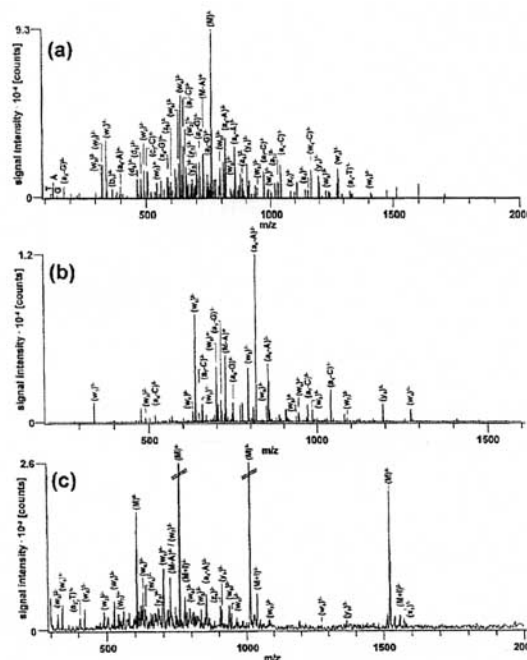


Fig. (3). Comparison of fragmentation spectra of 10-mer oligonucleotide (ATGCTACGAG) obtained from (a) the quadruply-charged ion on an electrospray triple quadrupole instrument, m/z 761.8, collision gas : Ar, 400 Pa, collision energy : 22V, (b) the quadruply-charged ion on an electrospray ion trap instrument, m/z 762.2, collision gas : He, 0.1 Pa, collision energy : 21% and (c) in-source CID by means of an electrospray/double-focusing sector field mass spectrometer in which the difference in the potential between heated capillary and tube lens is increased by an additional 100V. (Ref [24], copyright 2001 by John Wiley and Sons, Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons Limited).

biology, the main application is peptide or oligonucleotide sequencing [24,25], especially for N-terminally blocked peptides [26]. Tandem mass spectrometry also provides important information concerning post-translational modification [27,28], and amino acid deletion or addition.

It could be interesting to compare results obtained in MS/MS on the same model of molecules for each family of instruments, but references to such studies are rare. Some comparisons between triple quadrupole and ion trap mass spectrometers have been made by Premstaller *et al* [24,29] and one is reported in Figure 3. Figure 3 corresponds to CID mass spectra of 10-mer oligonucleotide (ATGCTACGAG) obtained from (a) the quadruply-charged ion on an electrospray triple quadrupole instrument, (b) the quadruply-charged ion on an electrospray ion trap instrument and (c) the in-source CID by means of an electrospray/double-focusing sector field mass spectrometer by increasing the difference in the potential between the heated capillary and the tube lens. Mass spectra made by triple quadrupole and ion trap have confirmed the complete sequence of the oligonucleotide: 83 fragments were identified on the triple quadrupole, most of them were redundant, and only 28 were on the ion trap. By comparing Fig. 3a with Fig. 3b (Fig. 3c

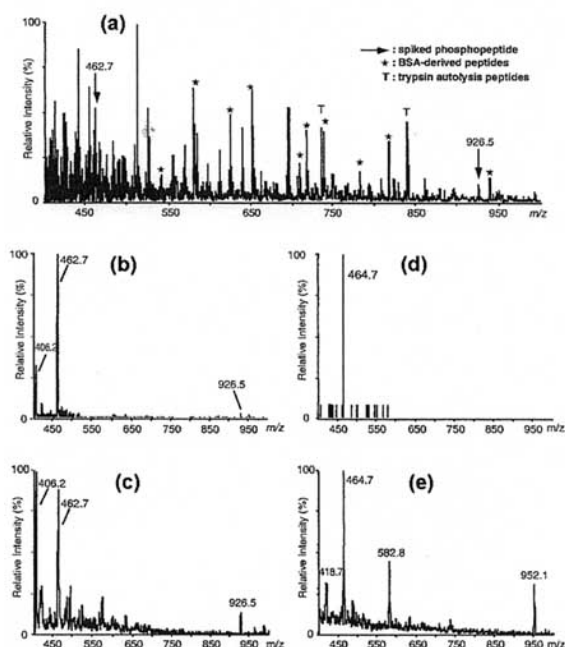


Fig. (4). Comparison of selectivity between triple quadrupole and o-quadrupole-time-of-flight instruments. A BSA in-gel digest was spiked with a synthetic phosphorylated peptide LRR(pY)LG. (a) Negative ion mass spectrum of the BSA digest spiked with the synthetic phosphopeptide, m/z 462.7 and 926.5. Negative ion precursor ion scan of m/z -79 acquired on (b) an o-quadrupole-time-of-flight and (c) a triple quadrupole instruments. Positive ion mode precursor ion scans of m/z 216 on (d) the o-quadrupole-time-of-flight and (e) the triple quadrupole mass spectrometers. (Ref [30], copyright 2001 by John Wiley and Sons, Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons Limited).

will be discussed in part III-1), it is clear that the mass spectrum acquired by triple quadrupole is more complex than that of the ion trap. Indeed, multiple collisions were made on the triple quadrupole since the residence time of the ions in the cell is higher on the triple quadrupole than on the ion trap, and induces more energy and more fragmentations [22]. However, if the gas pressure was reduced, a fewer number of collisions could have occurred on the triple quadrupole. The mass spectra of Fig. 3a and 3b were not carried out under exactly the same conditions. The most important differences, as explained above, concern (i) the nature of the collision gas (argon on the triple quadrupole and helium on the ion trap), (ii) the pressure of the gas (400 Pa on the triple quadrupole and 0.1 Pa on the ion trap), and (iii) the collision energy (22 V on the quadrupole and 21 % on the ion trap). These differences make the comparison more ambiguous but Premstaller *et al* [24] conclude that the signal-to-noise ratio and the lower complexity of the mass spectra make the ion trap a better choice than the triple quadrupole.

Comparisons between triple quadrupole and o-quadrupole-time-of-flight experiments have also been made. Steen *et al* [30] show that the limit of detection of precursor

ion scanning was similar for both instruments when monitoring precursors of -79 Da (PO_3^-), and that the o-quadrupole-time-of-flight was five times more sensitive than the triple quadrupole when monitoring precursors of 216 Da (immonium ion of phosphotyrosine). On the other hand, Chernushevich *et al* [31] affirm that o-Q-tof is limited by its lower sensitivity in precursor ion scanning compared with TQ. However, both these studies show that o-Q-tof is able to provide high mass accuracy and sensitivity in product ion scanning. Another advantage of o-Q-tof compared with TQ is the better resolution, which permits better selection of the precursor ion as shown in Fig. 4, or of the product ion. Figure 4a shows a complex mass spectrum of a peptide mixture from which precursor ions of m/z -79 and m/z 216 were scanned. In a comparison of mass spectra obtained from the o-Q-tof (Fig. 4b and 4d) with those from the TQ (Fig. 4c and 4e), it is evident that the o-Q-tof instrument is better suited to precursor ion scanning since the high resolving power of the reflectron-tof mass analyzer permits high-accuracy fragment ion selection, that minimizes interferences.

II – IN-SOURCE COLLISION INDUCED DISSOCIATION

Electrospray mass spectrometry is a "soft" ionization process, which is usually devoid of fragment ions. However, in 1988, Loo *et al.* [4] reported the collisional activation of multiply-charged ions from large molecules by varying the nozzle-skimmer voltage bias and showed that collision processes for these highly-charged molecules depend on the charge state of the molecule.

II – 1 – Principles of In-Source CID

In API mass spectrometry, the ions leaving the capillary can undergo collisions with the residual gas contained in the source (bath gas or drying gas depending on the instrument) and fragmentation can be effected by increasing the internal ion energy in one of the higher-pressure regions inside the source. Therefore, the acceleration of ions can be produced between the capillary exit and the skimmer by varying the potential on the capillary exit [16], between the skimmer and RF-only multiple by varying the potential applied to the skimmer or between the sample cone and the skimmer [5,32] by varying the potential on the sample cone (V_c) (Fig. 5). The internal energy of the decomposing ions increases as the electric field in this region is increased. This phenomenon has been variously termed in-source CID, up-front CID, cone-voltage CID, nozzle-skimmer dissociation or nozzle-skimmer fragmentation. It occurs on the atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometer : atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [33,34] concerning small molecules and electrospray ionization (ESI) concerning larger molecules. In-source CID is a low-energy process.

The fragment ions produced are very efficiently transported into the mass analyzer. In-source CID is a fragmentation method without parent ion selection that can complicate mass spectra because sometimes the presence of other parent ions can cause a disturbance if the solution analyzed is a mixture of products. Moreover, precursor ion scan and neutral loss scan are impossible to achieve in this mode.

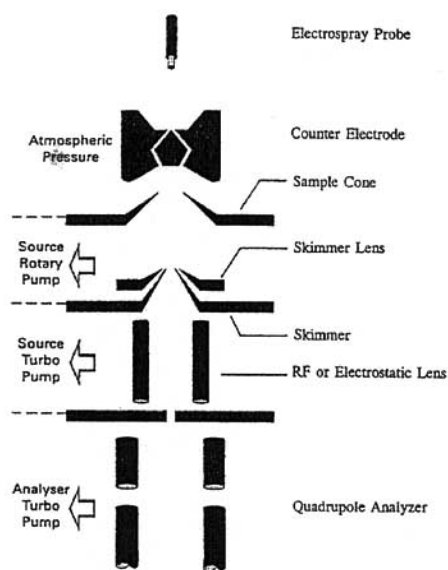


Fig. (5). Schematic representation of the lens of an electrospray source manufactured by Micromass. (Ref [5], copyright 1999 by John Wiley and Sons, Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons Limited).

II – 2 – Parameters Influencing in-Source CID

II – 2 – a – Voltage Applied to the Sample Cone (V_c)

Most studies on in-source CID were carried out by varying the voltage applied to the sample cone. This is the most important parameter to achieve collisions in the source for a given instrument. Loo *et al.* [4] have shown that this parameter greatly influenced the shape of the peak profile characteristic of a biomolecule. By increasing the voltage V_c , the first effect is to shift the center of the profile towards higher m/z values and then a decrease of sensitivity is observed for biomolecules. A second effect of the raising of V_c is an acceleration of the ions in a region of intermediate pressure that leads to fragmentation by collision-induced dissociation. The rate of fragmentation depends on the kinetic energy that the ions may acquire by collisions with the residual gas. The higher the V_c , the greater will be the fragmentation [32,35]. As the V_c value is dependent on the instrument, Weinmann *et al.* [36] compared three different instruments made by the same manufacturer and established corresponding orifice voltages with small molecules for the three instruments. However, the rate of fragmentation for a given V_c value generally depends on the molecule and this procedure cannot be generalized.

II – 2 – b – Geometry of the Source

The sample cone voltage is not the only parameter which influences the fragmentation. Collette *et al.* [32] have compared the internal energy distributions obtained with two different electrospray sources from two different manufacturers (Micromass, PE Sciex) when maintaining the same cone voltage (35 V) for both instruments. They show that the internal energy distribution obtained with the Micromass instrument is shifted to higher energies than that obtained with the PE Sciex instrument. Moreover, they assume that various lens voltages in the ion optics have a large effect on fragmentation. Schneider *et al.* [37] go further

into their experiments, since they modified the geometry of their electrospray source and showed that the increase of the spacing between the orifice plate and the skimmer raises the rate of fragmentation. Moreover, they assume that the diameter aperture of the skimmer has to decrease in order to increase the rate of fragmentation, since a larger diameter favors clustering.

II – 2 – c – Residual Gas

To obtain more efficient collisions with the residual gas, the ions must be efficiently desolvated and, in this way, the sample cone voltage has to be raised [4]. Moreover, the nature of this gas plays an important part in the fragmentation process. As in tandem mass spectrometry, according to the equation (1), heavier gas molecules should generate more fragmentations. However, this is not necessarily the case, as shown by Schneider *et al.* [37] who compare nitrogen, argon and krypton. Collette *et al.* [35] compare two gases, close in mass, argon and carbon dioxide, which gave different rates of fragmentation. In the latter case, it could be due to the difference in the nature of the gas.

II – 2 – d – Temperature and Pressure in the Source

These two parameters are dependent on the formation of clusters coming from water and solvent vapor present in air or generated by the evaporation of the eluate from liquid chromatograph or electrophoresis instrument connected to the source. Therefore, they can influence collision and the rate of fragmentation. High source pressures and low source temperatures are both favorable conditions for the formation of clusters and unfavorable conditions for fragmentation.

II – 2 – e – Mobile Phase and Sample

The composition of the mobile phase (percentage of acetonitrile and volatile buffer, pH) plays an important part in ion desorption in electrospray mass spectrometry. However, it seems to have no influence on the fragmentation process [38,39].

As in-source CID cannot permit selection of the parent ion, it is essential to experiment with pure samples and, preferably, without ions at different charge states that could complicate the interpretation of the CID mass spectra [40].

II – 3 – Applications to in-Source CID

The applications we have mentioned in part I-4 concerning tandem mass spectrometry are also applied to in-source CID. In-source fragmentation is generally coupled with liquid chromatography when complex mixtures were studied since the selection of the parent ion is not possible. Structures on many small molecules have been elucidated by in-source fragmentation method [41,42].

Weinmann *et al.* [43] worked on the establishment of mass spectral libraries of spectra obtained at different cone voltages from different instruments. For some compounds, all significant ions are present on one of the CID mass spectra of each instrument, but variations existed in their relative ion abundances. However, such mass spectral libraries cannot be used reliably at the moment.

In numerous fields, as in MS/MS, diagnostic ions are commonly used, for example, m/z 237 to characterize

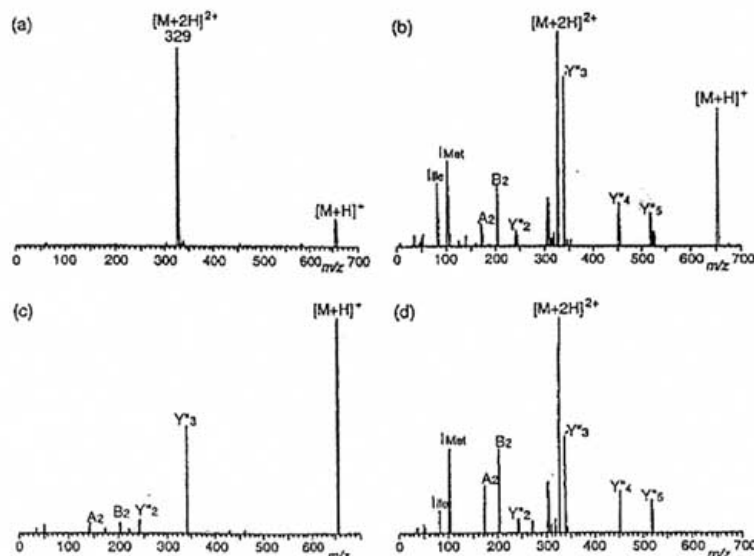


Fig. (6). Positive product ion spectra of the peptide MAIPPK obtained under different CID conditions : in-source CID at (a) $V_c = 10\text{V}$ and (b) $V_c = 30\text{V}$ and on a triple quadrupole instrument by selection in the collision cell of (c) $[M+H]^+$, m/z 656, $E_{\text{coll}} = 20\text{V}$ and (d) $[M+2H]^{2+}$, m/z 329, $E_{\text{coll}} = 10\text{V}$. (Ref [61], copyright 1999 by John Wiley and Sons, Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons Limited).

argenosugars [44], m/z -63 (PO_2^-) and m/z -79 (PO_3^-) characteristics of phosphopeptides [45] or m/z 163 (Hex^+ , hexose), m/z 204 (HexNAc^+ , N-acetylhexosamine), m/z 292 (SA^+ , Sialic acid) and m/z 366 (HexHexNAc^+ , hexose-N-acetylhexosamine) corresponding to glycopeptides [46]. When an instrument has only one analyzer, in-source CID can be a good alternative to tandem mass spectrometry.

Another useful application is to determine the sequence of peptides which fragment ions corresponding to those obtained in low-energy MS/MS, since in-source CID corresponds to a low-energy process. An example is shown Fig. 6: the mass spectrum in Fig. 6a was obtained at a low cone voltage ($V_c = 10\text{V}$) to identify the peptide MAIPPK ($M = 655\text{ Da}$) with two charge states. The mass spectrum in Fig. 6b was made at a higher cone voltage ($V_c = 30\text{V}$) and shows the fragmentation of the peptide; especially immonium ions and a majority of y ions are seen. The sequence determination of a peptide by a single mass spectrometric experiment cannot always be complete. Complementary methods can then be used, such as sequencing by other mass spectrometers with different sources or use of chemical techniques [47]. In-source CID provides information not only on amino acid modifications (phosphorylation, glycosylation or other modifications [48]) but also on their location in the sequence. Enhancement of the cone voltage permitted Buré *et al.* [49] to obtain structural information on peptide aldehydes and acetals, the latter being the synthetic precursor of the former: in this way, they determined the relative equilibrium constant of peptide aldehydes and compared the stability of the covalent hydration of these peptides.

The method of in-source CID was used to dissociate non-covalently associated protein-substrate complexes [50]. An example is shown in Fig. 7 [51]. At a cone voltage $V_c = 65\text{V}$, the enzyme-coenzyme-inhibitor complex existed. But, by increasing V_c up to 95V , this ternary complex dissociates towards the enzyme-coenzyme form. This method appears to

be very important in order to evaluate the stability of non-covalent complexes, especially since information obtained in the gas phase by mass spectrometry is correlated with the stability of such complexes in solution [52,53]. To compare the gas phase to the solution, Potier *et al.* [53] measured the stability of ternary complexes in the gas phase as a function of the cone voltage and introduced the notion of the V_{c50} value, which corresponds to the V_c value where 50% of the complex was dissociated. They compared the V_{c50} to the IC_{50} (affinity in solution) of each complex and showed that the inhibitors with the highest affinity in solution were the same as the inhibitors with the highest stability in the gas phase.

III – COMPARISON BETWEEN IN-SOURCE CID AND TANDEM MASS SPECTROMETRY

Few studies on comparisons between in-source CID and CID in the collision gas cell of a tandem mass spectrometer have been published.

III – 1 – Differences Between Both Techniques

The major difference between in-source CID and tandem mass spectrometry is the high background level of the source method than that in the MS/MS technique because of interference due to the solvent and impurities. This difference is due to the fact that no parent ion is selected in the source procedure. However, even if there is no interference on mass spectra obtained with the MS/MS, the signal/noise ratio is usually lower in MS/MS [54]. The background in the source is a real drawback when the sample analyzed is dilute and impure [55].

The best means of comparing both techniques is by using breakdown graphs, as was done by Harrison [5,56], Makowiecki *et al.* [57] and Pais *et al.* [58]. Figure 8 represents the comparison of breakdown graphs of protonated peptide GGL obtained by quadrupole cell (Fig. 8a) and in-source CID (Fig. 8b) methods. Generally, the

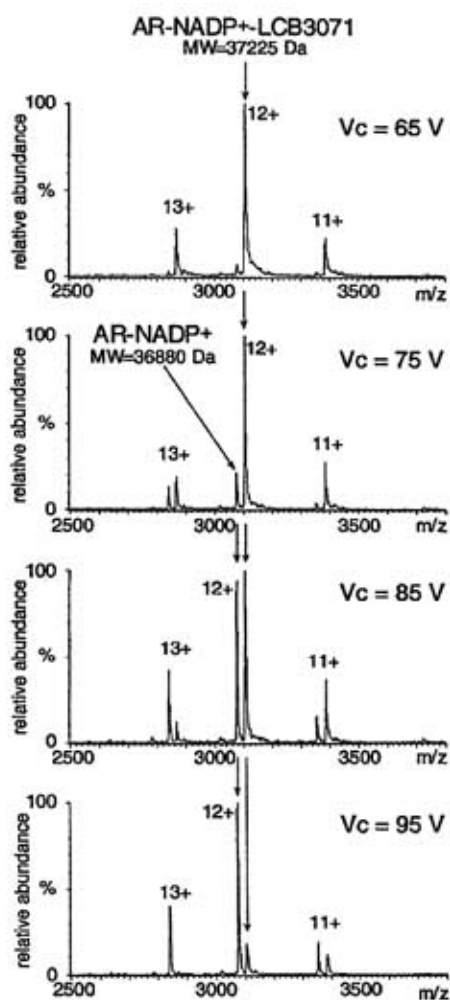


Fig. (7). Gas-phase stability of a ternary complex, enzyme (aldose reductase)-coenzyme (NADP^+)-inhibitor (LCB3071) complex. The ternary complex gradually dissociates into the holoenzyme (aldose reductase- NADP^+) in the gas phase when the accelerating cone voltage is increased ($V_c = 65, 75, 85$ and 95V). (Reprinted by permission of Elsevier Science from ref [51], Copyright 1999, by the American Society for Mass Spectrometry).

information obtained seems similar, although some qualitative differences are obvious. For example, a peak at m/z 200 is present in MS/MS data but not in that derived from in source fragmentation. The m/z 87 and m/z 143 are fragment ions acquired by fragmentation in the source but not in the collision gas cell. Thus, tandem mass spectrometry and in-source CID do not always give the same information, however, at least in this case, they can be complementary. This example also shows quantitative differences. Even if the fragment ions are common, the intensities could be different. The ion at m/z 189 is more intense in the spectrum derived from the source method than that recorded by MS/MS. Numerous authors, when comparing the two fragmentation processes, have noted that fragment ions obtained in the source show a higher intensity than in MS/MS. This phenomenon is observed with small molecules [58-60] or with peptides [5,61] and can be explained by the no mass selection of the parent ion in the source that induces

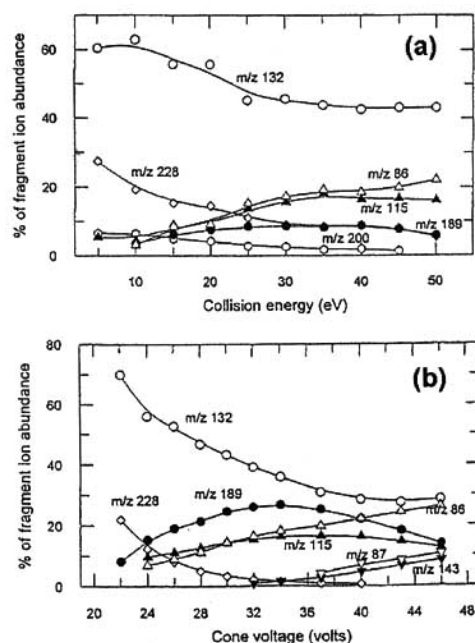


Fig. (8). Comparison of breakdown graphs obtained by (a) quadrupole cell and (b) in-source CID of protonated tripeptide GGL. (Ref [5], copyright 1999 by John Wiley and Sons, Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons Limited).

fragmentations of the fragment ions at the same time as the fragmentation of the parent ion of interest.

Depending on the analyzers composing MS/MS, tandem mass spectrometry and in-source CID produce complementary information since the mass spectra obtained are not necessarily the same. In-source CID gives only sequence fragment ions of peptide (low energy), as in a triple quadrupole mass spectrometer, but using a CID sector instrument (high energy) gives information about ions (loss of side chain) which can discriminate isobaric residues. Figure 9 [62] compares fragmentation in the source (Fig. 9a) with fragmentation by MS/MS (Fig. 9b) of a small peptide, C1-ANSA, derivatized with 4-aminonaphtalenesulphonic acid (ANSA) in C-terminal and whose formula is $\text{Pyr-Leu-Gly-Gly-Gly-ANSA}$. The energy of collision brought into play in each technique can be responsible for this phenomenon since in-source CID is considered as a low-energy process and the MS/MS data were recorded with an electromagnetic instrument allowing a high-energy process. However, the analyzer is perhaps not the only factor responsible since differences of fragmentation have also been observed by Rozman *et al.* [59] on small molecules with a triple quadrupole instrument. Figure 10a (MS/MS) and Figure 10b (in-source CID) show that in-source CID produces more fragment ions than in MS/MS. But, in this case, perhaps if the energy applied in the collision gas cell was higher, all the ions shown in Fig. 10b would be found in Fig. 10a. Rozman *et al.* also noted that in-source CID can produce important information when a compound containing a bromine atom is studied, since the isotopic profile of the bromine atom is recorded using the in-source CID method but not the MS/MS technique. However, some instruments are able to select a precursor ion with a broader mass

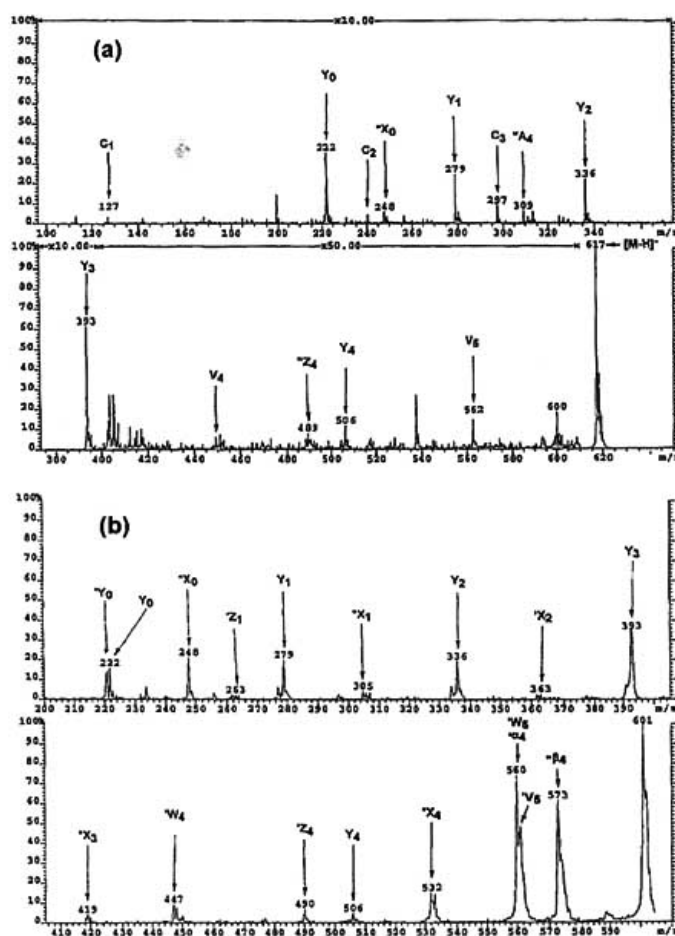


Fig. (9). Comparison of fragmentation spectra of the C-terminal derivatized peptide C1-ANSA (Pyr-Leu-Gly-Gly-Gly-ANSA) obtained under two different CID conditions : (a) in-source CID which cone voltage was raised to 4400V and (b) on an electromagnetic instrument by selection of the $[M-H]^-$ ion, m/z 617. (Ref [62], copyright 1995 by John Wiley and Sons, Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons Limited).

window. The profile of the bromine atom can thus be seen but this process induces interference.

Depending on the choice of the instrument, the energy evoking the fragmentation is not the same. To compare the process, the energy of collision with each instrument should be quantified but this is difficult to achieve. Figure 3 shows that the ion trap instrument gives a less complicated mass spectrum (Fig. 3b) than the data obtained with a triple quadrupole instrument (Fig. 3a) and the in-source CID method (Fig. 3c). It is due to a lower energy applied in the ion trap instrument: Sadagopan *et al.* [63] have also compared in-source CID with an ion trap and a triple quadrupole instruments and have shown that the ion trap instrument produces more collisions and more fragment ions than the in-source process and the triple quadrupole instrument, because the residence time of the ion in contact with the collision gas was higher in the ion trap instrument than in the source and in the collision gas cell of the triple

quadrupole. The latter explanation seems more logical than the observations of Premstaller *et al.* [24].

In-source CID has some advantages compared to MS/MS, such as ion transmission, which is better when using in-source CID with a single quadrupole rather than using MS/MS in space. Another positive point concerns LC-MS with an ageing instrument: the LC-MS/MS process implies having reproducible chromatograms and entering each mass to fragment in the mass spectrometer software, whereas in-source CID implies the carrying out of two analyses, one to obtain molecular masses and one to achieve fragment ions, but it avoids technical errors. Little *et al.* [54] find in-source CID easier and quicker to use compared to MS/MS.

III – 2 – Similarities Between Both Techniques

Generally, the two techniques provide similar or complementary structural information. With both, the same

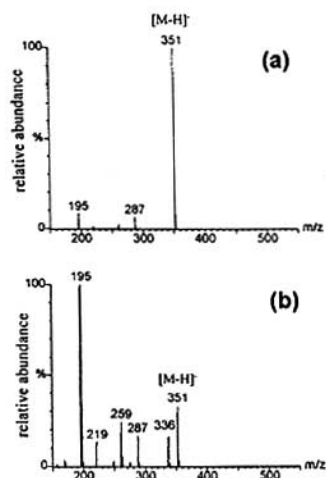


Fig. (10). Comparison of fragmentation spectra of a chemical compound ($\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH=N-SO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-Br}$) obtained under : (a) MS/MS with a triple quadrupole instrument by selection of the $[\text{M-H}]$ ion, m/z 351 and (b) in-source CID at $V_c = 55\text{V}$. (Ref [59], copyright 1995 by John Wiley and Sons, Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons Limited).

sequence information can be obtained for peptides [5,61,63] and oligonucleotides [54] and the same structural information for small chemical molecules [56,57,64]. In the same way, in native conditions, similar fragmentations can be obtained, as in the Fig. 11 [65]: Fig. 11a and 11c represent the fragmentation of myoglobin in the source method and in the MS/MS technique respectively and Fig. 11b and 11d represent the fragmentation of hemoglobin in the source method and in the MS/MS technique respectively. This figure shows the same results obtained with the two techniques in native conditions, which is the fragmentation of the non-covalently bound heme for the both proteins. It should be noted that both techniques are similar when the tandem mass spectrometer is a triple quadrupole instrument, since it produces a low-energy process and the residence time of the ions in the collision cell does not exceed the residence time in the source.

The energy of the fragment ions recorded using the in-source CID process is as low those recorded using low-energy MS/MS instruments: the fragmentation patterns are similar and, notably, the proton mobile model also exists in the source [66].

By comparing Fig. 6b, showing mass spectra obtained with the in-source CID process, with Fig. 6c and 6d, corresponding to MS/MS data on the monocharged peptide and the doubly-charged peptide respectively, close mass spectra were obtained for the in-source CID process and the MS/MS technique on the doubly-charged peptide.

Bogusz *et al.* [38] affirm that in-source CID mass spectra are not as reproducible as MS/MS spectra, that is why mass spectra libraries were established in MS/MS. However, to create mass spectra libraries from in-source CID data implies that the spectra have to be carefully made: to use such libraries requires manipulation of the same instrument and comparison of mass spectra from pure and sufficiently concentrated compounds.

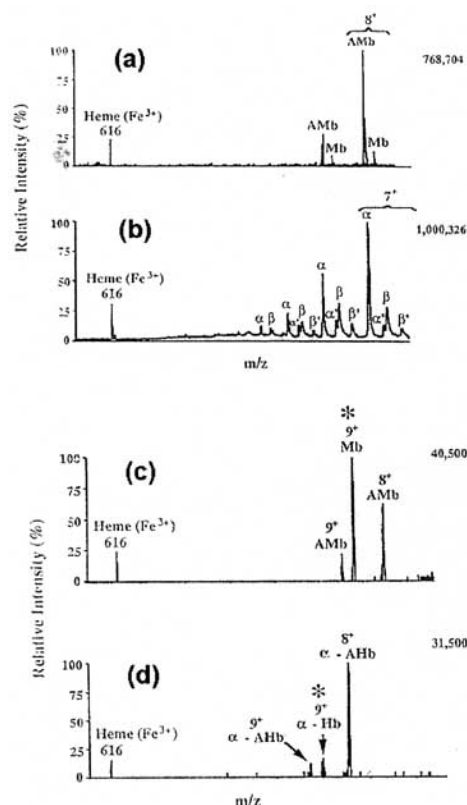


Fig. (11). Comparison of native fragmentation spectra obtained under in-source CID conditions at $V_c = 120\text{V}$ concerning (a) myoglobin and (b) hemoglobin and under MS/MS conditions using a triple quadrupole instrument, at $E_{\text{coll}} = 900\text{eV}$, on the 9^+ charge state precursor ion (*) of (c) myoglobin and (d) hemoglobin. (Reprinted by permission of Elsevier Science from ref [65], Copyright 1993, by the American Society for Mass Spectrometry).

The good results obtained using both techniques can indicate future strategies, *i.e.* to make MS^3 with a MS/MS instrument [67], which is less expensive than a real MS/MS/MS instrument.

CONCLUSION

In-source CID is not a well-understood process since it is not yet known exactly where the ions are formed and where collision process occurs in the ion source. Furthermore, it is not clear how exactly the collision energy is transferred by an increase in capillary potential or cone voltage. In-source CID appears to be a low-energy multiple collision process. Generally, in-source produced CID fragment ions appear to be similar in structure to those observed by tandem mass spectrometry, conducted under low-energy conditions (TQ, IT, o-Q-tof, ICRMS), whereas different but complementary fragment ions are acquired on mass spectra when the MS/MS corresponds to a high-energy process (electromagnetic sectors). In particular, in-source CID seems to have a fragmentation process similar to that of low-energy tandem mass spectrometry when the MS/MS instrument was composed by triple quadrupole (same type of energy). The fragment ion intensities appear to be higher when the fragmentation is achieved in the source rather than in the

collision gas cell. This phenomenon is the result of the non-selection of the parent ion in the source and of the fragmentation of the fragment ions at high energies. However, if a comparison has to be made between the energy values obtained in the source and in the collision gas cell, these values seem to be more dependent on the molecule to fragment rather than on the instrumental process.

However, in-source CID can generate reliable information only when one dominant ion is formed in the ionization process. In this case, in-source CID has the advantage of being quicker, easier to use and less expensive than a tandem mass spectrometer. However, if the mixture is complex, tandem mass spectrometry is preferred. One advantage of MS/MS is to achieve MS³ when the in-source CID conditions are favorable.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Agnès Delmas for her important advice and Frances Westall for her careful reading of the manuscript.

ABBREVIATIONS

APCI	=	atmospheric pressure chemical ionization
API	=	atmospheric pressure ionization
CID	=	collision-induced dissociation
CRM	=	charged residue model
ESI	=	electrospray ionization
ICRMS	=	ion cyclotron resonance mass spectrometry
IEM	=	ion evaporation mechanism
IT	=	ion trap
LC	=	liquid chromatography
LSIMS	=	liquid secondary-ionization mass spectrometry
MALDI	=	matrix assisted laser desorption ionization
MS	=	mass spectrometry
MS/MS	=	tandem mass spectrometry
MS ⁿ	=	n stages of mass spectrometry
o-Q-tof	=	orthogonal quadrupole-time-of-flight
PSD	=	post-source decay
RF	=	radio-frequency
tof	=	time-of-flight
TQ	=	triple quadrupole
Vc	=	voltage applied on the sample cone

REFERENCES

- [1] Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. *Science*, **1989**, 246, 64.
- [2] Greer, F.M.; Morris, H.R. In *Methods in Molecular Biology*; Smith, B.J., Ed.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, **1997**, Vol. 64, pp. 147-163.
- [3] Yates, III, J.R. *J. Mass Spectrom.*, **1998**, 33, 1.
- [4] Loo, J.A.; Udseth, H.R.; Smith, R.D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 207.
- [5] Harrison, A.G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13, 1663.
- [6] Gaskell, S.J. *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 677.
- [7] Cole, R.B. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 763.
- [8] Kebarle, P. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 804.
- [9] De Hoffmann, E.; Charette, J.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Wiley: Chichester, **1999**.
- [10] De Hoffmann, E. *J. Mass Spectrom.*, **1996**, 31, 129.
- [11] Willoughby, R.; Sheehan, E.; Mitrovich, S. *A global view of LC/MS: How to solve your most challenging analytical problems*, Global View Publishing: Pittsburgh, Pennsylvania, **1998**.
- [12] Lin, T.; Glush, G.L.; *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 5162.
- [13] Griffiths, W.J.; Jonsson, A.P.; Liu, S.; Rai, D.K.; Wang, Y. *Biochem. J.*, **2001**, 355, 545.
- [14] Shukla, A.K.; Futrell, J.H. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 1069.
- [15] Bordoli, R.S.; Bateman, R.H. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1992**, 122, 243.
- [16] Meng, C.K.; McEwen, C.N.; Larsen, B.S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1990**, 4, 151.
- [17] Biemann, K. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **1988**, 16, 99.
- [18] Lindh, I.; Griffiths, W.J.; Bergman, T.; Sjövall, J. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1997**, 164, 71.
- [19] Nizigiyimana, L.; Van den Heuvel, H.; Claeys, M. *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 277.
- [20] Morand, K.L.; Cox, K.A.; Cooks, R.G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6, 520.
- [21] Buré, C.; Sellier, N.; Lesage, D.; Fournier, F.; Tabet, J.C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, 14, 872.
- [22] March, R.E. *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 351.
- [23] Buré, C.; Lelièvre, D.; Delmas, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, 14, 2158.
- [24] Premstaller, A.; Huber, C.G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15, 1053.
- [25] Barinaga, C.J.; Edmonds, C.G.; Udseth, H.R.; Smith, R.D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1989**, 3, 160.
- [26] Thulin, C.D.; Walsh, K.A. *Biochemistry*, **1995**, 34, 8687.
- [27] Rossomando, A.J.; Wu, J.; Michel, H.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.; Weber, M.J.; Sturgill, T.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 5779.
- [28] Carr, S.A.; Huddleston, M.J.; Bean, M.F. *Protein Sci.*, **1993**, 2, 183.
- [29] Premstaller, A.; Ongania, K.-H.; Huber, C.G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15, 1045.
- [30] Steen, H.; Küster, B.; Mann, M. *J. Mass Spectrom.*, **2001**, 36, 782.
- [31] Chernushevich, I.V.; Loboda, A.V.; Thomson, B.A. *J. Mass Spectrom.*, **2001**, 36, 849.
- [32] Collette, C.; Drahos, L.; De Pauw, E.; Vékey, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, 1673.
- [33] Dono, A.; Paradisi, C.; Scorrano, G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, 11, 1687.
- [34] Letzel, T.; Pöschl, U.; Rosenberg, E.; Grasserbauer, M.; Niessner, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13, 2456.
- [35] Collette, C.; De Pauw, E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, 165.
- [36] Weinmann, W.; Stoertz, M.; Vogt, S.; Svoboda, M.; Schreiber, A. *J. Mass Spectrom.*, **2001**, 36, 1013.
- [37] Schneider, B.B.; Douglas, D.J.; Chen, D.D.Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15, 249.
- [38] Bogusz, M.J.; Maier, R.-D.; Krüger, K.D.; Webb, K.S.; Romeril, J.; Miller, M.L. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 844, 409.
- [39] Weinmann, W.; Wiedemann, A.; Eppinger, B.; Renz, M.; Svoboda, M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10, 1028.
- [40] Katta, V.; Chowdhury, S.K.; Chait, B.T. *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 174.

- [41] Kiehl, D.E.; Julian, R.K., Jr; Kennington, A.S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, *12*, 903.
- [42] Crescenzi, C.; Di Corcia, A.; Marcomini, A.; Pojana, G.; Samperi, R. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 923, 97.
- [43] Weinmann, W.; Stoertzel, M.; Vogt, S.; Wendt, J. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 926, 199.
- [44] Pedersen, S.N.; Francesconi, K.A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, *14*, 641.
- [45] Huddleston, M.J.; Annan, R.S.; Bean, M.F.; Carr, S.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1993**, *4*, 710.
- [46] Mazsaroff, I.; Yu, W.; Kelley, B.D.; Vath, J.E. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 2517.
- [47] Hakansson, K.; Zubarev, R.; Hakansson, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, *12*, 705.
- [48] Bischoff, R.; Lepage, P.; Jaquinod, M.; Cauet, G.; Acker-Klein, M.; Clesse, D.; Laporte, M.; Bayol, A.; Van Dorsselaer, A.; Roitsch, C. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 725.
- [49] Buré, C.; Gobert, W.; Lelièvre, D.; Delmas, A. *J. Mass Spectrom.*, **2001**, *36*, 1149.
- [50] Pramanik, B.N.; Bartner, P.L.; Mirza, U.A.; Liu, Y.-H.; Ganguly, A.K. *J. Mass Spectrom.*, **1998**, *33*, 911.
- [51] Rogniaux, H.; Van Dorsselaer, A.; Barth, P.; Biellmann, J.F.; Barbanton, J.; Van Zandt, M.; Chevrier, B.; Howard, E.; Mitschler, A.; Potier, N.; Urzhumtseva, L.; Moras, D.; Podjary, A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, *10*, 635.
- [52] Hunter, C.L.; Grant Mauk, A.; Douglas, D.J.; *Biochemistry*, **1997**, *36*, 1018.
- [53] Potier, N.; Barth, P.; Tritsch, D.; Biellmann, J.-F.; Van Dorsselaer, A. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *243*, 274.
- [54] Little, D.P.; Chorush, R.A.; Paul Speir, J.; Senko, M.W.; Kelleher, N.L.; Mc Lafferty, F.W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 4893.
- [55] Müller, C.; Vogt, S.; Goerke, R.; Kordon, A.; Weinmann, W. *Forensic Sci. Int.*, **2000**, *113*, 415.
- [56] Harrison, A.G. *J. Mass Spectrom.*, **1999**, *34*, 1253.
- [57] Makowiecki, J.; Tolonen, A.; Uusitalo, J.; Jalonen, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, *15*, 1506.
- [58] Pais, P.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M.T.; *J. Chromatogr. A*, **1997**, 775, 125.
- [59] Rozman, E.; Galceran, M.T.; Albet, C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, *9*, 1492.
- [60] Voyksner, R.D.; Pack, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1991**, *5*, 263.
- [61] Van Dongen, W.D.; Van Wijk, J.I.T.; Green, B.N.; Heerma, W.; Haverkamp, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, *13*, 1712.
- [62] Griffiths, W.J.; Lindh, I.; Bergman, T.; Sjövall, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, *9*, 667.
- [63] Sadagopan, N.; Throck Watson, J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, *11*, 107.
- [64] Doerge, D.R.; Bajic, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, *9*, 1012.
- [65] Li, Y.-T.; Hsieh, Y.-L.; Henion, J.D.; Ganem, B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1993**, *4*, 631.
- [66] Harrison, A.G.; Csizmadia, I.G.; Tang, T.-H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, *11*, 427.
- [67] Chen, H.; Tabei, K.; Siegel, M.M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, *12*, 846.

Chapitre II : Comparaison de la fragmentation dans la source électrospray et dans la cellule de collision

La fragmentation dans la source électrospray donne des informations structurales similaires à la fragmentation dans la cellule de collision d'un instrument de type triple-quadripôle. Ce résultat a été mis en évidence par Van Dongen et coll. [1999] qui ont comparé la fragmentation dans la source électrospray d'un Platform II simple quadripôle (Micromass) avec la fragmentation dans la cellule de collision d'un Quattro II (Micromass) et par Sadagopan et Watson [2000] qui ont comparé la fragmentation dans la source électrospray d'un VG Platform (Fison) et d'un LCQ (Finnigan) avec la fragmentation dans la cellule de collision d'un API 2000 (PE Sciex).

Nous avons comparé la fragmentation dans la source électrospray et la fragmentation dans la cellule de collision du spectromètre sur lequel toutes les études décrites dans ce mémoire ont été réalisées: un instrument de type triple quadripôle (Quattro II, Micromass). Ce spectromètre de masse a été évalué avec des peptides modèles monochargés de séquence simple (peptides thioester).

I. Présentation des peptides thioester modèles

Dans cette étude, nous avons choisi cinq peptides de synthèse (tableau 1). Ce sont des modèles simples: (i) la séquence est croissante par ajout d'un acide aminé neutre (leucine) à chaque fois. L'étude peut ainsi porter sur la seule influence de la longueur du peptide sur la fragmentation. (ii) la séquence ne permet qu'un seul état de charge situé en N-terminal (site le plus basique de la séquence) pour chaque peptide. Ainsi, le paramètre de l'état de charge ne joue pas de rôle dans cette étude. (iii) un éthyl thioester est introduit en C-terminal.

L'efficacité de fragmentation pourra ainsi être suivie grâce à la perte d'un neutre (ethanethiol). Ces peptides thioester ont été synthétisés au laboratoire par Marylène Bertrand dans le cadre d'un programme d'exobiologie [Bertrand 2001].

Tableau 1 : Séquence et masse des peptides thioester étudiés

Peptide	Séquence	Masse MH ⁺ (Da)	
		expérimentale	calculée
Leu ₂ SEt	H-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	289.3	289.1
Leu ₃ SEt	H-Leu-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	402.5	402.6
Leu ₄ SEt	H-Leu-Leu-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	515.5	515.8
Leu ₅ SEt	H-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	628.5	628.9
Leu ₆ SEt	H-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	741.6	742.1

II. Comparaison de la fragmentation dans la source avec la fragmentation obtenue dans la cellule de collision

Chacun des cinq peptides thioester (tableau 1) a été fragmenté dans la source électrospray et dans la cellule de collision. La fragmentation dans la source s'effectue en augmentant la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (V_c) de 10 à 120 V et la fragmentation dans la cellule de collision est obtenue en faisant varier la tension appliquée sur la cellule de collision balayée seulement en radio-fréquence (V_{cell}) de 0 à 54 V.

Les figures 1-5 montrent que le profil des ions fragments montré sur les spectres de masse obtenus par CID dans la source peuvent être similaires au profil montré sur les spectres de masse obtenus par fragmentation dans la cellule de collision si nous choisissons à dessein, d'une part le V_c et d'autre part le V_{cell}.

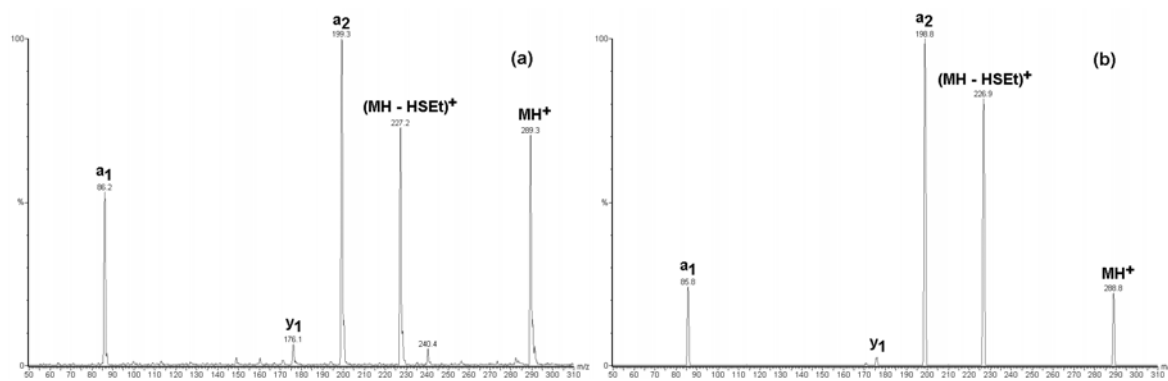


Figure 1 : Spectres de masse du **peptide thioester Leu₂SEt** obtenu par fragmentation dans la source à $V_c=35$ V (a) et par CID dans la cellule de collision de $[M+H]^+$ à $V_{cell}=10$ V (b).

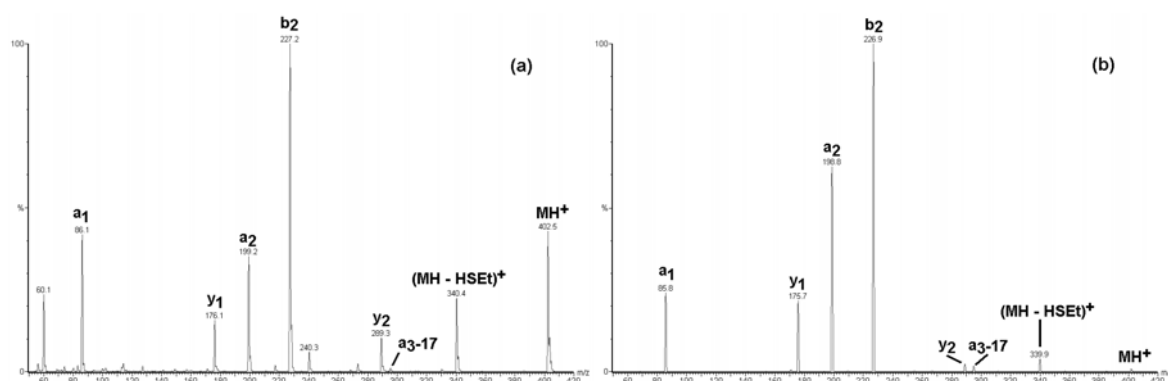


Figure 2 : Spectres de masse du **peptide thioester Leu₃SEt** obtenu par fragmentation dans la source à $V_c=60$ V (a) et par CID dans la cellule de collision de $[M+H]^+$ à $V_{cell}=16$ V (b).

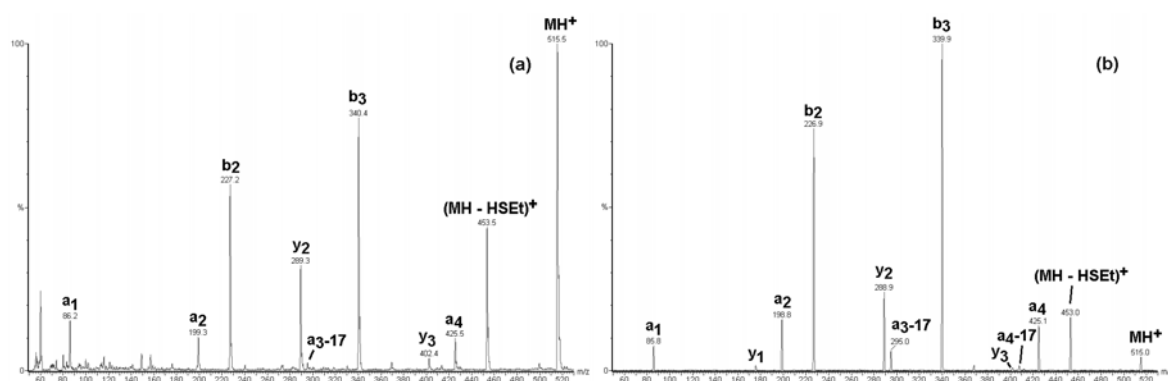


Figure 3 : Spectres de masse du **peptide thioester Leu₄SEt** obtenu par fragmentation dans la source à $V_c=60$ V (a) et par CID dans la cellule de collision de $[M+H]^+$ à $V_{cell}=16$ V (b).

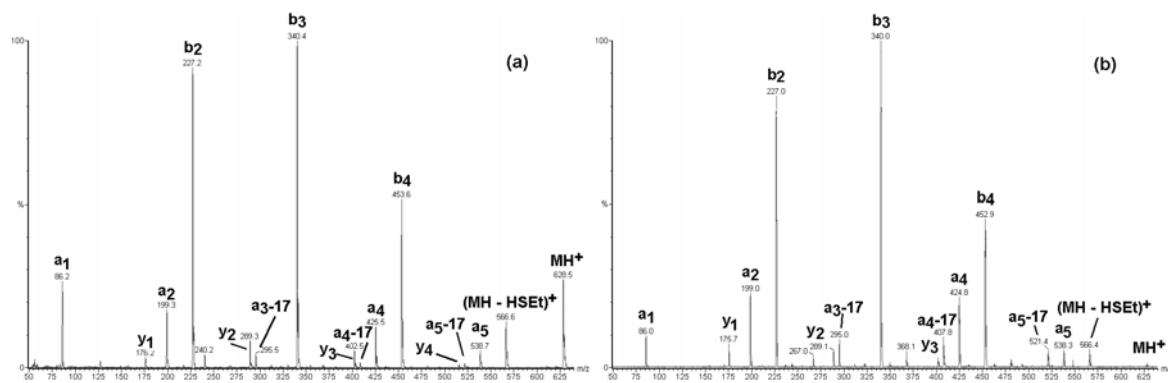


Figure 4 : Spectres de masse du **peptide thioester Leu₅SEt** obtenu par fragmentation dans la source à $V_c=75$ V (a) et par CID dans la cellule de collision de $[M+H]^+$ à $V_{cell}=24$ V (b).

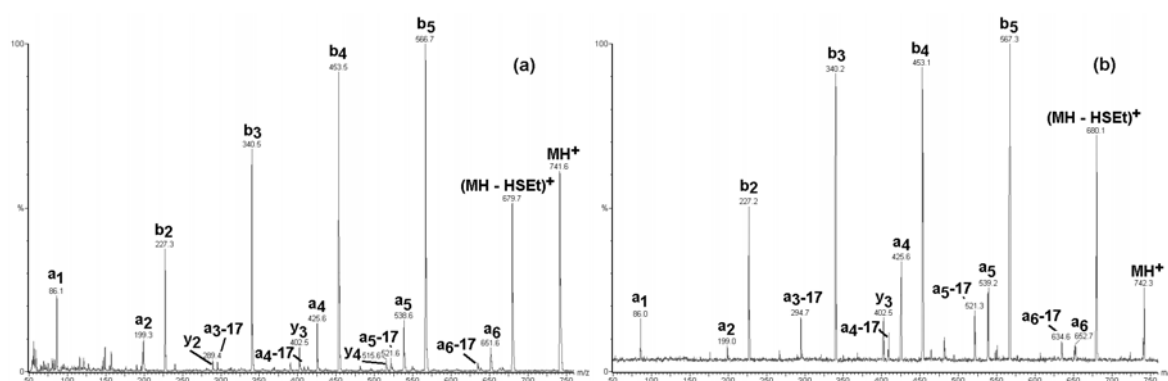


Figure 5 : Spectres de masse du **peptide thioester Leu₆SEt** obtenu par fragmentation dans la source à $V_c=75$ V (a) et par CID dans la cellule de collision de $[M+H]^+$ à $V_{cell}=22$ V (b).

En comparant les deux processus de fragmentation, nous obtenons des informations structurales similaires quelle que soit la longueur du peptide, même si l'abondance relative des ions fragments est différente en fonction du processus de fragmentation: (i) la première fragmentation du peptide correspond à la perte de l'éthanethiol (HSEt) provenant de la fonction thioester en C-terminal. (ii) la série des ions b prédomine sur les spectres quel que soit le peptide. La série des ions a et une série d'ions (a_n-17) avec $n \geq 3$ sont également observées sur les spectres. La particularité de ces peptides réside en l'absence de l'ion fragment a_3 et en la présence de l'ion fragment (a_3-17) à m/z 295.

Un autre moyen de comparer les deux processus de collision est de comparer les graphes de fragmentation construits à partir des spectres de masse où le pourcentage de l'ion d'intérêt par rapport au courant ionique total est exprimé en fonction de V_c ou V_{cell} (figures 6-10).

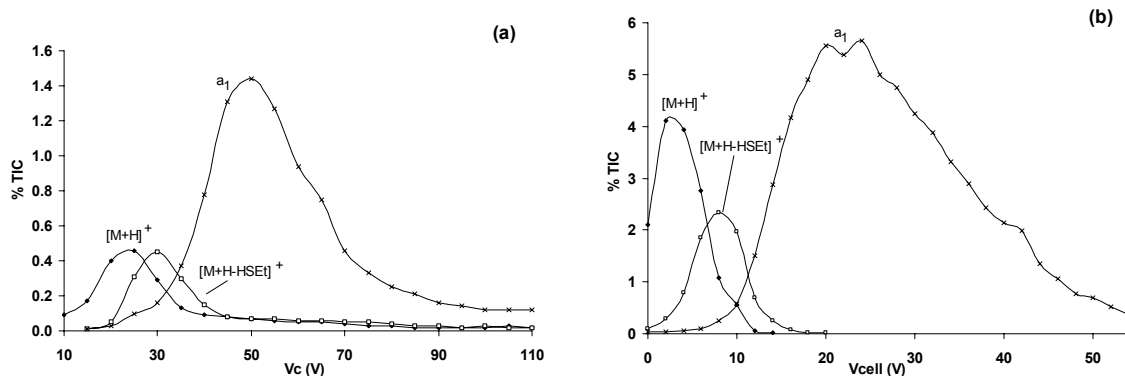


Figure 6 : Graphes de fragmentation du **peptide thioester Leu₂SEt** obtenus par collision dans la source électrospray (a) et par CID dans la cellule de collision du triple quadripôle (b).

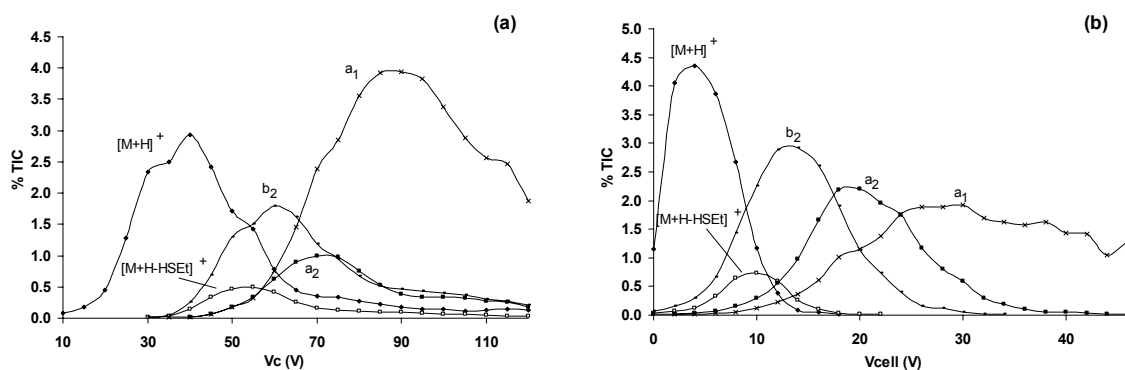


Figure 7 : Graphes de fragmentation du **peptide thioester Leu₃SEt** obtenus par collision dans la source électrospray (a) et par CID dans la cellule de collision du triple quadripôle (b).

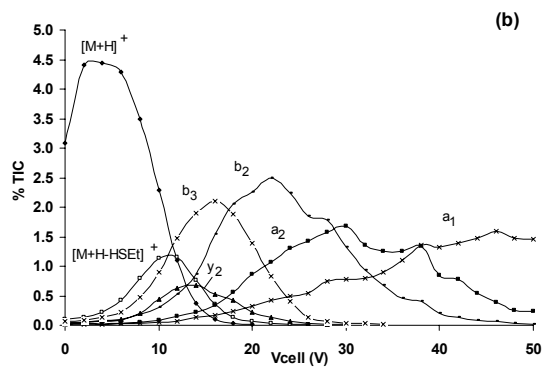
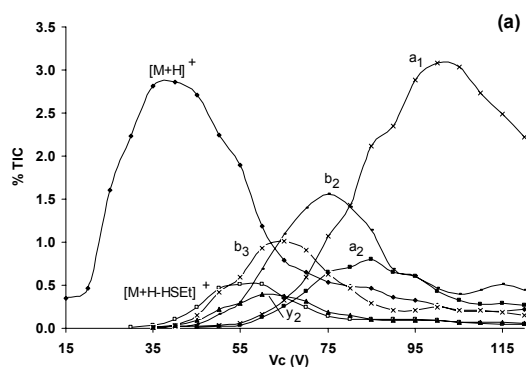


Figure 8 : Graphes de fragmentation du **peptide thioester Leu₄SEt** obtenus par collision dans la source électrospray (a) et par CID dans la cellule de collision du triple quadripôle (b).

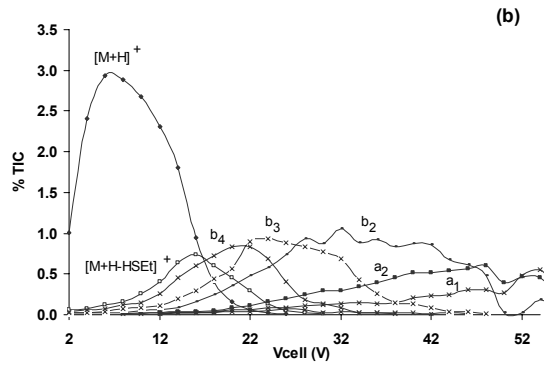
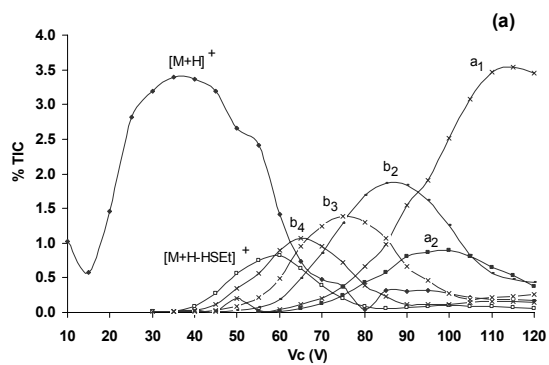


Figure 9 : Graphes de fragmentation du **peptide thioester Leu₅SEt** obtenus par collision dans la source électrospray (a) et par CID dans la cellule de collision du triple quadripôle (b).

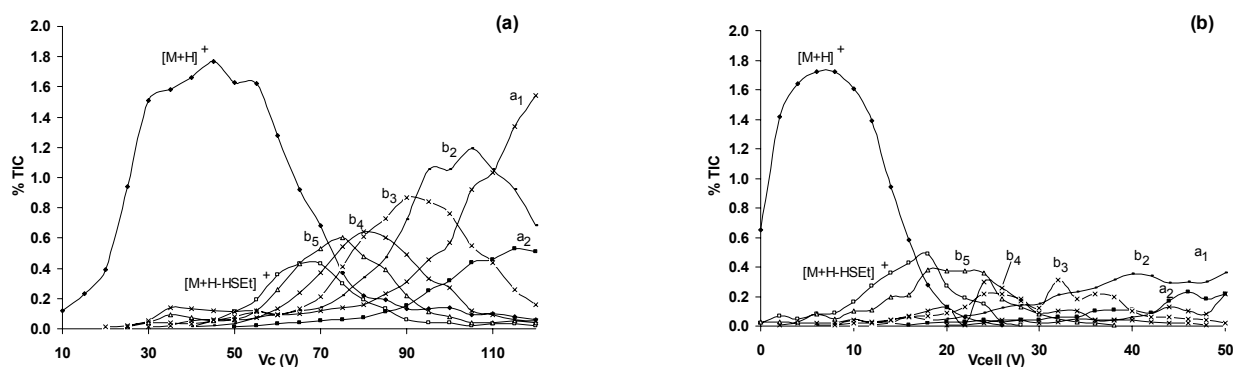


Figure 10 : Graphes de fragmentation du **peptide thioester Leu₆SEt** obtenus par collision dans la source électrospray (a) et par CID dans la cellule de collision du triple quadripôle (b).

Les graphes de fragmentation permettent d'avoir une vision plus générale de l'évolution de l'abondance des ions fragments. Ainsi, nous constatons qu'à des V_c élevés, l'abondance des ions fragments par rapport à l'ion précurseur issus de la CID dans la source est plus importante que celle des ions fragments issus de la CID dans la cellule de collision. Ceci peut être expliqué par la fragmentation consécutive des ions, par une meilleure désolvatation et par une transmission plus efficace lorsque V_c est augmenté.

Comme la CID dans la source ne permet pas une sélection de l'ion parent, il est essentiel de réaliser des expériences sur des échantillons purs afin de tirer parti des spectres de masse CID.

III. Efficacité de fragmentation en fonction de la longueur du peptide

Nous avons voulu évaluer l'efficacité de fragmentation en fonction de la longueur du peptide. Dans ce but, nous avons suivi la première fragmentation de chaque peptide correspondant à la perte du neutre éthanethiol qui est caractéristique de la fonction thioester localisée en C-terminal. Nous avons relevé les valeurs de V_c et V_{cell} correspondantes au début de cette

fragmentation et nous les avons reportées sur un graphe en fonction du rapport m/z de l'ion $[M+H-HSEt]^+$ (figure 11).

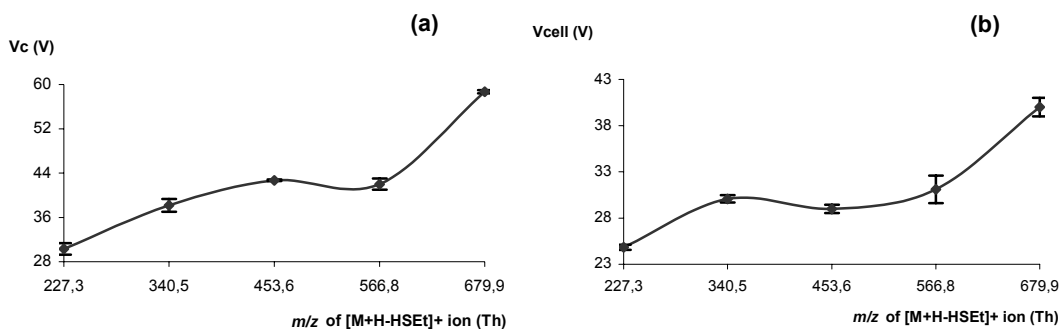


Figure 11 : Effet de la longueur du peptide lorsque la fragmentation est obtenue dans la source (a) et dans la cellule de collision du triple quadripôle (b).

Si nous posons qu'il n'y a pas de modification de conformation en augmentant la longueur du peptide et que le mécanisme de fragmentation est identique pour tous les peptides, nous constatons, comme prévu, que l'efficacité de fragmentation est d'autant plus faible que le peptide est plus long. En effet, d'après la théorie RRKM, la réaction de décomposition dépend de l'énergie interne de l'ion et du nombre d'oscillateurs au sein de la molécule. Plus la molécule est petite, plus le nombre d'oscillateurs est faible et l'énergie interne qui se répartit sur tous les oscillateurs sera alors plus importante sur un oscillateur donné, d'où une fragmentation plus efficace.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons comparé la fragmentation de peptides thioester dans la source électrospray et leur fragmentation dans la cellule de collision d'un instrument de type triple quadripôle (Quattro II, Micromass).

L'étude de ces peptides thioester de charge constante et de longueur croissante montre que nous obtenons des informations structurales identiques en fragmentant dans la source et en MS/MS. Les spectres de fragmentations sont dominés logiquement par les ions fragments b, quelle que soit la longueur du peptide. La particularité de ces peptides thioester est l'absence des ions fragments a_3 et la présence des ions (a_3-17). Nous constatons également que la longueur du peptide n'a pas d'influence sur l'information structurale.

Nous avons voulu évaluer l'efficacité de fragmentation en fonction de la longueur du peptide et nous avons constaté que l'efficacité de fragmentation est d'autant plus faible que le peptide est long. Ainsi, les peptides thioester étant monochargés, il y a un effet de la masse des peptides sur la fragmentation comme l'ont suggéré Dongré et coll. [1996] et Yeh et coll. [1991].

V. Publication

'Collision-induced dissociation of peptide thioesters: influence of the peptide length on the fragmentation'

Corinne Buré, Olivier Boujard, Marylène Bertrand, Catherine Lange and Agnès F. Delmas

Eur. J. Mass Spectrom., 2005, 11, 31-34.

Letter

Collision-induced dissociation of peptide thioesters: the influence of peptide length on fragmentation

Corinne Buré,^{a,*} Olivier Boujard,^a Marylène Bertrand,^a Catherine Lange^b and Agnès F. Delmas^{a,*}

^aCentre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, ^crue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France.

E-mail: bure@cnrs-orleans.fr; delmas@cnrs-orleans.fr

^bSpectrométrie de Masse Bio-organique, CNRS-UMR 6014, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan cedex, France

Five peptide thioesters of increasing length were fragmented using two processes, in-source and in-collision cell fragmentation, using an electrospray source coupled to a triple quadrupole mass spectrometer. Comparison of their fragmentations was made in regard to their length. The two fragmentation conditions show that the peptide length has no influence on structural information and that the fragmentation efficiency is higher for the smallest peptides than for the longest. The particularity of these peptide thioesters consists of the neutral loss of ethanethiol. The absence of the a_3 fragment ion and the presence of the (a_3-17) ion on the collision-induced dissociation mass spectra are noted.

Keywords: peptide thioesters, fragmentation, peptide length

A mass spectrum resulting from collision-induced dissociation (CID) is highly dependent on the conditions under which it is recorded. Usually, CID is achieved in the collision cell of a tandem (MS/MS) mass spectrometer. In the source of an electrospray, increasing the potential applied to the sample cone can produce dissociations according to the low-energy collision process, which induces backbone fragmentations leading to the a, b, c and x, y, z ion series.¹ Comparisons of low-energy fragmentation processes, achieved by in-source CID^{2,3} or by low-energy CID tandem mass spectrometry,⁴ have been reported.^{5–7}

Regarding the fragmentation of peptides, CID mass spectra are dependent on the sequence of the studied peptides, mainly in terms of charge and size. The more an ion is charged, the more easily it fragments.^{3,8} Moreover, the nature, the number and the location of basic amino acids alter the fragmentation efficiency.^{9,10} Apart from the

influence of basic residues, selective cleavages of the backbone were observed at specific amino acids such as acidic residues¹¹ or proline.¹² The peptide size also influences the fragmentation, as suggested by Dongré *et al.*⁹ and Yeh *et al.*,¹³ who observed differences in CID mass spectra concerning the backbone cleavage.

Here, we report on the influence of the peptide length on two fragmentation processes, in-source and in-collision cell CID. With this aim, we chose five new synthetic peptides C-terminally derivatised with a thioester function, Leu_nSEt ($2 < n < 6$) (Table 1). The N-terminus of these peptides is free, potentially, to support a charge and an ethyl thioester was introduced at the C-terminus. The efficiency of fragmentation was evaluated by following the loss of the corresponding ethanethiol. As each peptide of this series contains only one charge, the electrospray mass spectra will reflect the sole effect of the size of the peptides on the ionisation process.

The five peptide thioester models were synthesised as part of a programme of exobiology using the solid-phase method with an automated peptide synthesiser, as previously

*Affiliated to the University of Orléans and to INSERM.

Table 1. Sequence and mass of the peptide thioesters studied.

Peptide	Sequence	Mass (Da)	
		Experimental [M+H] ⁺	Calculated [M+H] ⁺
Leu ₂ SEt	H-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	289.3	289.1
Leu ₃ SEt	H-Leu-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	402.5	402.6
Leu ₄ SEt	H-Leu-Leu-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	515.5	515.8
Leu ₅ SEt	H-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	628.5	628.9
Leu ₆ SEt	H-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-S-CH ₂ -CH ₃	741.6	742.1

described.¹⁴ Analyses were performed on a triple quadrupole mass spectrometer using Masslynx application software [v 3.4] (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) equipped with a nebuliser assisted electrospray source. The high-flow nebuliser was operated in standard mode with N₂ as both nebulising (20 L h⁻¹) and drying (250 L h⁻¹) gas. External calibration of the mass spectrometer was performed using myoglobin. In-source CID mass spectra were obtained by increasing the sample cone voltage (Vc). Tandem mass spectrometry analyses were achieved at a collision cell voltage (Vcell) and argon collision gas was maintained at a pressure of 3.2×10^{-3} Torr within the RF-only hexapole collision cell. Each data point was an average of three measurements. The standard deviation was below 5%. MS experiments were achieved on HPLC-purified peptide samples in the positive mode. 3 μ L of each peptide were introduced via a Rheodyne 7125 injection valve with a 10 μ L sample loop and eluted with 80/20 acetonitrile/water. ESI mass spectra were obtained in the positive-ion mode.

The fragmentation of five oligoleucine thioesters (Table 1) was achieved either in the source by varying the sample cone voltage (Vc) from 10 to 120 V in 5 V increments or in the collision cell by increasing the collision cell voltage (Vcell) ranging from 0 to 54 V in 2 V increments, with a sample cone voltage adjusted to 22 V. As it has already been observed that in-source CID yields comparable product ion spectra as in-collision cell CID,⁶ such experimental conditions were found for each peptide of the thioester series. As a representative example, Figure 1 gives spectra of Leu₅SEt.

In the two processes, the first cleavage corresponds to the loss of ethanethiol (HSEt) coming from the C-terminal thioester. This is in agreement with previous studies which suggest that peptides seem to fragment easily at the C-terminal side, either as free α -COOH¹³ or as functionalised COOH with aldehyde, acetal or carboxamide.¹⁵ Figure 1 also shows that the most intense ions are the b_n-series. The absence of the b₁ fragment ion is explained by its lesser stability compared with other b_n-ions.^{8,16} The a-ion and (a-17)-ion series were also present with the peculiar absence of the a₃-fragment ion. Interestingly, we noted the presence of the a₃₋₁₇ ion. The y-ion series were barely detected over the

background, indicating that the charge must be located at the N-terminal side, probably at the α -NH₂, the more basic site than the C-terminal thioester side.

By comparing the fragmentation of Leu_nSEt peptide thioesters in the two processes, breakdown graphs were established. The five peptide thioesters of increasing length gave the same ion series and breakdown graphs of Leu₅SEt are given as an example (Figure 2). The same fragment a- and b-ion series were obtained in the two processes, even if relative intensities of fragments differ. This indicates

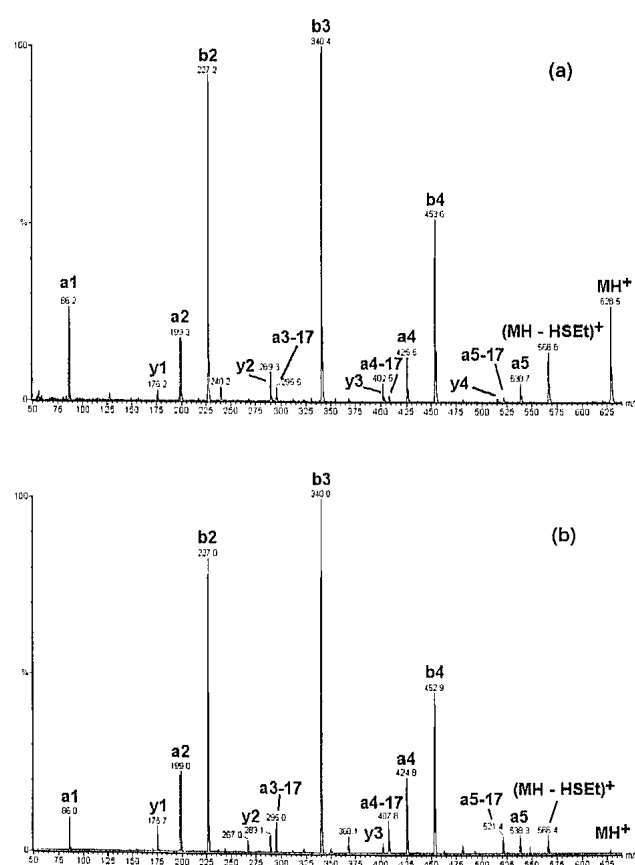


Figure 1. ESI mass spectra of the peptide thioester Leu₅SEt obtained by (a) in-source CID at Vc = 75 V and (b) by CID on [M+H]⁺ in the collision cell at Vcell = 24 V.

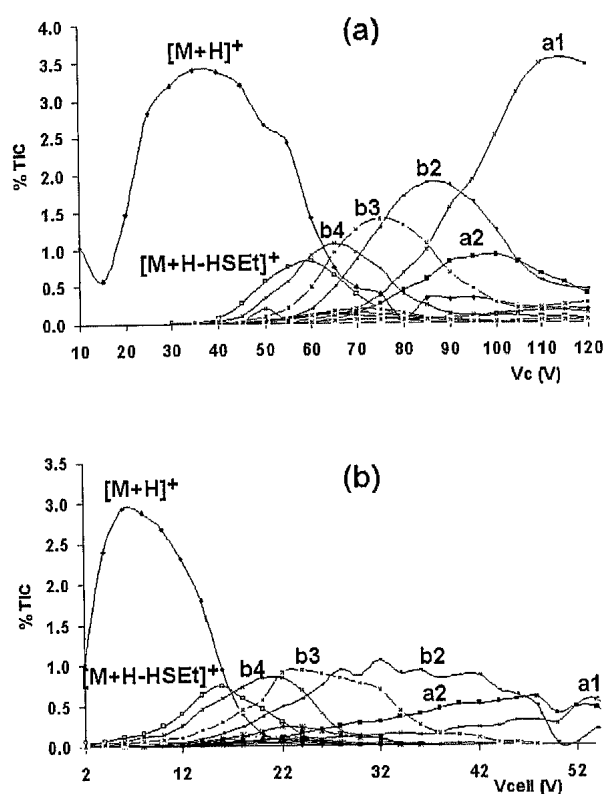


Figure 2. Breakdown graphs of the peptide thioester Leu_5SET obtained by (a) in-source CID and (b) by CID in the collision cell of the tandem mass spectrometer.

that varying conditions for in-source CID and in-collision cell CID gave similar structural information with no influence on the peptide length, contrary to fast atom bombardment (FAB) fragmentation of oligoalanines, Ala_n , and oligoglycines, Gly_n , with free N- and C-termini.¹³ In the RF-only collision cell, abundances of a- and b-ion series, especially the a_1 fragment ion, seem to be lower than those in the ion source, with the profile of the curves being slightly different. In the source, the more the sample cone voltage was increased, the more the abundance of fragment ions increased, whereas it remained constant when the collision cell voltage was raised. An explanation of these abundances is quite difficult. The predominance of the a_1 ion in the source at high cone voltage can be explained by the fragmentation of the other daughter ions. The true MS/MS, in the RF-only collision cell, gives more rigorous fragment ions, since V_{cell} and argon pressure are controlled. In the desolvation region, parameters are not really controlled and spectra provided are rather qualitative. These data extend previous observations which are noted that in-source CID is not a general method to determine a compound in a mixture but it is a useful method for the fragmentation chemistry of pure compounds^{2,7} owing to its simple and readily-implemented method of fragmentation.

The influence of the peptide length on the fragmentation efficiency was studied further by following the first loss appearing in CID mass spectra. This first loss

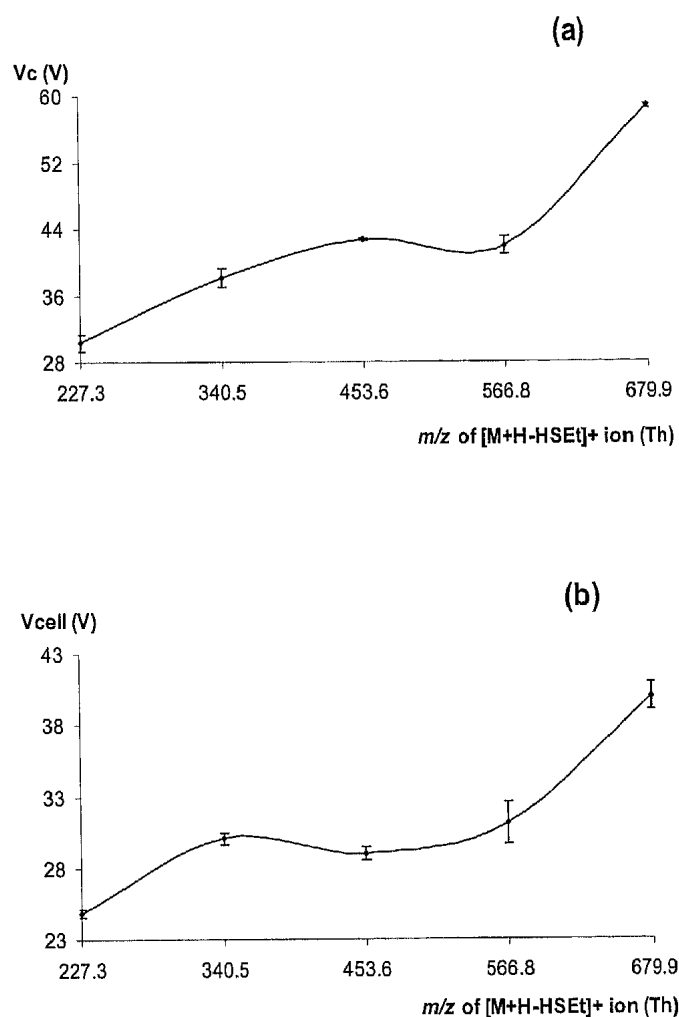


Figure 3. Length effect on the loss of HSET from Leu_nSET peptides. (a) Sample cone voltage when the fragmentation is achieved in the source and (b) collision cell voltage when it is carried out in the collision cell are expressed as a function of the mass when the loss of ethanethiol is followed. The intensity of the $[MH-HSET]^+$ ion represents 0.2% total ion current (see breakdown graph of Figure 2).

corresponds to the neutral loss of ethanethiol, which is a characteristic loss of the C-terminal thioester function. In the spectra of all Leu_nSET , it has been observed that the $[MH-EtSH]^+$ fragment ion is of interest in regard to V_c or V_{cell} values. Consequently, Figure 3 reports the influence of the peptide length on these two values to obtain a significant fragmentation. We observed that the voltage had to be enhanced to fragment the precursor MH^+ ion when the peptide length increased. The fragmentation efficiency is, thus, higher for the smallest peptides than for the longest. This is consistent with the work of Yeh *et al.*¹³ about oligoalanines and oligoglycines as well as with the work of Dongré *et al.*⁹ who compared three pentapeptides of increasing mass.

In this letter, we studied five peptides of increasing length, C-terminally modified by a thioester function. By using in-source fragmentation or MS/MS, we observed similar

structural information, i.e. the domination of the b-ion series, whatever the peptide length. The particularity of the peptides studied in this work resides in the absence of the a_3 fragment ion and the presence of the (a_3-17)-ion on the CID mass spectra. Moreover, the peptide length has no influence on structural information obtained by fragmentation, whereas it affects the fragmentation efficiency.

References

1. K. Biemann, "Contributions of Mass Spectrometry to Peptide and Protein Structure", *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **16**, 99 (1988).
2. V. Katta, S.K. Chowdhury and B.T. Chait, "Use of a Single-Quadrupole Mass Spectrometer for Collision-Induced Dissociation Studies of Multiply Charged Peptide Ions Produced by Electrospray Ionization", *Anal. Chem.* **63**, 174 (1991).
3. C. Buré, W. Gobert, D. Lelièvre and A. Delmas, "In-source Fragmentation of Peptide Aldehydes and Acetals: Influence of Peptide Length and Charge State", *J. Mass Spectrom.* **36**, 1149 (2001).
4. K.D.W. Roth, Z.H. Huang, N. Sadagopan and J.T. Watson, "Charge Derivatization of Peptides for Analysis by Mass Spectrometry", *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 255 (1998).
5. A.G. Harrison, "Energy-Resolved Mass Spectrometry: a Comparison of Quadrupole Cell and Cone-Voltage Collision-Induced Dissociation", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1663 (1999).
6. W.D. Van Dongen, J.I.T. Van Wijk, B.N. Green, W. Heerma and J. Haverkamp, "Comparison Between Collision Induced Dissociation of Electrosprayed Protonated Peptides in the Up-front Source Region and in a Low-energy Collision Cell", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1712 (1999).
7. C. Buré and C. Lange, "Comparison of Dissociation of Ions in an Electrospray Source, or a Collision Cell in Tandem Mass Spectrometry", *Curr. Org. Chem.* **7**, 1613 (2003).
8. K.A. Cox, S.J. Gaskell, M. Morris and A. Whiting, "Role of the Site of Protonation in the Low-Energy Decompositions of Gas-Phase Peptide Ions", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, 522 (1996).
9. A.R. Dongré, J.L. Jones, A. Somogyi and V.H. Wysocki, "Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model", *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8365 (1996).
10. J.L. Jones, A.R. Dongré, A. Somogyi and V.H. Wysocki, "Sequence Dependence of Peptide Fragmentation Efficiency Curves Determined by Electrospray Ionization/Surface-Induced Dissociation Mass Spectrometry", *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 8368 (1994).
11. G. Tsaprailis, A. Somogyi, E.N. Nikolaev and V.H. Wysocki, "Refining the Model for Selective Cleavage at Acidic Residues in Arginine-Containing Protonated Peptides", *Int. J. Mass Spectrom.* **195/196**, 467 (2000).
12. J.A. Loo, C.G. Edmonds and R.D. Smith, "Tandem Mass Spectrometry of Very Large Molecules. 2. Dissociation of Multiply Charged Proline-Containing Proteins from Electrospray Ionization", *Anal. Chem.* **65**, 425 (1993).
13. R.W. Yeh, J.M. Grimley and M.M. Bursey, "Collisionally Induced Fragmentation of Protonated Oligoalanines and Oligoglycines", *Biol. Mass Spectrom.* **20**, 443 (1991).
14. M. Bertrand, C. Buré, F. Fleury and A. Brack, in *Geochemistry and the Origin of Life*, Ed by S. Nakashima, S. Maruyama, A. Brack and B.F. Windley. Universal Academy Press, Tokyo, Japan, p. 51 (2001).
15. C. Buré, G. Le Falher, C. Lange and A. Delmas, "Fragmentation Study of Peptide Acetals and Aldehydes Using In-Source Collision-Induced Dissociation", *J. Mass Spectrom.* **39**, 817 (2004).
16. M. Mann, R.C. Hendrickson and A. Pandey, "Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry", *Ann. Rev. Biochem.* **70**, 437 (2001).

Received: 12 October 2004

Revised: 17 December 2004

Accepted: 20 December 2004

Web Publication: 12 January 2005

Chapitre III : Fragmentation dans la source électrospray de peptides aldéhyde et acétal

La fragmentation dans la source est un phénomène encore mal connu et sujet à débat. En effet, nous avons vu dans le premier chapitre de ce mémoire, que le processus de collision qui intervenait dans la source se trouvait en compétition avec le processus de désolvatation. Ces phénomènes sont également liés à la géométrie de la source et dépendent du type d'instrument.

Nous avons vu dans le deuxième chapitre de ce mémoire, que les fragmentations dans la source électrospray et en MS/MS d'oligopeptides thioester donnaient des informations structurales identiques et que l'efficacité de fragmentation dépendait de la masse du peptide.

Pour poursuivre cette comparaison des deux processus de fragmentation, nous avons étudié des peptides de séquence plus complexe et multichargés, à savoir des peptides acétal et aldéhyde. En augmentant progressivement l'énergie de collision, ces peptides perdent successivement une puis deux molécules de méthanol ou d'eau conduisant à un même ion final. Ceci nous a amené à étudier les processus de fragmentation qui sous-tendent ces pertes de méthanol ou d'eau avec des peptides modèles. A faible tension de cône en source électrospray, nous observons en phase gazeuse le reflet de l'équilibre existant en solution entre un aldéhyde et sa forme hydratée. Cette observation a permis d'apporter des éléments de compréhension au mécanisme réactionnel chimique de condensation dans l'eau d'un peptide aldéhyde sur un peptide aminooxy conduisant à une liaison oxime.

I. Fragmentation de peptides acétal et aldéhyde

I.1. Présentation des peptides étudiés

L'étude a porté sur l'influence de la longueur du peptide sur la fragmentation et sur l'influence de la nature des acides aminés. Le paramètre de l'état de charge a également été pris en compte dans cette étude car la séquence permet plusieurs états de charge situés en N-terminal ou sur des sites plus basiques (lysine, arginine). La séquence primaire des peptides acétal et aldéhyde du tableau 1 est plus complexe que celle des oligoleucine thioester précédemment étudiés. Ce sont des peptides de taille croissante (9-mer, 14-mer, 19-mer, 27-mer et 33-mer) composés de différents acides aminés. La séquence primaire du peptide 33-mer comprend la région 288-302 de la protéine de fusion du virus de la rougeole répétée deux fois.

Ces peptides sont issus de l'étude méthodologique qui a sous-tendue l'optimisation de la synthèse de longs peptides acétal [Lelièvre et coll. 2002] à partir de la stratégie développée au laboratoire [Lelièvre et coll. 1998]. Le peptide aldéhyde est rapidement obtenu à partir de ce peptide acétal par un bref traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA). Ainsi, les deux séries de peptides que nous avons étudiées diffèrent seulement par leur fonction en C-terminal, acétal ou aldéhyde. Le peptide aldéhyde hydraté, ou peptide diol, étant l'homologue du peptide acétal (tableau 1), nous attendons un comportement semblable lors de la fragmentation. Les peptides aldéhyde seront ensuite utilisés dans des réactions de ligation chimique dont l'étude sera développée dans le paragraphe II.

Tableau 1 : Séquence et masse des peptides acétal et aldéhyde étudiés

Peptide		Séquence	Masse M (Da)	
			expérimentale	calculée
9-mer	acétal	YRLEGVKA-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂	1021,1	1022,2
	aldéhyde	CHO	975,7	976,1
	diol	CH(OH) ₂	993,7	994,1
14-mer	acétal	YGVIVHRLEGVKA-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂	1527,1	1527,8
	aldéhyde	CHO	1481,3	1481,7
	diol	CH(OH) ₂	1499,5	1499,7
19-mer	acétal	YLSEIKGVIVHRLEGVKA-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂	2098,0	2098,5
	aldéhyde	CHO	2052,1	2052,4
	diol	CH(OH) ₂	2070,0	2070,4
27-mer	acétal	YIVHRLEGVLSEIKGVIVHRLEGVKA-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂	3002,0	3002,6
	aldéhyde	CHO	2956,4	2956,5
	diol	CH(OH) ₂	2974,1	2974,5
33-mer	acétal	LSEIKGVIVHRLEGVLSEIKGVIVHRLEGVKA-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂	3565,9	3566,6
	aldéhyde	CHO	3519,5	3520,2
	diol	CH(OH) ₂	3537,5	3538,2

Par ESI-MS, on détermine la masse d'un peptide aldéhyde ainsi que celle de sa forme hydratée sur un même spectre puisqu'ils sont tous les deux présents en solution. La présence de ces deux entités sera notée [ald↔diol]. Dans la suite de ce mémoire, le peptide aldéhyde hydraté sera également appelé peptide diol.

I.2. Comparaison entre les peptides acétal et les peptides aldéhyde

Les peptides acétal et [ald↔diol] ont été analysés par fragmentation dans la source électrospray, en faisant varier la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage de 10 à 80 V. Les figures 1 et 2 montrent l'influence de Vc sur les spectres de masse.

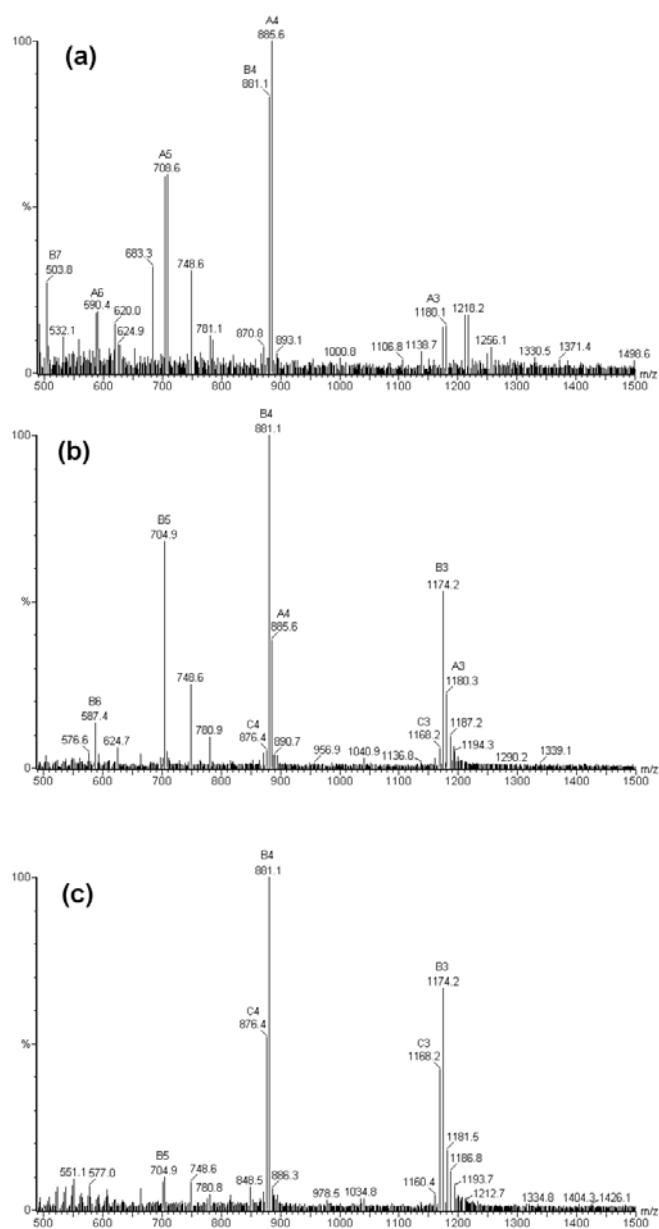


Figure 1 : Spectres de masse du **peptide [ald↔diol] 33-mer** obtenus à $V_c=15$ V (a), $V_c=45$ V (b) et $V_c=60$ V (c).

Az, Bz et Cz correspondent à $[\text{Mdiol}+z\text{H}]^{z+}$, $[\text{Mdiol}+z\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{z+}$ ou $[\text{Mald}+z\text{H}]^{z+}$, et $[\text{Mdiol}+z\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^{z+}$, z étant l'état de charge. (Figure d'après la publication du paragraphe I.5).

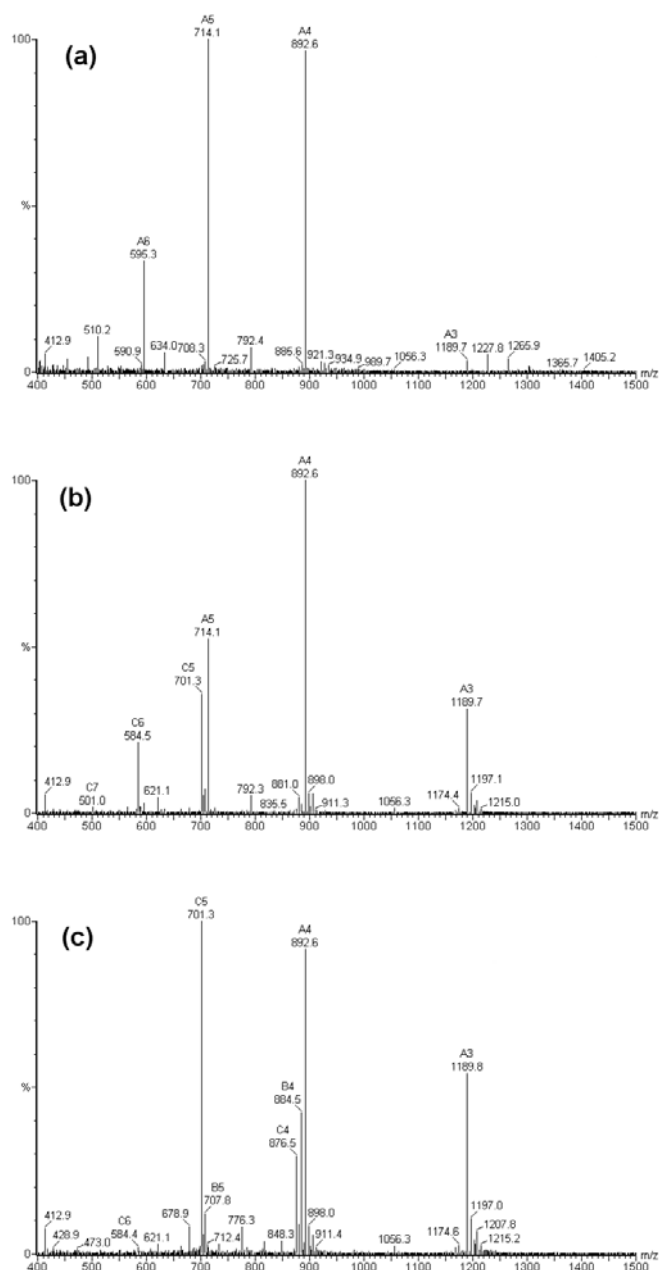


Figure 2 : Spectres de masse du **peptide acétal 33-mer** obtenus à Vc=15 V (a), Vc=45 V (b) et Vc=60 V (c).

Az, Bz et Cz correspondent à $[M+zH]^{z+}$, $[M+zH-CH_3OH]^{z+}$ et $[M+zH-2CH_3OH]^{z+}$, z étant l'état de charge. (Figure d'après la publication du paragraphe I.5).

Lorsque nous augmentons Vc, les peptides diol perdent une puis deux molécules d'eau (figure 1) et les peptides acétal perdent une puis deux molécules de méthanol (figure 2).

I.3. Comparaison de la fragmentation des peptides acétal et aldéhyde dans la source et dans la cellule de collision

Ce paragraphe est une condensation de certaines parties des publications présentées dans les paragraphes I.5 et I.7 de ce chapitre.

Dans notre étude, nous ne nous sommes intéressés qu'aux pertes de méthanol (32 Da) et aux pertes d'eau (18 Da) qui dominent les spectres de masse. La fragmentation du squelette peptidique n'est visible que dans le cas du peptide 9-mer.

Nous avons comparé la fragmentation des peptides acétal et diol dans la source à leur fragmentation dans la cellule de collision (figure 3).

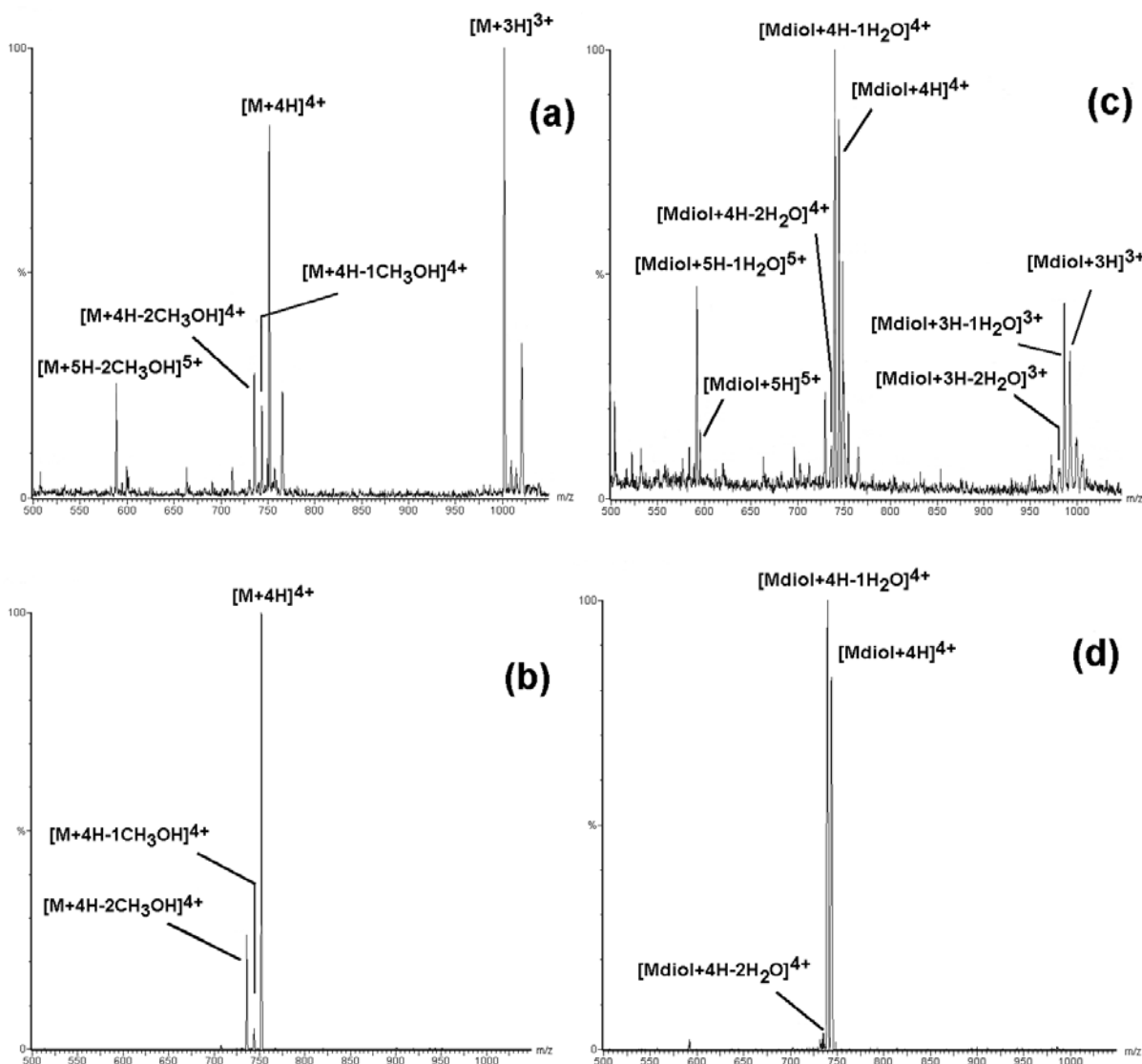


Figure 3 : Spectre de masse électrospray du **peptide acetal 27-mer** obtenu par collision dans la source à $V_c=45$ V (a) et par CID dans la cellule de collision sur l'ion $[M+4H]^4+$, m/z 751.5 à $V_{cell}=8$ V (b) et spectre de masse électrospray du **peptide [ald↔diol] 27-mer** obtenu par collision dans la source à $V_c=30$ V (c) et par CID dans la cellule de collision du **peptide diol 27-mer** sur l'ion $[Mdiol+4H]^4+$, m/z 744,5 à $V_{cell}=10$ V (d). (Figure d'après la publication du paragraphe I.7).

D'après la figure 3, nous obtenons la même information sur les pertes de méthanol et d'eau en fragmentant dans la source (figures 3a et 3c) et dans la cellule de collision (figures 3b et 3d), pour un état de charge donné ($z=4$).

Pour permettre une meilleure comparaison, nous avons établi des graphes de fragmentation suivant les pertes de méthanol et d'eau pour chaque peptide, obtenus à partir des spectres de masse. La figure 4 montre les graphes de fragmentation pour le peptide 27-mer obtenus selon les deux processus de fragmentation.

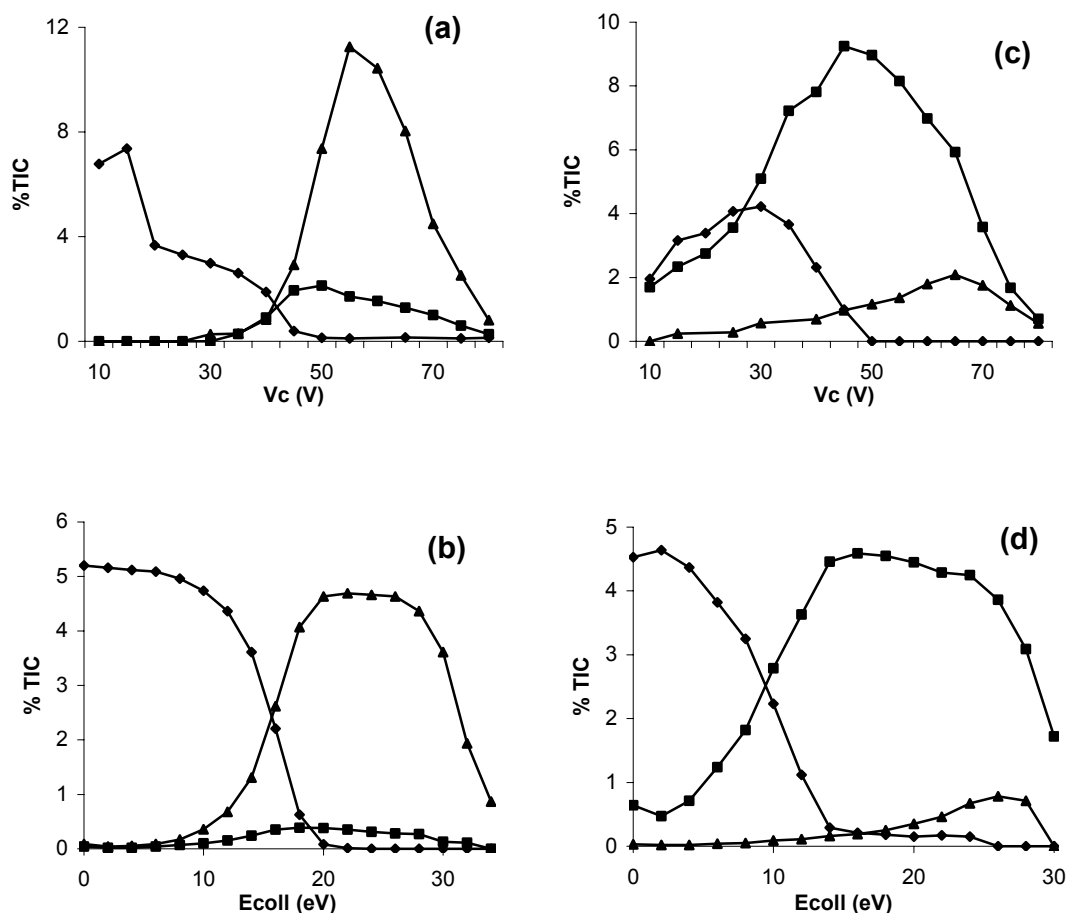
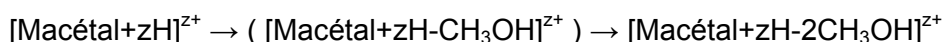


Figure 4 : Graphes de fragmentation du **peptide acétal 27-mer** à $z=4$ obtenus (a) par collision dans la source ou (b) par collision dans la cellule de collision du spectromètre de masse en tandem sur l'ion $[M+4H]^{4+}$ à m/z 751.5; ◆: $[M+4H]^{4+}$; ■: $[M+4H-CH_3OH]^{4+}$; ▲: $[M+4H-2CH_3OH]^{4+}$ et graphes de fragmentation du **peptide [ald↔diol] 27-mer** à $z=4$ obtenus (c) par collision dans la source ou (d) par collision dans la cellule de collision du **peptide diol 27-mer** sur l'ion $[Mdiol+4H]^{4+}$ à m/z 744,5; ◆: $[Mdiol+4H]^{4+}$; ■: $[Mdiol+4H-H_2O]^{4+}$ ou $[Mald+4H]^{4+}$; ▲: $[Mdiol+4H-2H_2O]^{4+}$. (Figure d'après la publication du paragraphe I.7).

Concernant les peptides acétal, la fragmentation dans la source électrospray et la fragmentation dans la cellule de collision du triple quadripôle donnent le même ion prédominant $[M+zH-2CH_3OH]^{z+}$, z étant l'état de charge (figures 4a et 4b). L'intensité de l'ion

$[M+zH-1CH_3OH]^{z+}$ étant très faible, nous pensons qu'il est instable et qu'il représente un état intermédiaire dans le processus de fragmentation entre l'ion initial $[M+zH]^{z+}$ et l'ion prépondérant $[M+zH-2CH_3OH]^{z+}$, soit:



Concernant les peptides aldéhyde, nous pouvons observer deux espèces sur les spectres de masse réalisés dans la source, l'ion aldéhyde $[Mald+zH]^{z+}$, noté $[Mdiol+zH-1H_2O]^{z+}$, et sa forme diol $[Mdiol+zH]^{z+}$ (figure 3c). Pour des faibles valeurs de V_c , l'abondance de l'ion aldéhyde et celle de l'ion diol augmentent de façon parallèle, ce qui laisse penser que la forme hydratée est stable dans ces conditions. Les graphes représentant la fragmentation dans la source (figure 4c) permettent de donner une image, à de faibles tensions de cône, de l'équilibre existant en solution entre un aldéhyde et sa forme hydratée, ce qui ne peut pas être visible sur les graphes obtenus par fragmentation dans la cellule de collision (figure 4d).

Lorsque nous augmentons la tension de cône, l'intensité de l'ion peptide diol $[Mdiol+zH]^{z+}$ diminue alors que celle de l'ion peptide aldéhyde $[Mald+zH]^{z+}$ augmente (figure 4c). Ceci s'explique par le fait que nous sommes en présence de deux formes isobares, l'ion aldéhyde $[Mald+zH]^{z+}$ et l'ion résultant de la perte d'une molécule d'eau du diol $[Mdiol+zH-H_2O]^{z+}$. Lorsque nous continuons d'augmenter la tension de cône, l'ion $[Mdiol+zH]^{z+}$ perd une deuxième molécule d'eau pour former l'ion $[Mdiol+zH-2H_2O]^{z+}$. Ce résultat est confirmé par fragmentation dans la cellule de collision des ions $[Mdiol+2H]^{2+}$ et $[Mdiol-H_2O+2H]^{2+}$ (figure 5).

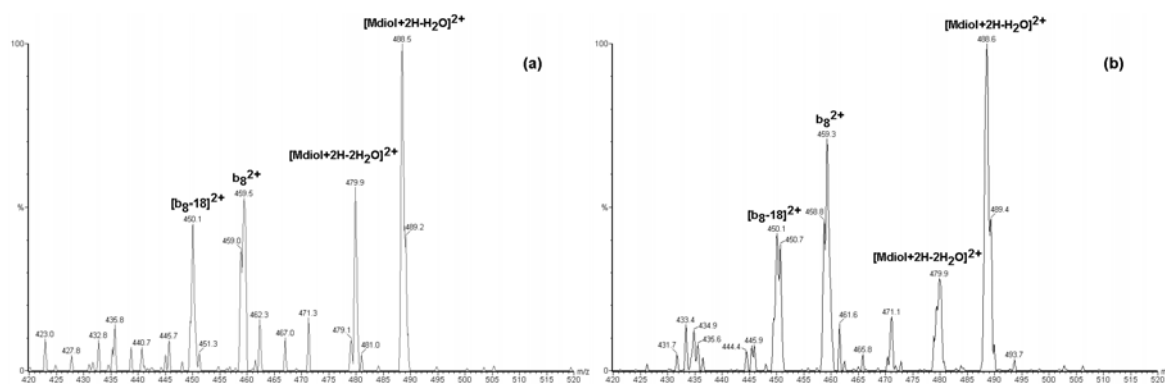


Figure 5 : Spectres MS/MS du **peptide aldéhyde 9-mer** non montrés dans la publication du paragraphe I.5. (a) Fragmentation de l'ion $[Mdiol+2H]^{2+}$ à m/z 498 ($V_c=27V$, $V_{cell}=20V$) et (b) fragmentation de l'ion $[Mdiol-H_2O+2H]^{2+}$ à m/z 489 ($V_c=46V$, $V_{cell}=20V$).

En comparant les deux processus de fragmentation qui suivent les pertes de méthanol et d'eau, nous obtenons des informations similaires sur ces pertes pour une longueur de peptide donnée et pour un état de charge donné, même si l'intensité relative des ions fragments est différente en fonction du processus de fragmentation.

De plus, nous avons clairement montré la présence concomitante dans la source, à de faibles valeurs de V_c , de l'ion peptide aldéhyde ainsi que de l'ion de sa forme hydratée. Cette particularité nous a conduit à focaliser la suite de ce travail sur la fragmentation induite par dissociation dans la source électrospray.

I.4. Etude de la fragmentation dans la source des peptides acétal et aldéhyde

Nous résumons ici les principales conclusions développées dans l'article: 'In-source fragmentation of peptide aldehydes and acetals: influence of peptide length and charge state' (paragraphe I.5 de ce chapitre).

L'équilibre existant en solution entre peptide aldéhyde et peptide diol est probablement 'gelé' dans le processus de désolvatation et nous en voyons le reflet en phase gazeuse sur nos spectres de masse réalisés par fragmentation dans la source. En reportant sur un graphe le rapport entre la somme des intensités des ions correspondant au peptide aldéhyde et la somme des intensités des ions correspondant au peptide diol en fonction de la tension appliquée sur le cône (figure 6 de la publication), il semble possible de comparer la stabilité de l'hydratation de plusieurs peptides aldéhyde. L'hydratation covalente de ces peptides étudiés semble stable à de faibles valeurs de tension de cône car les courbes commencent par un plateau. Cette observation sera exploitée dans le paragraphe II de ce chapitre.

En comparant la fragmentation d'ions à différents états de charge pour un même peptide, acétal ou aldéhyde, nous observons que la fragmentation s'effectue à de plus faibles valeurs de V_c pour les ions présentant de hauts états de charge par rapport aux ions de faibles états de charge (figures 2 et 4 de la publication). Cette observation étant faite sur chaque peptide (m est constante et z varie), nous constatons que la charge a un effet sur la fragmentation. Loo et coll. [1988] ont également observé, pour des protéines, que l'efficacité des processus de fragmentation est meilleure pour les hauts états de charge. Ces résultats impliquent que plus le rapport m/z est faible, plus le peptide se fragmente à de faibles valeurs de V_c .

Les processus de collision se révèlent être plus efficaces lorsque le rapport m/z de l'ion est faible (figure 5 de la publication, où z est constant). Ainsi, dans le cas des peptides acétal et aldéhyde, la masse du peptide a également un effet sur la fragmentation.

I.5. Publication

'In-source fragmentation of peptide aldehydes and acetals: influence of peptide length and charge state'

Corinne Buré, Wilfried Gobert, Dominique Lelièvre and Agnès Delmas

J. Mass Spectrom., 2001, 36, 1149-1155.

In-source fragmentation of peptide aldehydes and acetals: influence of peptide length and charge state

Corinne Buré,* Wilfried Gobert, Dominique Lelièvre, Agnès Delmas*

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301 affiliated to the University of Orléans and to INSERM, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France

Received 25 June 2001; Accepted 9 August 2001; Published online 5 October 2001

The use of in-source collision-induced dissociation (CID) was evaluated to generate structural information on peptide aldehydes, which represent an important class of compounds as inhibitors for serine and cysteine proteases and as key intermediates for protein engineering. By studying five peptide aldehydes of different lengths, and their peptide acetal counterparts, mass to charge (m/z) dependency of in-source fragmentation was established for peptides that differ only by their C-terminal functionalization. In-source fragmentation of peptide aldehydes and acetals leads to the same final ion, probably *via* a similar mechanism. Moreover, the gas-phase information obtained here reflects the equilibrium occurring in solution between the peptide aldehyde and its hydrated form, which was retained during the ionization process. The equilibrium constant was determined to be close to unity. Disturbance of this equilibrium should enable the stability of covalent hydration of a given series of aldehydes to be compared. Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: peptide acetal; peptide aldehyde; hydrated peptide aldehyde; equilibrium; in-source CID; electrospray ionization

INTRODUCTION

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is a soft ionization process. It has become of considerable importance for the study of biological molecules as it provides highly accurate mass and needs very few sample.^{1–4} Moreover, many studies have been devoted to the fragmentation of biological molecules by tandem mass spectrometry (MS/MS) in order to obtain structural information, such as amino acid sequences of peptides, especially for N-terminally blocked peptides,^{5,6} materials containing unnatural amino acids and post-translationally modified proteins.^{7–9} Several instruments have been used with success to sequence peptides such as triple quadrupole,^{10–12} ion trap,^{13–16} magnetic-sector,¹⁷ FT-MS,^{18,19} Q-TOF.

Sequence information can also be obtained in the ESI interface by low-energy collision-induced dissociation (CID) of electrosprayed ions without the use of an elaborate and expensive instrument.²⁰ This phenomenon has been variously termed in-source CID, up-front CID, cone-voltage CID or nozzle-skimmer dissociation,³ and will be referred to as in-source CID in this paper. It is based on the generation of fragment ions by increasing the energy of ions as they go through the ESI atmospheric pressure/vacuum interface. It has been established that the energy imparted to the

decomposing ions increases as the electric field in the sampling region is raised.²¹ In addition, the fragmentation pattern is also contingent on the geometry of the source, which differs depending on the manufacturer.²² It can be achieved by varying the potential applied to the capillary. This results in a flexible potential difference between the capillary and the counter electrode, implicating that collisions occur between the capillary and the skimmer.²³ Developments of an advanced skimmer system³ permit one to carry out in-source CID in the region between the sample cone and the skimmer by increasing the potential applied to the sample cone.^{20,21,24} Multi-collisions are clearly achieved in this region, as the pressure is about 1 Torr. In-source CID spectra were obtained with many types of compound, e.g. peptides,^{25,26} pesticides,²⁷ and drugs.²⁸ Relevant structural information for peptides is provided by in-source CID, similar to that achieved with MS/MS techniques.^{2,6,21,24,26,29,30}

To gain further insight into in-source fragmentation, the gas-phase stability of peptide acetals was studied and compared with their counterparts, the corresponding hydrated peptide aldehydes. In-source fragmentation of peptide aldehydes and peptide acetals was documented according to their length and charge state. We report here that fragmentation of peptide acetals and hydrated peptide aldehydes leads to the same final fragment ion. In addition, the establishment of breakdown graphs has enabled the equilibrium between a peptide aldehyde and its hydrated form to be analysed by ESI-MS.

*Correspondence to: C. Buré, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301 affiliated to the University of Orléans and to INSERM, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France. E-mail: bure@cnrs-orleans.fr, delmas@cnrs-orleans.fr

EXPERIMENTAL

Materials

Synthesis of the five models of peptide acetals was based on the solid-phase method using an automated peptide synthesizer (Applied Biosystems model 431 A), the Fmoc/*t*Bu chemistry and a phenylacetamidomethyl (PAM) resin. Aminolysis of the benzylic ester bond between the peptide and the resin with aminoacetaldehyde–dimethylacetal afforded the peptide acetals according to a previously described procedure.³¹ Purification was conducted by high-performance liquid chromatography (HPLC). A brief treatment of peptide acetals with 80% TFA yielded their corresponding peptide aldehydes.

Water was purified in-house using a Milli-Q-System (Millipore water). Acetonitrile was obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and formic acid from Sigma Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France).

Mass Spectrometry

Analyses were performed on a triple quadrupole mass spectrometer (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) equipped with a nebulizer-assisted electrospray source. The high-flow nebulizer was operated in standard mode with N₂ as both nebulizing (20 l h⁻¹) and drying (250 l h⁻¹) gas. A voltage difference of 3 kV was applied between the capillary and the counter electrode. In-source CID mass spectra were obtained by increasing the sample cone voltage from 10 to 80 V in 5 V increments. MS/MS analyses of the 9-mer peptide aldehyde were achieved at a collision energy of 20 eV, and argon collision gas was maintained at a pressure of 2.2×10^{-3} Torr within the RF-only hexapole collision cell. The ion source was kept at 80 °C. Instrument control and data analysis were accomplished using Masslynx application software, version 3.4, from Micromass (Manchester, UK). Calibration of the mass spectrometer was performed using myoglobin.

MS experiments were achieved on peptide samples collected during the analytical HPLC separation and 3 µl of each peptide was injected into a Rheodyne 7125 injection valve with a 10 µl sample loop. The compound was eluted into the mass spectrometer using 70/30 acetonitrile/water as mobile phase delivered by an isocratic LC-10AD pump (Shimadzu, Les Ulis, France) at a 10 µl min⁻¹ flow rate. ESI mass spectra were obtained in positive ion mode.

RESULTS AND DISCUSSION

Peptide aldehydes have become the subject of intensive research³² since the discovery of their inhibition properties towards serine and cysteine proteases³³ and the spread of protein engineering.³⁴ The inhibitory properties of peptide aldehydes result from the tetrahedral hydrated C-terminus aldehyde function that mimics the transition state of the substrate during hydrolysis. In the field of protein engineering, the use of the aldehyde group for site-specific and backbone modification of peptides and proteins has been of growing importance since the appearance of chemo-selective ligation in peptide chemistry. This methodology exploits the unique reactivity of aldehydes for convergent synthesis of macromolecules without the use of protecting groups.³⁴ As part of our ongoing work on tri-branched peptide immunogens,³⁵ we have developed a new strategy to synthesize a peptide whose C-terminal residue is a glycinal masked as an acetal.³¹ Peptide aldehyde is readily obtained from its peptide acetal counterpart by a brief TFA treatment. These peptides prompted us to compare the stability in the gas phase of two series of peptides that differ only by the functionalization of their C-terminus. The peptide acetals and aldehydes used in this study are of increasing length, i.e. 9-mer, 14-mer, 19-mer, 27-mer and 33-mer (Table 1). The longest peptides yield up to eight positive charges. We report

Table 1. Primary sequence and mass of the peptide acetals and aldehydes used in this study

			Charge state ^a	Mass (Da)	
Peptide		Sequence		calculated	experimental
9-mer	acetal	YRLEGVKA–NH–CH ₂ –CH(OCH ₃) ₂	1–2	1022.2	1021.1
	aldehyde	CHO	1–2	976.1	975.7
	hydrated aldehyde	CH(OH) ₂	1–2	994.1	993.7
14-mer	acetal	YGIVHRLEGVKA–NH–CH ₂ –CH(OCH ₃) ₂	2–3	1527.8	1527.1
	aldehyde	CHO	2–3	1481.7	1481.3
	hydrated aldehyde	CH(OH) ₂	2–3	1499.7	1499.5
19-mer	acetal	YLSEIKGVIVHRLEGVKA–NH–CH ₂ –CH(OCH ₃) ₂	2–4	2098.5	2098.0
	aldehyde	CHO	2–4	2052.4	2052.1
	hydrated aldehyde	CH(OH) ₂	2–4	2070.4	2070.0
27-mer	acetal	YIVHRLEGLVSEIKGVIVHRLEGVKA–NH–CH ₂ –CH(OCH ₃) ₂	2–6	3002.6	3002.0
	aldehyde	CHO	2–5	2956.5	2956.4
	hydrated aldehyde	CH(OH) ₂	2–5	2974.5	2974.1
33-mer	acetal	LSEIKGVIVHRLEGLVSEIKGVIVHRLEGVKA–NH–CH ₂ –CH(OCH ₃) ₂	3–8	3566.6	3565.9
	aldehyde	CHO	3–7	3520.2	3519.5
	hydrated aldehyde	CH(OH) ₂	3–7	3538.2	3537.5

^a Corresponding to the minimum and the maximum charge state observed on mass spectra.

here the use of CID data obtained by cone-voltage variation to study the gas-phase stability of these series of peptides.

In-source fragmentation of peptide acetals

The 33-mer peptide acetal (experimental mass: 3565.9 Da) was chosen as a representative example of the peptide acetals studied. Figure 1 presents its mass spectra recorded at cone voltages V_c of 15, 45 and 60 V. With increasing V_c , the more-highly charged ion disappeared (Fig. 1a, peak A6), whereas the less-highly charged ion increased (Fig. 1c, peak A3). This is accompanied by a shift in mass distribution towards the high m/z values, which is due to the declustering

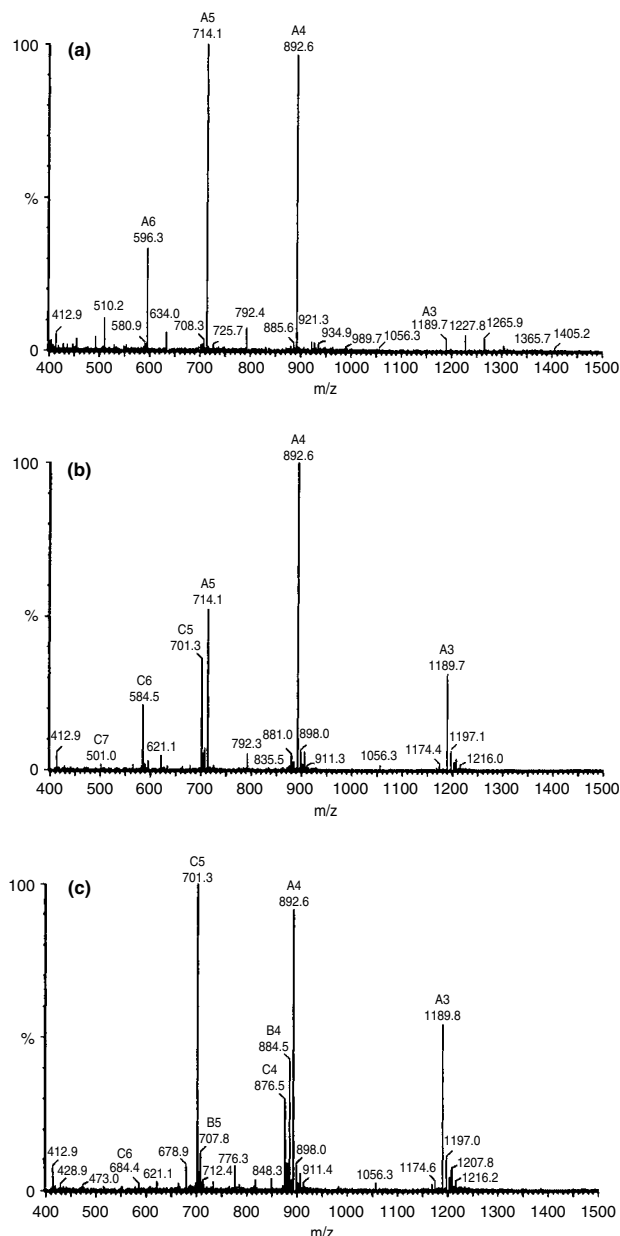


Figure 1. ESI mass spectra of the 33-mer peptide acetal recorded at $V_c = 15$ V (a), $V_c = 45$ V (b) and $V_c = 60$ V (c). Az, Bz and Cz correspond to $[M+zH]^{z+}$ (calculated mass: 3566.6 Da; measured mass: 3565.9 Da), $[M+zH - CH_3OH]^{z+}$ (calculated mass: 3534.3 Da; measured mass: 3534.9 Da) and $[M+zH - 2CH_3OH]^{z+}$ (calculated mass: 3502.3 Da; measured mass: 3501.5 Da) respectively, with z being the charge state.

phenomenon.²⁰ In addition, it was also observed that the increase in cone voltage induces one and two losses of CH_3OH , which is particularly clear on the quadruply charged ion recorded at a cone voltage of 60 V (Fig. 1c). The mass spectrum of the 33-mer peptide acetal at high cone voltage is dominated by the presence of ions resulting from the loss of one or two CH_3OH molecules. No fragment ions, such as b or y ions,³⁶ resulting from the backbone fragmentation induced under low-energy in-source CID conditions^{23,24} were observed. However, the $b5$ – $b7$, $a6$ and $c6$ ions were observed only in the mass spectra of the 9-mer peptide acetal beyond 45 V.

To analyse the fragmentation of peptide acetals further, the in-source CID data were represented as breakdown graphs, where the percentage of total ion current (TIC) was expressed as a function of cone voltage. Figure 2 compares the breakdown graphs drawn for the 33-mer peptide acetal at different charge states (from $z = 7$ to $z = 4$). The more-highly charged ions (Fig. 2a) fragmented at a lower cone voltage than the less-highly charged ions (Fig. 2d). These charge effects are attributed to high-energy collisions of multiply charged solvated molecular ions in the region between the sample cone and the skimmer. One explanation for the rapid fragmentation of more-highly charged ions is based on the efficiency of CID processes, which is better for a greater charge state, since collision energy is proportional to the number of charge at a given m/z ratio.²⁰ This entails that collision processes desolvate ions more efficiently at high cone voltage,²⁰ leading to the percentage of total ion current being greater for low-charged ions (Fig. 2d) than for high-charged ions (Fig. 2a).

The breakdown graphs in Fig. 2 also reveal that, when V_c increases, the second loss of methanol is the most important fragmentation, whatever the charge state. The multiply protonated ion $[M+zH]^{z+}$, corresponding to a molecular mass of 3566.6 Da, should fragment into the ion $[M+zH - 2CH_3OH]^{z+}$, corresponding to a molecular mass of 3501.5 Da. The ion $[M+zH - CH_3OH]^{z+}$ must be unstable. The latter ion is only observed for the quadruply charged ion, which requires a higher energy to be fragmented.

In-source fragmentation of peptide aldehydes

Figure 3 shows the mass spectra of the 33-mer peptide aldehyde (experimental mass: 3519.5 Da), a representative example among the five peptide aldehydes studied, recorded at the cone voltages of 15, 40 and 60 V. At low cone voltage, the hydrated form of the aldehyde ion $[Mha + zH]^{z+}$ is observed (Fig. 3a). At high cone voltage (Fig. 3c), the appearance of peaks C corresponding to a molecular mass of 3501.9 Da, i.e. with a Δm of -18 Da compared with the peptide aldehyde, means that the peptide aldehyde has lost one H_2O . No b and y ions were observed, except for the 9-mer beyond 50 V.

A hydrated peptide aldehyde, depending on its tetrahedral state, could be considered as the lower homologue of its exactly analogous peptide acetal counterpart (see Table 1). As for peptide acetals, breakdown graphs of the 33-mer peptide aldehyde were established at different charge states (Fig. 4).

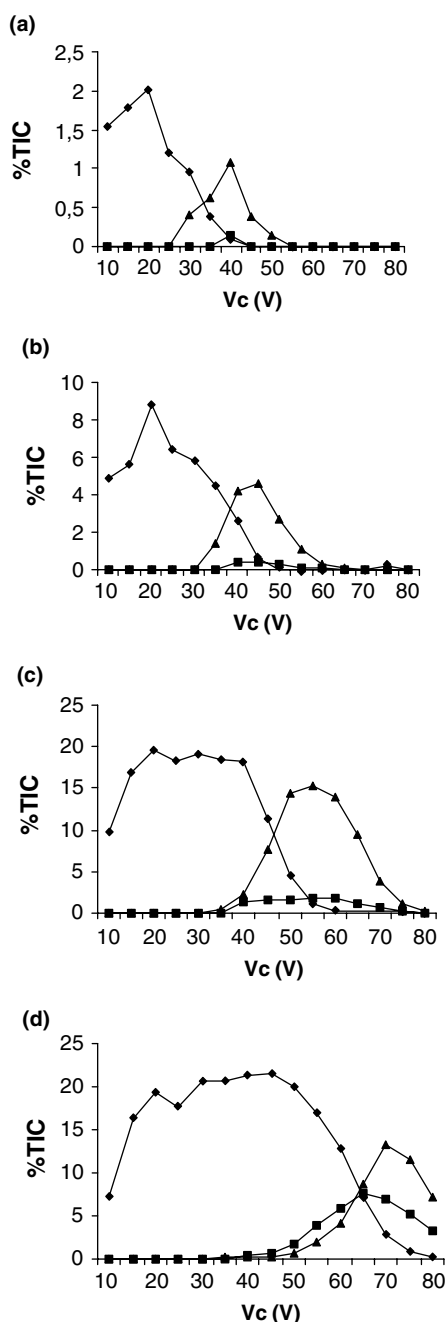


Figure 2. Breakdown graphs of the 33-mer peptide acetal at different charge states: $z = 7$ (a), $z = 6$ (b), $z = 5$ (c) and $z = 4$ (d); $\blacklozenge$: $[M + zH]^{z+}$; $\blacksquare$: $[M + zH - CH_3OH]^{z+}$; $\blacktriangle$: $[M + zH - 2CH_3OH]^{z+}$.

The breakdown curve of the aldehyde ion is seen to be superimposed on the curve of the hydrated aldehyde ion for the region of low cone voltages ($V_c \leq 20$ V). Beyond a V_c value that depends on the charge state, the two curves part, and the intensity of the hydrated aldehyde ion decreases, whereas the intensity of the aldehyde ion increases. The fragment ion $[Mha + zH - 2H_2O]^{z+}$ appeared at higher cone voltages. We can hypothesize that this fragment comes from the hydrated aldehyde ion, which fragments to give the fragment ions $[Mha + zH - H_2O]^{z+}$ and $[Mha + zH - 2H_2O]^{z+}$. That would provide a less stable ion $[Mha + zH - H_2O]^{z+}$, isobaric with

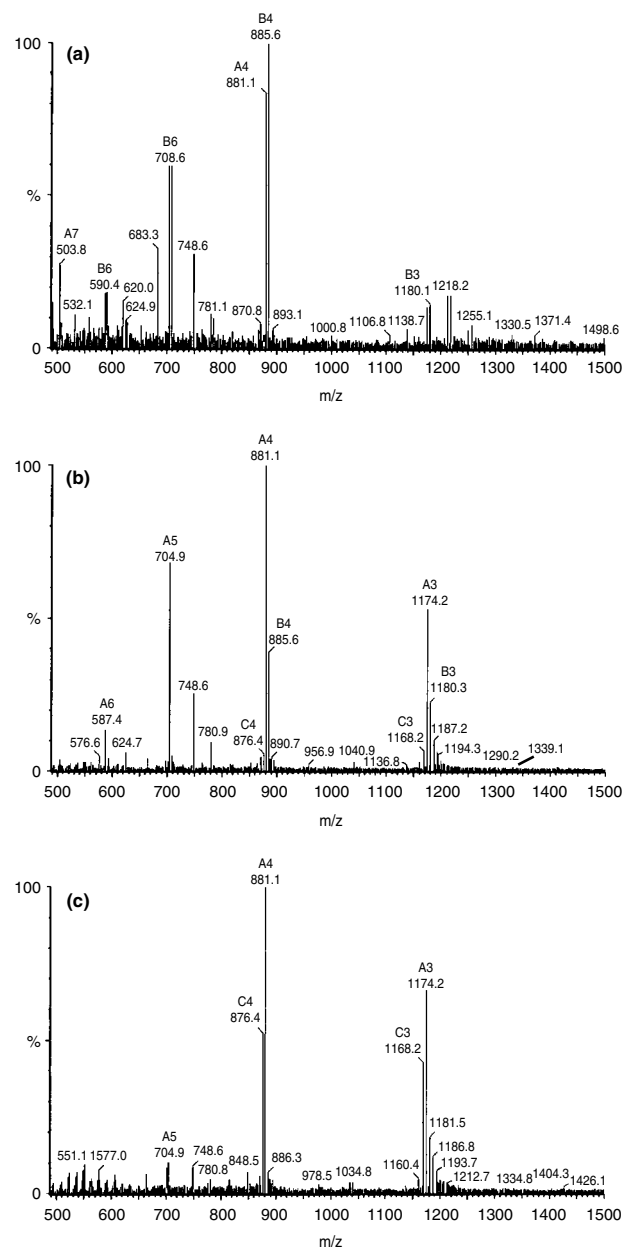


Figure 3. ESI mass spectra of the 33-mer peptide aldehyde recorded at $V_c = 15$ V (a), $V_c = 45$ V (b) and $V_c = 60$ V (c). Az, Bz and Cz correspond to $[M + zH]^{z+}$ (calculated mass: 3520.2 Da; measured mass: 3519.5 Da), $[M + zH + H_2O]^{z+}$ or $[Mha + zH]^{z+}$ (calculated mass: 3538.2 Da; measured mass: 3537.8 Da) and $[Mha + zH - 2H_2O]^{z+}$ (calculated mass: 3502.2 Da; measured mass: 3501.9 Da) respectively, with z being the charge state.

the aldehyde ion $[M + zH]^{z+}$, whose curves could be confused. To clarify the origin of the $[Mha + zH - 2H_2O]^{z+}$ ion isobaric with the $[M + zH - H_2O]^{z+}$ ion, CID was performed in the collision cell on the mass-selected $[Mha + 2H]^{2+}$ and $[M + 2H]^{2+}$ ions corresponding to the 9-mer peptide aldehyde (data not shown). Mass spectra were recorded at a collision energy of 20 eV and at cone voltages of 27 V and 46 V for the $[M + 2H]^{2+}$ and $[Mha + 2H]^{2+}$ respectively. The MS/MS ion spectrum of the 9-mer $[Mha + zH]^{z+}$ revealed two product ions with a Δm of -18 and -36 Da compared

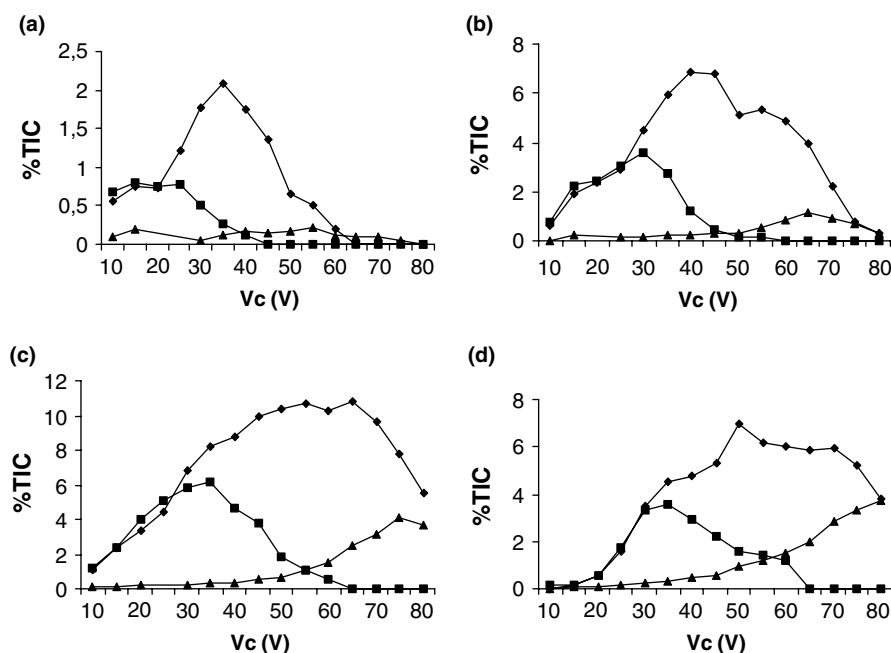


Figure 4. Breakdown graphs of the 33-mer peptide aldehyde at different charge states: $z = 6$ (a), $z = 5$ (b), $z = 4$ (c) and $z = 3$ (d); $\blacklozenge$: $[M + zH]^{z+}$; $\blacksquare$: $[M + zH + H_2O]^{z+}$ or $[Mha + zH]^{z+}$; $\blacktriangle$: $[Mha + zH - 2H_2O]^{z+}$.

with the parent ion. The MS/MS ion spectrum of the 9-mer peptide aldehyde $[M + zH]^{z+}$ revealed one product ion with a Δm of -18 Da compared with the parent aldehyde ion. This confirms that the fragmentation of the $[Mha + zH]^{z+}$ initially leads to a first loss of H_2O to form an ion isobaric with $[M + zH]^{z+}$, which subsequently loses a second H_2O . MS/MS data also confirm that $[M + zH]^{z+}$ fragments by loss of H_2O .

The most striking observation of the in-source CID of peptide aldehydes is the superposition of the aldehyde and hydrated aldehyde ion curves (Fig. 4). One explanation could be that the gas-phase information obtained here could be the reflection of the equilibrium that occurs in solution between the peptide aldehyde and its hydrated form. This means that the mixture of ions retains the memory of the equilibrium composition in solution, as suggested by Sindona and co-workers.³⁷ This group characterized the hemiacetal–aldehyde equilibrium of the aglycones of oleuropein and ligstroside by ESI-MS, which enabled them to determine the structure of each aglycone.³⁷ Here, we report on the in-source fragmentation of the same series of peptide aldehydes with different lengths. In Fig. 4, the V_c values where the breakdown curves part are attributed to the disturbance of the equilibrium between the aldehyde and its hydrated form. It will be referred to as V_{dc} hereafter. For a given peptide length, this V_{dc} value is higher for a less-highly charged ion (Fig. 4a) than for a more-highly charged ion (Fig. 4d). This is consistent with the fact that multiply charged ions fragment more easily.^{20,29} We also evaluated the influence of the mass on the in-source fragmentation of peptide aldehydes. For this purpose, peptide aldehydes of different chain lengths were considered and analysed for the same charge state. To illustrate this point, Fig. 5 shows the V_{dc} value corresponding to the 9-mer, 14-mer, 19-mer and 27-mer peptide aldehydes for a charge state of two. The cone

voltage has to be raised to disturb the equilibrium when the m/z ratio is high. This indicates that the energy needed to disturb the equilibrium depends on the m/z ratio, and is in good agreement with the fact that the in-source CID process is more efficient when the m/z ratio of the peptide ion is low.

ESI is a versatile ionization as it allows the evaluation of very labile species, such as non-covalent association of macromolecules formed in solution.³⁸ The in-solution equilibrium between an aldehyde and its hydrated form is related to this phenomenon. The stability of the equilibrium between the peptide aldehyde and its hydrated form was further investigated for the five peptide aldehydes as a function of the cone voltage. For this purpose, the peak heights of all the multiply charged ions were summed for the peptide aldehydes $[M + zH]^{z+}$ and for their hydrated forms $[Mha + zH]^{z+}$, and the $[M + zH]^{z+}/[Mha + zH]^{z+}$ ratio was calculated. It has to be noted that this approach is valid

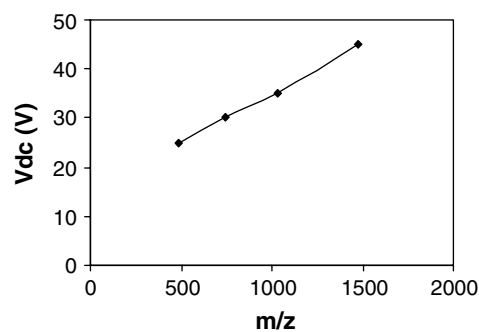


Figure 5. Disturbance of the equilibrium between peptide aldehydes and their hydrated forms (9-mer, 14-mer, 19-mer and 27-mer) as a function of m/z ratio and at a constant charge state $z = 2$ ($\blacklozenge$). The plotted disturbance cone voltage value V_{dc} was determined to be the first value at which the two forms parted.

if the two species give rise to the same charge states on the mass spectra to yield a similar response in ESI-MS analysis. This point has been underlined by Van Dorsselaer and co-workers³⁹ for the study in the gas phase of non-covalent interactions between the aldose reductase and its inhibitors. Moreover, the two species have to present a similar mass to ensure that the relative ion abundances are not affected by any mass effect. The two species of interest in our study, i.e. a peptide aldehyde and its hydrated form, which differ only by 18 Da, exhibit the same charge states, as shown in Table 1. This indicates strongly that the two species ionized with equal efficiencies. Therefore, the $[M + zH]^{z+}/[Mha + zH]^{z+}$ ratio was expressed as a function of the cone voltage ranging from 10 to 40 V, i.e. voltages corresponding to a negligible presence in mass spectra of the ion $[Mha + zH - 2H_2O]^{z+}$ and to the absence of backbone fragmentation (Fig. 6). Whatever the chain length, the equilibrium between an aldehyde and its hydrated form is stable until the cone voltage reaches a value of 20 V, with a very close intensity value for peptide aldehyde ions and their corresponding hydrated forms. The equilibrium constant for the peptide–glycinals studied in this work is therefore close to unity at low cone voltages. We can propose that the in-source CID methodology described here could be a complementary method to NMR⁴⁰ to estimate the equilibrium constant for covalent hydration of a peptide aldehyde. This equilibrium constant could be of interest for aldehydes designed as inhibitors of serine and cysteine proteases, as it is believed that P' hydrogen-bonding interactions, between active site residues and the hydrated aldehyde hydroxyl group, are of crucial importance for inhibitory activity.⁴¹

It should also be noted on Fig. 6 that the stability of the equilibrium is altered beyond 20 V. The chain length could influence the stability of the equilibrium *via* an alteration of the hydration of the aldehyde. The hydrated form could be stabilized by intermolecular or intramolecular hydrogen bonding with the peptide backbone. On the other hand,

we cannot rule out an effect of the m/z dependency on the equilibrium disturbance. Although the longer the peptide is the more charged it is (see Table 1: the maximum of charge varies from two to eight according to the increase in length), the m/z ratio increases slightly with lengthening of the peptide from 9 to 33 amino acids.

Comparison between peptide acetals and peptide aldehydes

The ions $[M + zH - 2CH_3OH]^{z+}$ issued from the fragmentation of peptide acetals after two losses of CH_3OH correspond to the same molecular mass as the ions $[Mha + zH - 2H_2O]^{z+}$ issued from the fragmentation of hydrated peptide aldehydes after two losses of H_2O (Figs 1 and 3), i.e. a calculated mass of 3502.3 Da. This suggests that the fragmentation of peptide acetal and aldehyde leads to the same final ion. Taking into account the fact that the stability of peptides under CID conditions was found to be related to the nature and the number of amino acid residues present in the peptide chain,⁴² breakdown graphs of exactly analogous peptides bearing either a C-terminal acetal or aldehyde were considered with regard to the final ion. As an example, the breakdown graphs for the 27-mer peptide acetal and aldehyde are depicted for a charge state of five in Fig. 7. The curve of the acetal ion exhibits a shape comparable to that of the hydrated aldehyde ion. This is consistent with a similar mechanism of fragmentation for the peptide acetal and hydrated aldehyde ions leading to the same final ion.

CONCLUSION

The aim of this work was to compare the in-source CID of two peptide counterparts that differ only by the functionalization of the C-terminal residue, i.e. a glycinal and a glycinal–acetal. By studying two series of five peptides of increasing length and charge state, we showed that the in-source fragmentation of aldehyde and acetal predominantly leads to the loss of

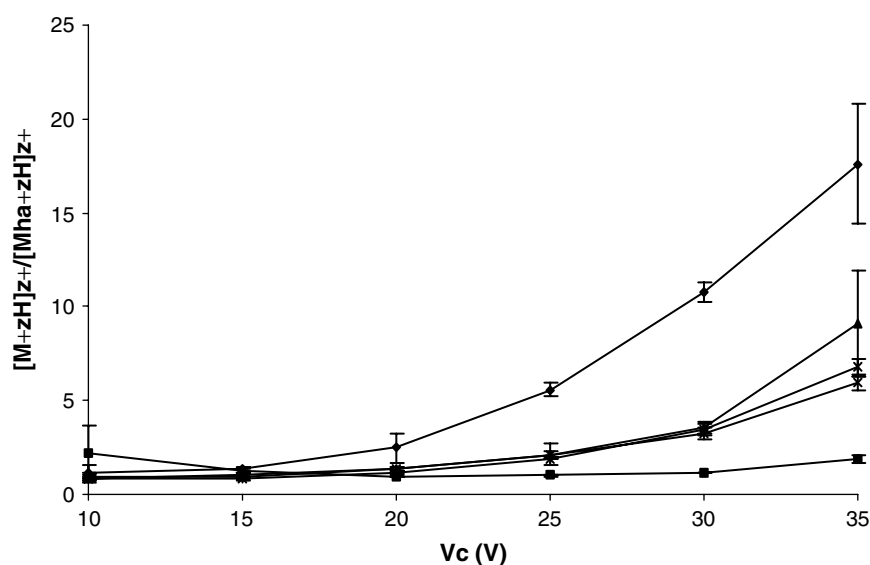


Figure 6. Stability of the equilibrium between a peptide aldehyde and its hydrated form for different peptide lengths. ◆: 9-mer; ■: 14-mer; ▲: 19-mer; ×: 27-mer; *: 33-mer. Data points represent the average values of three independent measurements and error bars represent the standard deviation.

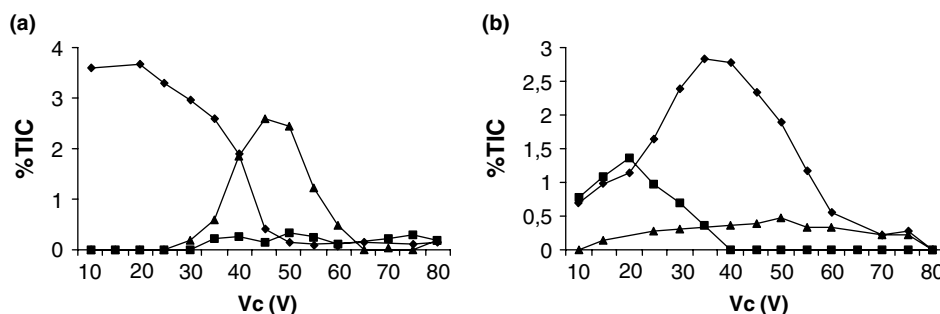


Figure 7. Breakdown graphs of the 27-mer peptide acetal (a) and peptide aldehyde (b) at a charge state of $z = 5$. (a) $\blacklozenge$: $[M + 5H]^{5+}$; $\blacksquare$: $[M + 5H - CH_3OH]^{5+}$; $\blacktriangle$: $[M + 5H - 2CH_3OH]^{5+}$. (b) $\blacklozenge$: $[M + 5H]^{5+}$; $\blacksquare$: $[M + 5H + H_2O]^{5+}$ or $[Mha + 5H]^{5+}$; $\blacktriangle$: $[Mha + 5H - 2H_2O]^{5+}$.

one or two molecules of H_2O and CH_3OH respectively. Exactly analogous peptide acetal and hydrated peptide aldehyde gave the same final ion, going through a less stable intermediate. The breakdown graphs obtained in this study allow us to propose that the fragmentation mechanism of ions coming from acetal and hydrated peptide aldehydes is probably similar. These in-source CID processes were revealed to be more efficient when the m/z ratio of the peptide ion is low. Finally, the equilibrium between a peptide aldehyde and its hydrated form, which takes place in solution, still probably occurs in the spray droplets, is virtually frozen by desolvation, and is reflected in the gas phase. The disturbance of this equilibrium depends on the m/z ratio. The studies of the stability indicate that the equilibrium constant is close to unity for low cone voltages, and that beyond a threshold value the equilibrium is disturbed. Using this in-source CID methodology, it would be possible to compare the stability of the covalent hydration for a given series of aldehydes.

Acknowledgements

The authors thank Professor Catherine Lange for a careful reading of the manuscript.

REFERENCES

- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Whitehouse CM. *Mass Spectrom. Rev.* 1990; **9**: 37.
- Gaskell SJ. *J. Mass Spectrom.* 1997; **32**: 677.
- Cole RB (ed.). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals Instrumentation and Applications*. Wiley: New York, 1997.
- Chapman JR (ed.). *Protein and Peptide Analysis by Mass Spectrometry*. Humana Press: Totowa, 1996.
- Thulin CD, Walsh KA. *Biochemistry* 1995; **34**: 8687.
- Neubert TA, Johnson RS, Hurley JB, Walsh KA. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 18274.
- Rossomando AJ, Wu J, Michel H, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; **89**: 5779.
- Huddleston MJ, Annan RS, Bean MF, Carr SA. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993; **4**: 710.
- Carr SA, Huddleston MJ, Bean MF. *Protein Sci.* 1993; **2**: 183.
- Henry KD, Williams ER, Wang BH, McLafferty FH, Shabanowitz J, Hunt DF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989; **86**: 9075.
- Lee ED, Henion JD, Covey TR. *J. Microcolumn Sep.* 1989; **1**: 14.
- Barinaga CJ, Edmonds CG, Udseth HR, Smith RD. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1989; **3**: 160.
- Morand KL, Cox KA, Cooks RG. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992; **6**: 520.
- McLuckey SA, Glish GL, Asano KG. *Anal. Chim. Acta* 1989; **22**: 25.
- Doroshenko VM, Cotter RJ. *Anal. Chem.* 1996; **68**: 463.
- Louris JN, Cooks RG, Syka JEP, Kelley PE, Stafford GC, Todd JF. *Anal. Chem.* 1987; **59**: 1677.
- Morris HR, Dell A, Panico M, Thomas-Oates J, McDowell R, Chatterjee A. In *Mass Spectrometry of Biological Materials*, McEwen CN, Larsen BS (eds). Marcel Dekker: New York, 1990; 151.
- Morris HR, Paxton T, Dell A, Langhorne J, Berg M, Bordoli RS, Hoyes J, Bateman RH. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996; **10**: 889.
- Gygi SP, Aebersold R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000; **4**: 489.
- Loo JA, Udseth HR, Smith RD. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988; **2**: 207.
- Collette C, De Pauw E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998; **12**: 165.
- Collette C, Drahos L, De Pauw E, Vékey K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998; **12**: 1673.
- Meng CK, McEwen CN, Larsen BS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1990; **4**: 151.
- Harrison AG. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999; **13**: 1663.
- Harrison AG, Csizmadia IG, Tang TH. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000; **11**: 427.
- Katta V, Chowdhury SK, Chait BT. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 174.
- Voyksner RD, Pack T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1991; **5**: 263.
- Weinmann W, Wiedemann A, Eppinger B, Renz M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999; **10**: 1028.
- Van Dongen WD, Van Wijk JIT, Green BN, Heerma W, Haverkamp J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999; **13**: 1712.
- Sadagopan N, Watson JT. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000; **11**: 107.
- Lelièvre D, Chabane H, Delmas A. *Tetrahedron Lett.* 1998; **39**: 9675.
- Melnik O, Fehrentz JA, Martinez J, Gras-Masse H. *Biopolymers* 2000; **55**: 165.
- Thompson RC. *Methods Enzymol.* 1977; **46**: 220.
- Walker MA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997; **36**: 1069.
- Buré C, Lelièvre D, Delmas A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000; **14**: 2158.
- Biemann K. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1988; **16**: 99.
- De Nino A, Mazzotti F, Perri E, Procopio A, Raffaelli A, Sindona G. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 461.
- Loo JA. *Int. J. Mass Spectrom.* 2000; **200**: 175.
- Rogniaux H, Van Dorsselaer A, Barth P, Biellman JF, Barbantion J, van Zandt M, Chevrier B, Howard E, Mitschler A, Potier N, Urzhumtseva L, Moras D, Podjarny A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999; **10**: 635.
- Andersson L, Isley TC, Wolfenden R. *Biochemistry* 1982; **21**: 4177.
- Lynas JF, Hawthorne SJ, Walker B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000; **10**: 1771.
- Dongré AR, Jones JL, Somogyi A, Wysocki VH. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; **118**: 8365.

I.6. Mécanisme de fragmentation des peptides acétal et aldéhyde

Les peptides acétal et [ald↔diol] étudiés dans ce chapitre ne diffèrent que par la fonction en C-terminal, un glycin-al-acétal et un glycin-al. La fragmentation principale de ces peptides acétal et diol, perte d'une et de deux molécules de méthanol ou d'eau, conduit au même ion final et nous amène à penser que ces peptides se fragmentent selon un mécanisme similaire.

Par CID dans la source, nous avons étudié ce mécanisme de fragmentation sur la base des hypothèses présentées sur le schéma 1.

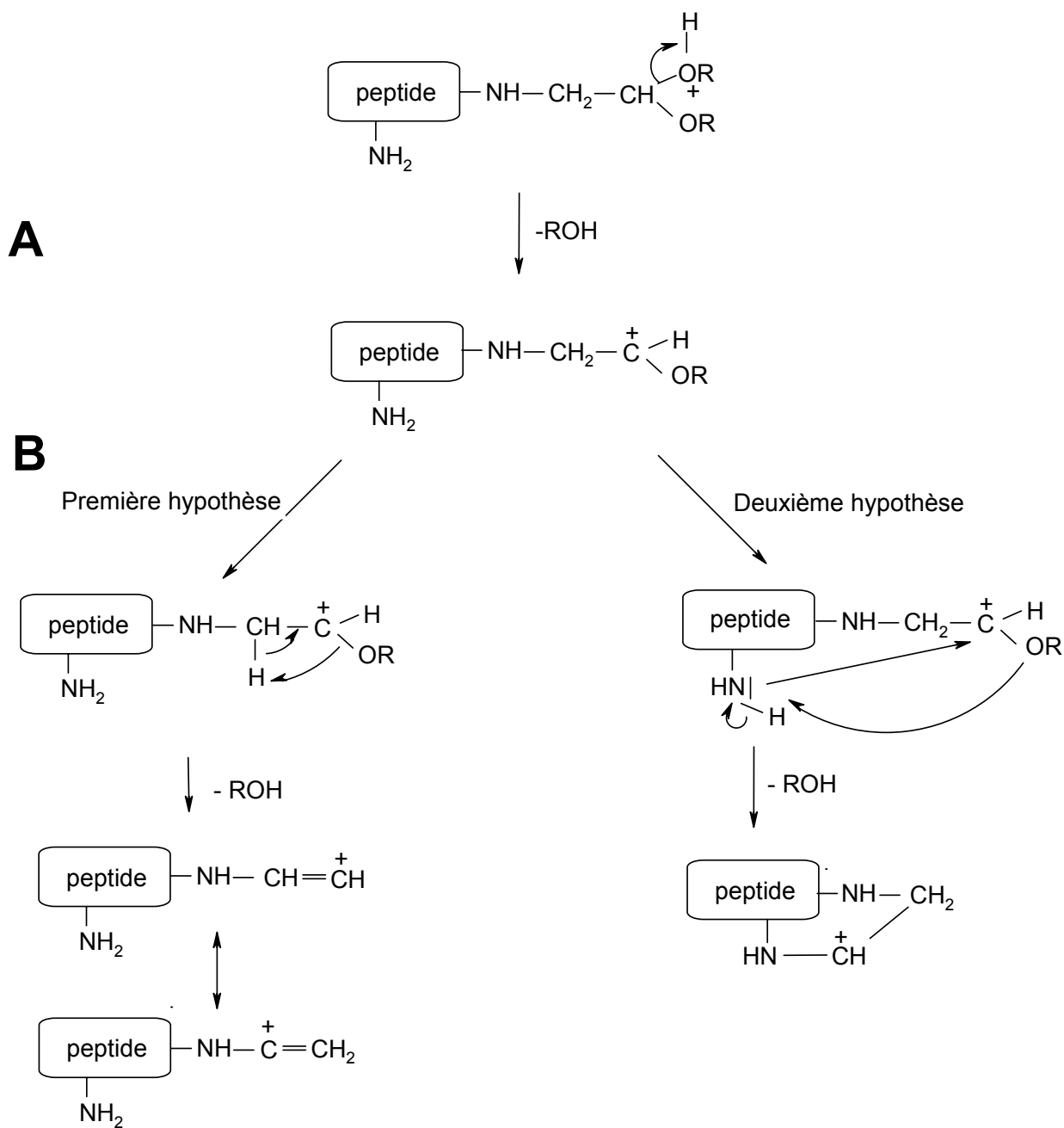


Schéma 1 : Hypothèses de mécanismes de fragmentation.

Lors du processus d'ionisation, les protons sont localisés sur les sites basiques du peptide. D'après l'hypothèse du 'proton mobile' [Dongré et coll. 1996], un proton pourrait migrer vers un site de plus faible affinité protonique, le côté C-terminal, induisant ainsi une première perte de méthanol ou d'eau par 'fragmentation dirigée par la charge' (partie A du schéma 1).

Concernant la deuxième perte de méthanol ou d'eau, deux hypothèses ont été étudiées (partie B du schéma 1): la première hypothèse propose un réarrangement [2+2] entre le carbone fonctionnel, i.e. le carbone en C-terminal qui est lié aux méthoxy et au diol, et un hydrogène sur le carbone adjacent; la deuxième hypothèse propose une attaque nucléophile par l'azote d'une amine sur le carbone fonctionnel.

Afin de vérifier ces hypothèses, des peptides modèles ont été synthétisés. Les principales conclusions de cette étude montrent que l'ion final est cyclique et provient d'une attaque nucléophile par l'azote d'une amine (N-terminal ou ϵ -NH₂ d'une lysine) sur le carbone fonctionnel (hypothèse 2).

Les arguments, ainsi que les résultats que nous avons obtenus, sont développés dans l'article: 'Fragmentation study of peptide acetals and aldehydes using in-source collision-induced dissociation' (joint page suivante).

'Fragmentation study of peptide acetals and aldehydes using in-source collision-induced dissociation'

Corinne Buré, Guy Le Falher, Catherine Lange and Agnès Delmas

J. Mass Spectrom., 2004, 39, 817-823.

Fragmentation study of peptide acetals and aldehydes using in-source collision-induced dissociation

Corinne Buré,^{1*} Guy Le Falher,¹ Catherine Lange² and Agnès Delmas^{1*}

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301[†], rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France

² Spectrométrie de Masse Bio-organique, CNRS UMR 6014, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan Cedex, France

Received 4 January 2004; Accepted 28 April 2004

The fragmentation of peptide acetals and peptide diols, corresponding to the hydrated form of the peptide aldehyde, is dominated by the successive losses of two molecules of MeOH and water, respectively. Using model peptides, the fragmentation mechanism, with respect to the loss of methanol and water, was elucidated. The first loss was certainly charge-directed whereas the second probably occurred via the nucleophilic attack of the nitrogen of an amine on the C-terminal carbon leading to a cyclic ion. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: peptide acetal; hydrated peptide aldehyde; in-source collision-induced dissociation; fragmentation mechanism

INTRODUCTION

Peptide aldehydes are important components as inhibitors towards serine and cysteine proteases¹ and as key intermediates for protein engineering.² Their inhibitory properties result from the hydrated C-terminal aldehyde function that mimics the transition state of the substrate during hydrolysis. In the field of protein engineering, the use of the aldehyde group for site-specific and backbone modification of peptides and proteins has been of growing importance since the appearance of chemoselective ligation in peptide chemistry,² i.e. the condensation of unprotected peptides in aqueous medium. Under these conditions, the peptide aldehyde is in equilibrium with its tetrahedral hydrated form, the peptide diol.

Using in-source collision-induced dissociation (CID), we have recently described the fragmentation of peptide diols and peptide acetals.³ In-source CID is based on the generation of fragment ions by increasing the energy of ions as they go through the ESI atmospheric pressure/vacuum interface.⁴ Developments of advanced skimmer systems⁵ enable in-source CID to be carried out in the region between the sample cone and the skimmer by increasing the potential applied to the sample cone.^{6–8} This potential will be referred to as the cone voltage. Using this methodology, the equilibrium between the aldehyde and its hydrated form, which occurs in solution, was detected in the gas phase. This equilibrium probably occurred in the spray droplets where the H₂O molecules are still present, and was virtually frozen by desolvation as proposed by De Nino *et al.*⁹ The image of the equilibrium is detected by the mass spectrometer but

only when the voltage applied to the cone is low, conditions under which the hydrated form of the aldehyde is stable.³ Increasing the cone voltage leads to an increase in the energy of the ions, which results in the fragmentation of the diol form of the aldehyde. The major fragmentation was the successive losses of two molecules of H₂O. Fragmentation of the same peptidic sequence, functionalized at the C-terminus with a tetrahedral acetal instead of a diol, led to the same final ion but through the loss of two molecules of MeOH.³ In the present study, we found that tandem mass spectrometric (MS/MS) fragmentation gave similar results to in-source CID.

To expand our knowledge on the fragmentation of peptide acetals and peptide diols, we focused this work on the losses of MeOH and H₂O. Two fragmentation mechanisms for these successive losses were explored using model peptides designed and synthesized for this purpose (Table 1).

EXPERIMENTAL

Materials

Organic solvents were obtained from SDS (Peypin, France), with dichloromethane (DCM), *N*-methylpyrrolidone (NMP) and diethyl ether being of synthesis grade and acetonitrile (ACN) and MeOH of HPLC grade. *N,N*-Dimethylformamide (DMF) from Carlo Erba (Val de Reuil, France) was kept stored on 4 Å sieves. Trifluoroacetic acid (TFA), formic acid and piperidine were obtained from SDS and Sigma Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France). Water was purified on a Milli-Q reagent system (Millipore). Wang resin and PEGA resin were purchased from Novabiochem (Meudon, France). Fmoc-protected amino acids were obtained from Senn Chemicals (Gentilly, France) or Novabiochem (Meudon, France). Boc-Ser(*t*Bu) was supplied

*Correspondence to: Corinne Buré and Agnès Delmas, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France. E-mail: bure@cnrs-orleans.fr and delmas@cnrs-orleans.fr

[†]Affiliated with the University of Orléans and INSERM.

Table 1. Model peptide aldehydes and acetals used in this study

Peptide	Sequence	Experimental mass (Da)	Calculated mass (Da)
27-mer acetal	H-YIVHRLEGVLSEIKGVIVHRLEGVKA-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂	3002.0	3002.6
27-mer diol	H-YIVHRLEGVLSEIKGVIVHRLEGVKA-NH-CH ₂ -CH(OH) ₂	2974.1	2974.5
P₁	H-Ala-Gly-Leu-Ala-Orn(CO-CH(OH) ₂)-OH	518.4	518.5
P₁'	H-Ala-Gly-Leu-Ala-Lys(CO-CH(OH) ₂)-NH ₂	531.4	531.6
P₂	H-Ala-Gly-Leu-Ala-Ala-NH-CH ₂ -CH(OH) ₂	460.4	460.5
P₂acetal	H-Ala-Gly-Leu-Ala-Ala-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂	488.4	488.5
AcP₂acetal	CH ₃ -CO-Ala-Gly-Leu-Ala-Ala-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂	530.4	530.5
AcP₃acetal	CH ₃ -CO-Tyr-Lys-Ala-Gly-Leu-Ala-Glu(NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂)-NH ₂	878.4	878.0
AcP₃'acetal	CH ₃ -CO-Tyr-Lys(Dde)-Ala-Gly-Leu-Ala-Glu(NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂)-NH ₂	1042.4	1042.9

by Bachem (Voisin-le-Bretonneux, France). Aminoacetaldehyde dimethylacetal was obtained from Sigma (St Quentin Fallavier, France).

General procedure for solid-phase peptide synthesis and purification

Solid-phase peptide synthesis was run on a model 431A automated synthesizer from Applied Biosystems using Fmoc/*t*Bu chemistry at the 0.1 mmol scale with DCC/HOBt as coupling reagents. A 10-fold excess was used for protected amino acids and coupling reagents. The Fmoc group was removed with 20% piperidine. Peptides were analysed and purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a Merck-Hitachi L6200A pump equipped with a C₁₈ column, LiChrospher 100 (Merck) (5 µm, 250 × 4 mm i.d.), LiChrosorb 100 (Merck) (7 µm, 250 × 10.5 mm i.d.), a model 655A variable-wavelength UV monitor and a Merck-Hitachi D-7500 integrator were used. Peptides were eluted with a linear gradient of ACN–H₂O–0.1% TFA. Buffer A was water containing 0.1% TFA and buffer B was ACN containing 0.1% TFA.

Peptide synthesis

The 27-mer peptide acetal was prepared using a phenylacetamidomethyl (PAM) resin as described previously.^{3,10} A brief TFA treatment afforded the 27-mer peptide diol.

Peptide **P₁** was prepared using Fmoc-Orn(Mtt)-Wang resin. Elongation was performed according to the general procedure. Boc-Ser(*t*Bu) was introduced after Mtt deprotection of the δ-NH₂ of Orn with 1% TFA in DCM. After cleavage from the resin, precipitation by diethyl ether and lyophilization, the peptide was oxidized with 20 mM NaIO₄ in 0.1 M AcONa¹¹ and then purified by HPLC. Peptide **P₁**: retention time *t_R* = 16.9 min (8–42% B, 30 min); electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS): 518.4 (calculated 518.5).

Peptide **P₁'** was prepared as peptide **P₁** but starting from Fmoc-Lys(Dde)-Rink resin (Dde = 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl) to generate a carboxamide at the C-terminus. Boc-Ser(*t*Bu) was introduced after Dde deprotection of the ε-NH₂ of Lys with 2% N₂H₄ in DMF. *t_R* = 6.7 min (10% B, isocratic); ESI-MS: 531.4 (calculated 531.6).

The peptide **P₂acetal** was synthesized on a Boc-Ala-PAM resin using the general procedure. After removal of N^α-Fmoc with 20% piperidine in DMF and deprotection of side-chains

with TFA–phenol–H₂O–triisopropylsilane (88:5:5:2), the peptidyl resin was aminolysed with aminoacetaldehyde dimethylacetal in DMF for 18 h at 40 °C.¹⁰ The peptide was recovered after draining the resin and extensive washing with DMF, H₂O containing 0.1% TFA, HFIP (3×), and TFE. For **AcP₂acetal**, before the aminolysis, the α-NH₂ was acetylated with Ac₂O. The peptide aldehyde **P₂** was obtained starting from the purified **P₂** acetal after a brief TFA treatment (80% in H₂O). **P₂**, *t_R* = 24.3 min (8–42% B, 30 min); ESI-MS: 460.4 (calculated 460.5); **P₂acetal**, *t_R* = 28.5 min (8–42% B, 30 min); ESI-MS: 488.4 (calculated 488.5); **AcP₂acetal**, *t_R* = 29.5 min (8–42% B, 30 min); ESI-MS: 530.4 (calculated 530.5).

AcP₃acetal was prepared using a Rink resin to generate a carboxamide at the C-terminus. The side-chain protecting groups used were Tyr(*t*Bu), Lys(Dde) and Glu(*t*Bu). The α-NH₂ was acetylated with Ac₂O. After removal of the side-chains and cleavage of the peptide from the resin with TFA–H₂O (95:5), the crude peptide was dissolved in DMF and the aminoacetaldehyde dimethylacetal was grafted on the γ-COOH of Glu using HATU–HOBt as coupling reagent.¹² **AcP₃acetal**, *t_R* = 19.9 min; ESI-MS: 1042.4 (calculated 1042.9). To obtain **AcP₃acetal**, the Dde protecting group was removed by a 10 min treatment with 2% N₂H₄ in H₂O. **AcP₃acetal**, *t_R* = 9 min (18–52% B, 30 min); ESI-MS: 878.4 (calculated 878).

Mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS)

Analyses were performed on a triple-quadrupole mass spectrometer (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) equipped with a nebulizer-assisted electrospray source. The high-flow nebulizer was operated in standard mode with N₂ as both nebulizing (20 l h^{−1}) and drying (250 l h^{−1}) gas. A voltage difference of 3 kV was applied between the capillary and the counter electrode. The ion source was kept at 80 °C. Instrument control and data analysis were accomplished using Masslynx application software, version 3.4, from Micromass. Calibration of the mass spectrometer was performed using myoglobin.

MS experiments were performed on peptide samples collected during the analytical HPLC separation and 3 µl of each peptide were injected into a Rheodyne model 7125 injection valve with a 10 µl sample loop. The compound was eluted into the mass spectrometer using acetonitrile–water

(70:30) as mobile phase delivered by an isocratic LC-10AD pump (Shimadzu, Les Ulis, France) at a flow-rate of $10 \mu\text{l min}^{-1}$. ESI mass spectra were obtained in the positive ion mode.

In-source CID mass spectra were obtained by increasing the sample cone voltage (V_c) from 10 to 80 V in 5 V increments. MS/MS analyses were carried out at collision energies ranging from 0 to 60 eV in 2 eV increments, and argon collision gas was maintained at a pressure of 3.2×10^{-3} Torr (1 Torr = 133.3 Pa) within the r.f.-only hexapole collision cell. The results are presented as breakdown graphs with the percentage total ion current of the examined ion (%TIC) expressed as a function of the cone voltage (V_c) for in-source CID and as a function of the collision energy (E_{coll}) for MS/MS. The experimental errors were evaluated as 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

In a previous study,³ we compared two series of peptides of increased length, peptide acetals and peptide diols. These two series differ only in the functionalization of the C-terminal residue, i.e. a glycinal-acetal ($-\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$) and a hydrated glycinal ($-\text{CH}(\text{OH})_2$). Using in-source CID, we concluded that the loss of the C-terminal functionalization, reflected by the two successive losses of MeOH and H_2O ,

probably occurred via a similar mechanism. As in-source CID does not allow a clear assignment of the ions, we compared the fragmentation of the 27-mer peptide acetal and the 27-mer peptide diol (Table 1) by in-source CID and in-cell CID (Fig. 1).

Fragmentation of the 27-mer peptide acetal was achieved by in-source CID at $V_c = 45$ V (Fig. 1(a)) and by MS/MS on the $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ ion at m/z 751.5 at $E_{\text{coll}} = 8$ eV (Fig. 1(b)). The neutral losses of 32 Da leading to the $[\text{M} + z\text{H} - \text{CH}_3\text{OH}]^{z+}$ and $[\text{M} + z\text{H} - 2\text{CH}_3\text{OH}]^{z+}$ ions (for $z = 4$ at m/z 743.5 and 735.5, respectively) were predominant in both fragmentation techniques. Figure 1(c) represents the mass spectrum of the 27-mer peptide diol, i.e. the hydrated peptide aldehyde, obtained by in-source CID at $V_c = 30$ V. The peptide diol is present at this low cone voltage.³ Figure 1(d) shows the tandem mass spectrum of the 27-mer peptide diol achieved on the $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ ion at m/z 744.5 at $E_{\text{coll}} = 10$ eV. The $[\text{M} + 4\text{H} - 18]^{4+}$ and $[\text{M} + 4\text{H} - 36]^{4+}$ ions, at m/z 740 and 735.5, respectively, result from losses of one and two H_2O .

As the main fragmentations of the peptides studied here were the loss of 32 and 18 Da, further comparisons were made by establishing the corresponding breakdown graphs with the percentage of the total ion current (TIC) of the examined ion expressed as a function of V_c and E_{coll} for in-source and in-cell CID, respectively. The 27-mer peptide can

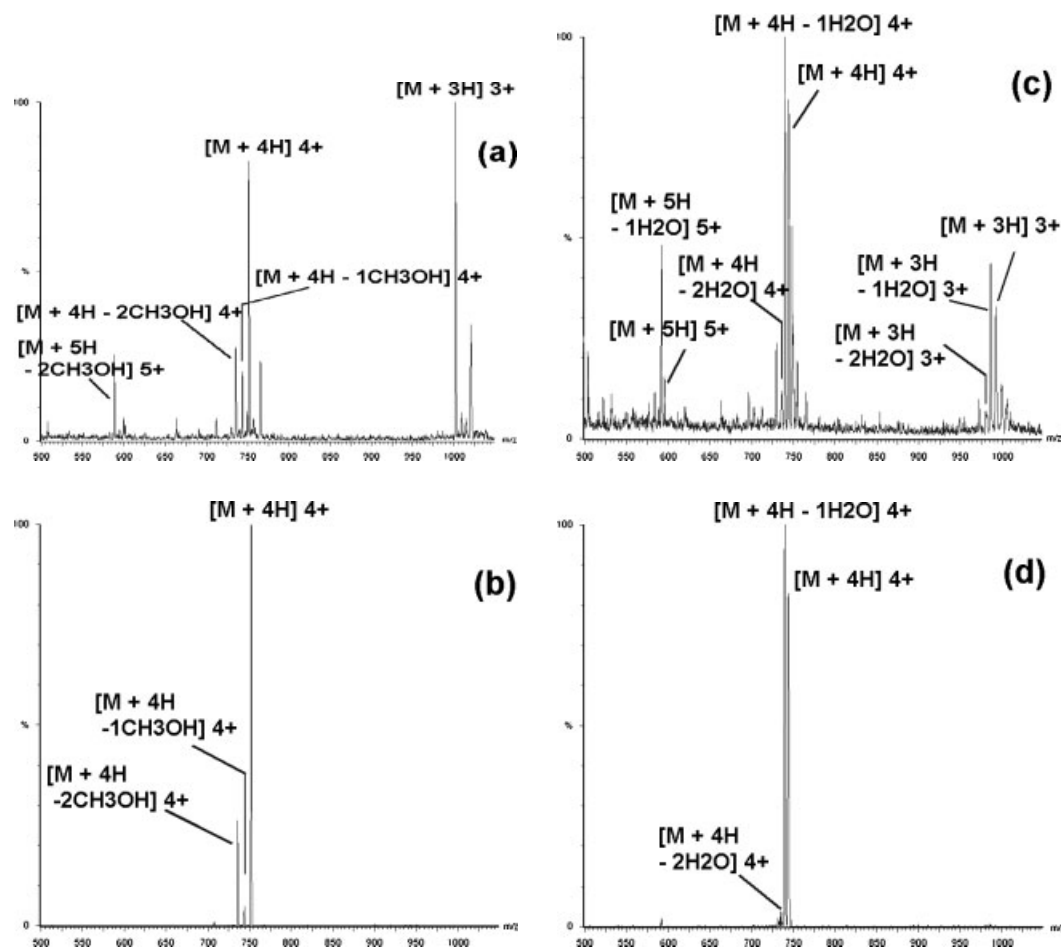


Figure 1. ESI mass spectra of the 27-mer peptide acetal obtained by in-source CID at $V_c = 45$ V (a) and by CID on $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ at m/z 751.5 in the collision cell at $E_{\text{coll}} = 8$ eV (b) and ESI mass spectra of the 27-mer peptide diol obtained by in-source CID at $V_c = 30$ V (c) and by CID on $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ at m/z 744.5 in the collision cell at $E_{\text{coll}} = 10$ eV (d).

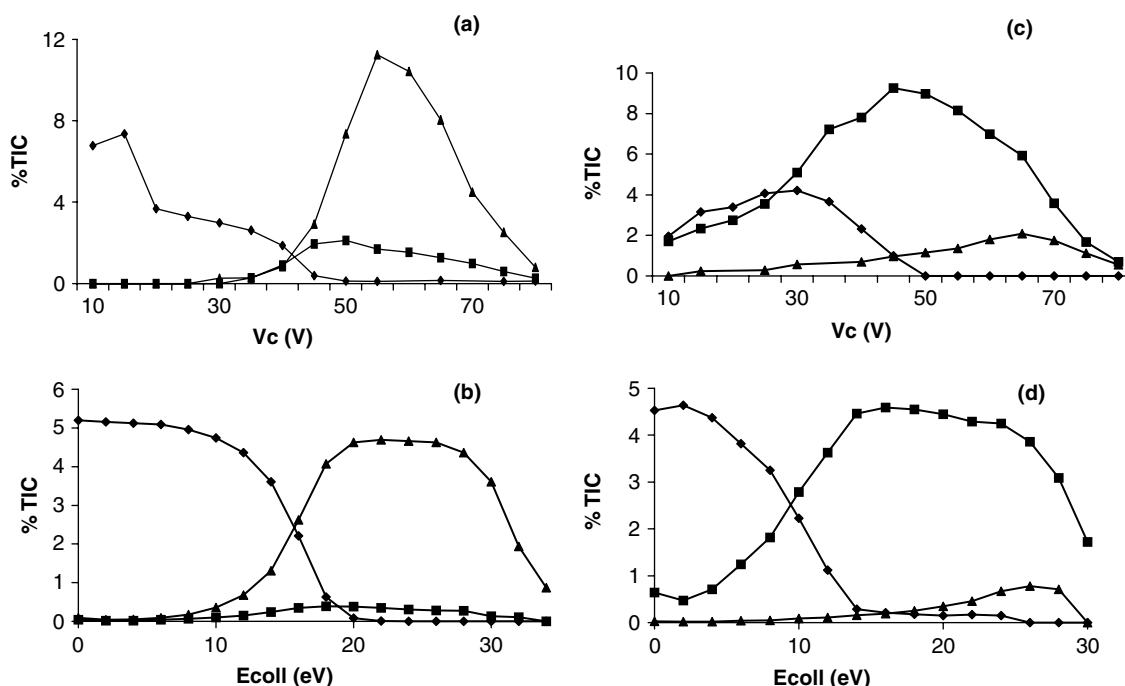


Figure 2. Breakdown graphs of the 27-mer peptide acetal at $z = 4$ obtained (a) by in-source CID and (b) by CID in the collision cell of the tandem mass spectrometer on $[M + 4H]^{4+}$ at m/z 751.5 (◆, $[M + 4H]^{4+}$; ■, $[M + 4H - CH_3OH]^{4+}$; ▲, $[M + 4H - 2CH_3OH]^{4+}$) and breakdown graphs of the 27-mer peptide diol at $z = 4$ obtained (c) by in-source CID and (d) by CID in the collision cell of the tandem mass spectrometer on $[M + 4H]^{4+}$ at m/z 744.5 (◆, $[M + 4H]^{4+}$; ■, $[M + 4H - H_2O]^{4+}$; ▲, $[M + 4H - 2H_2O]^{4+}$).

be charged up to seven times.³ Figure 2(a) and (b) show the breakdown graphs of 27-mer peptide acetal at $z = 4$ using the two methods of fragmentation. Although the shapes of the curves are more cluttered with in-source CID (Fig. 2(a)) than with MS/MS (Fig. 2(b)), their appearances are similar with the same predominant $[M + 4H - 2CH_3OH]^{4+}$ ion. As already observed by others,^{8,13} the two CID processes of low energy used here, i.e. in-source CID and CID in the r.f.-only collision cell, induce the same fragmentations. The breakdown graphs corresponding to the fragmentation of the 27-mer peptide diol (Fig. 2(c) and (d)) gave similar information with an additional point concerning the sole observation by in-source CID (Fig. 2(c)) of the image of the in-solution equilibrium between a peptide aldehyde and its hydrated form, as already reported.³

The comparison of two fragmentation processes carried out on peptide acetals and diols supports the fact that in-source CID and CID in an r.f.-only collision cell of a triple quadrupole give similar information.

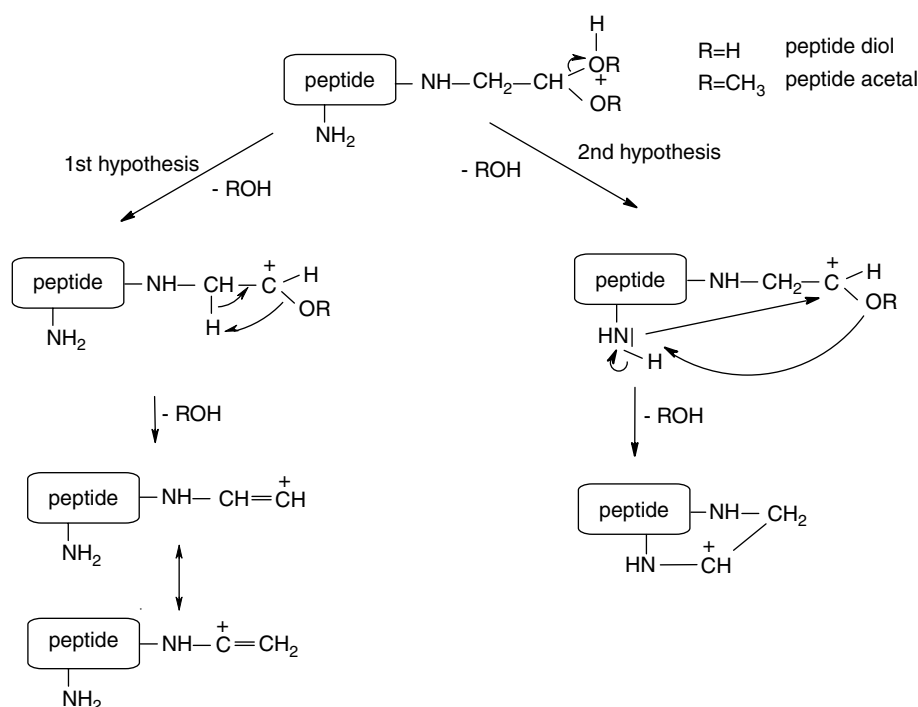
To investigate further the fragmentation of the peptide diols and acetals, we chose in-source CID to establish the potential of this approach for the elucidation of fragmentation mechanisms. Two possible pathways of fragmentation proposed to rationalize the loss of 32 Da (MeOH) and 18 Da (H_2O) at the C-terminal side are shown in Scheme 1. The carbon to which the two methoxy and the diol are linked will hereafter be referred to as the functional carbon.

Charge-induced fragmentation is certainly the mechanism involved in the first loss of 32 and 18 Da from the protonated species. During ESI of peptides, the protons are initially located at the basic sites such as the N-terminal

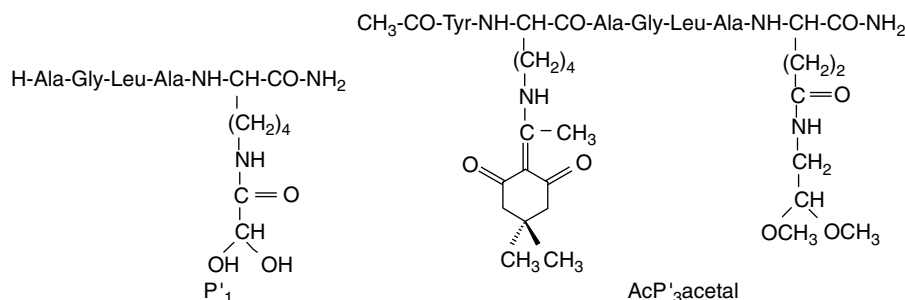
amine, side-chain of Arg, Lys and His, i.e. the sites of greatest proton affinity. According to the mobile proton hypothesis,¹⁴ one proton could migrate towards the C-terminus to protonate the methoxy and the hydroxyl groups, the sites of lower proton affinity. This induces a charge-directed fragmentation with the loss of MeOH and H_2O .

Concerning the second loss of 32 and 18 Da, two hypotheses have been put forward (Scheme 1). The first corresponds to a rearrangement $[2 + 2]$ between the functional carbon and a hydrogen on the adjacent carbon. The second corresponds to a nucleophilic attack by the nitrogen of an amine on the functional carbon. To explore the first hypothesis, P_1 and P_2 model peptide aldehydes (Table 1) differing mainly in the α -substituent of their aldehyde group were synthesized. P_1 and P_1' bear a keto-aldehyde and P_2 bears a methyl-aldehyde. As P_1 peptides do not possess a hydrogen donor at the position α to the aldehyde, they must behave as a negative control for the first hypothesis. Details of the structure of P_1' peptide are given in Scheme 2.

The P_1 and P_2 peptides lost one and two molecules of H_2O , thus providing evidence against the first hypothesis (Fig. 3(a) and (b)). Nevertheless, the presence in the P_1 mass spectrum of a peak attributed to $[M + H - 3H_2O]^+$, which is not seen in the P_2 mass spectrum at a similar voltage (data not shown), led to the question of the fate of the free C-terminus. To address this question, the P_1' peptide with a carboxamidated C-terminus was synthesized and fragmented (Fig. 3(c)). The presence of peaks attributed to $[M + H - H_2O - NH_3]^+$ and $[M + H - 2H_2O - NH_3]^+$ gave evidence of interference of the C-terminus in the diol fragmentation and reinforced evidence against the first hypothesis. A peptide bearing a keto-aldehyde at the



Scheme 1



Scheme 2

C-terminus should have been a better model to investigate the first hypothesis, but the synthesis of such a peptide is not obvious and requires a special linker.¹⁵

The second hypothesis involves a nucleophilic attack between a free NH_2 and the functional carbon at the C-terminal side. To investigate whether an N-terminal α -amine was implicated in the second loss of MeOH , two peptide acetals differing only in the acetylation of the N-terminal moiety were synthesized, i.e. **P₂acetal** and **AcP₂acetal** (Table 1). The breakdown graphs of these peptides are reported in Fig. 4. Two successive losses of methanol were observed for **P₂acetal** (Fig. 4(a)) and only one loss for **AcP₂acetal** (Fig. 4(b)). These results show that the free α - NH_2 is crucial for the second loss of MeOH . To determine whether an N^ϵ -amine whose pK_a is higher than that of a N^α -amine could also be involved in the nucleophilic attack, two lysine-containing peptide acetals were synthesized with the α - NH_2 acetylated and the ϵ - NH_2 of the lysine either bearing a protecting group or unprotected, i.e. **AcP₃'acetal** and **AcP₃acetal**, respectively (Table 1 and Scheme 2). As the N^ϵ -protecting group, Dde was chosen for its ease of removal by hydrazinolysis.¹⁶ The breakdown graphs of the

peptides **AcP₃acetal** and **AcP₃'acetal** are reported in Fig. 5. When the lysine residue was unprotected, the two losses of methanol occurred simultaneously (Fig. 5(a)) whereas only one loss of methanol occurred when the lysyl residue was protected (Fig. 5(b)). This shows that the N^ϵ -amine of the lysine residue plays an important role in the second loss of methanol. For the second loss of methanol and water, these results strengthen our second hypothesis, which implicates a nucleophilic attack between either an α - or an ϵ -amino group and the functional carbon leading to a cyclic ion.

CONCLUSION

The aim of this work was to extend our knowledge on the fragmentation of peptide acetals and hydrated peptide aldehydes, i.e. peptide diols. Using model peptides, the mechanism of fragmentation concerning the successive losses of MeOH and H_2O was explored. The first loss can be explained by a charge-directed fragmentation induced by the migration of a proton from a basic site towards the C-terminal side. Concerning the second loss, two fragmentation

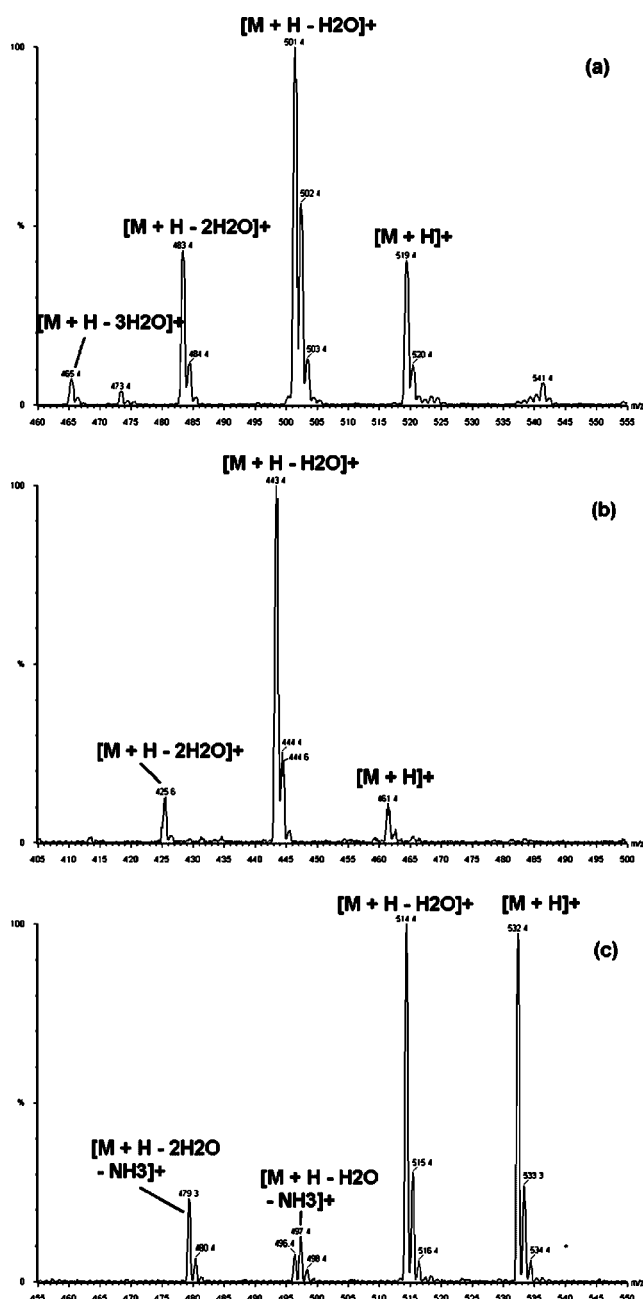


Figure 3. ESI mass spectra obtained by in-source CID for the peptide keto-aldehyde **P₁** at $V_c = 55$ V (a), the peptide methyl-aldehyde **P₂** at $V_c = 25$ V (b) and the peptide keto-aldehyde **P₁'** at $V_c = 30$ V (c).

mechanisms were suggested. Our studies strongly suggest that the final ion is cyclic, resulting from a nucleophilic attack by the nitrogen of an amine on the aldehydic carbon. These results document low-energy fragmentation of peptide acetals and their counterparts, the hydrated peptide aldehydes, and confirm that in-source CID can be used as a simple and useful approach to unravel fragmentation pathways.

REFERENCES

1. Thompson RC. Peptide aldehydes: potent inhibitors of serine and cysteine proteases. *Methods Enzymol.* 1977; **46**: 220.

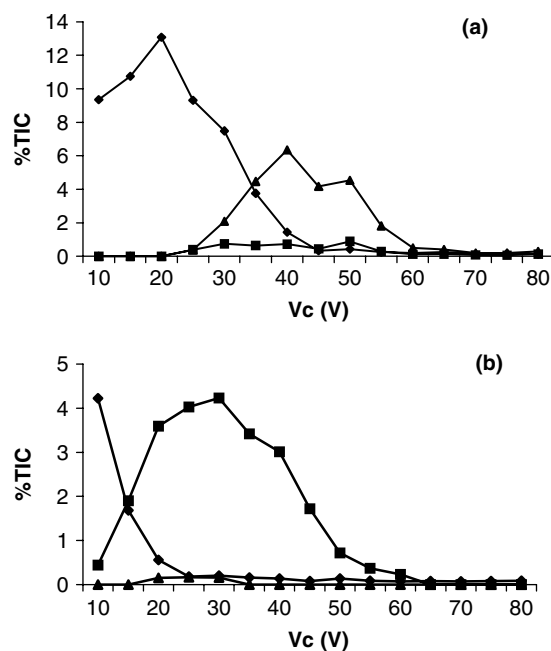


Figure 4. Breakdown graphs of the peptide **P₂acetal** (a) and the acetylated peptide **AcP₂acetal** (b) at $z = 1$ obtained by in-source CID (◆, $[M + H]^+$; ■, $[M + H - CH_3OH]^+$; ▲, $[M + H - 2CH_3OH]^+$).

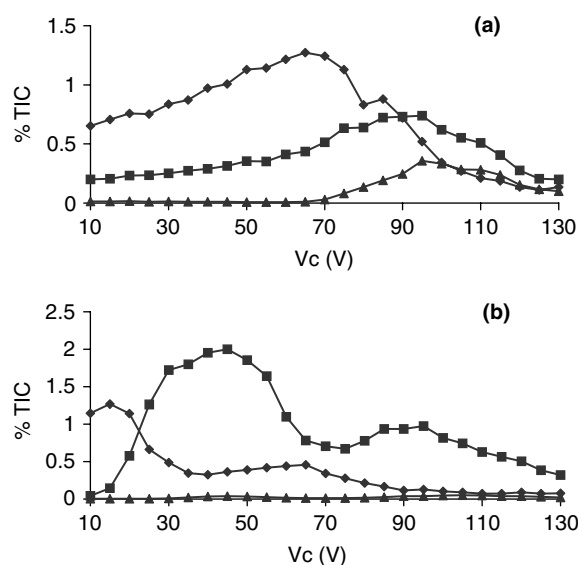


Figure 5. Breakdown graphs of the peptide **AcP₃acetal** (a) and the acetylated peptide **AcP₃'acetal** (b) at $z = 1$ obtained by in-source CID (◆, $[M + H]^+$; ■, $[M + H - CH_3OH]^+$; ▲, $[M + H - 2CH_3OH]^+$).

2. Walker MA. Protein synthesis by chemical ligation of unprotected peptides in aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997; **36**: 1069.
3. Buré C, Gobert W, Lelièvre D, Delmas A. In-source fragmentation of peptide aldehydes and acetals: influence of peptide length and charge state. *J. Mass Spectrom.* 2001; **36**: 1149.
4. Buré C, Lange C. Comparison of dissociation of ions in an electrospray source, or a collision cell in tandem mass spectrometry. *Curr. Org. Chem.* 2003; **7**: 1613.
5. Cole RB (ed). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals Instrumentation and Applications*. Wiley: New York, 1997.

6. Loo JA, Udseth HR, Smith RD. Collisional effects on the charge distribution of ions from large molecules, formed by electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988; **2**: 207.
7. Collette C, De Pauw E. Calibration of the internal energy distribution of ions produced by electrospray. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998; **12**: 165.
8. Harrison AG. Energy-resolved mass spectrometry: a comparison of quadrupole cell and cone-voltage collision-induced dissociation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999; **13**: 1663.
9. De Nino A, Mazzotti F, Perri E, Procopio A, Raffaelli A, Sindona G. Virtual freezing of the hemiacetal-aldehyde equilibrium of the aglycones of oleuropein and ligstroside present in olive oils from carolea and coratina cultivars by ionspray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 461.
10. Lelièvre D, Turpin O, El Kassouli S, Delmas A. Influence of polar support for the synthesis of large C-terminal peptide aldehyde: application to chemoselective ligation. *Tetrahedron* 2002; **58**: 5525.
11. Geoghegan KF, Stroh JG. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chem.* 1992; **1**: 114.
12. Carpino LA. 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.* 1993; **115**: 4397.
13. Van Dongen WD, Van Wijk JIT, Green BN, Heerma W, Haverkamp J. Comparison between collision induced dissociation of electrosprayed protonated peptides in the up-front source region and in a low-energy collision cell. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999; **13**: 1712.
14. Dongré AR, Jones JL, Somogyi A, Wysocki VH. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: evidence for the mobile proton model. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; **118**: 8365.
15. Melnyk O, Fehrentz JA, Martinez J, Gras-Masse H. Functionalization of peptides and proteins by aldehyde or keto groups. *Biopolymers* 2000; **55**: 165.
16. Bycroft BW, Chan WC, Hone ND, Millington S, Nash IA. Synthesis of the spider toxins nephilatoxin-9 and -11 by a novel solid-phase strategy. *J. Am. Chem. Soc.* 1994; **116**: 7415.

Résultats complémentaires:

Des études de fragmentation dans la source ont été réalisées avec des peptides analogues du peptide acétal 19-mer partiellement protégé (tableau 2). Les groupements protecteurs sont le Pbf (pentaméthyldihydrobenzofuransulfonyl, +253 Da) sur l'arginine (schéma 2), le *t*Bu (tertiobutyl, +56 Da) sur la sérine et le For (formyl, +28 Da) sur l' ϵ -NH₂ d'une lysine. Ce sont des peptides issus de réactions secondaires observées lors de la mise au point de la synthèse des peptides acétals [Lelièvre et coll. 2002].

Tableau 2 : Séquence des peptides acétals 19-mer protégés.

Protection	Séquence
For	YLSEIKGVIVHRLEGVK(For)A-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂
<i>t</i> Bu	YLS(<i>t</i>Bu)EIKGVIVHRLEGVKA-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂
Pbf	YLSEIKGVIVHR(Pbf)LEGVKA-NH-CH ₂ -CH(OCH ₃) ₂

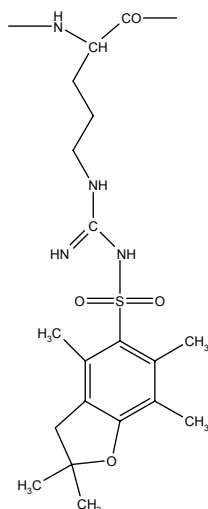


Schéma 2 : Groupement protecteur Pbf sur une arginine.

Nous avons réalisé les mêmes expériences que précédemment en fragmentant dans la source (figure 6).

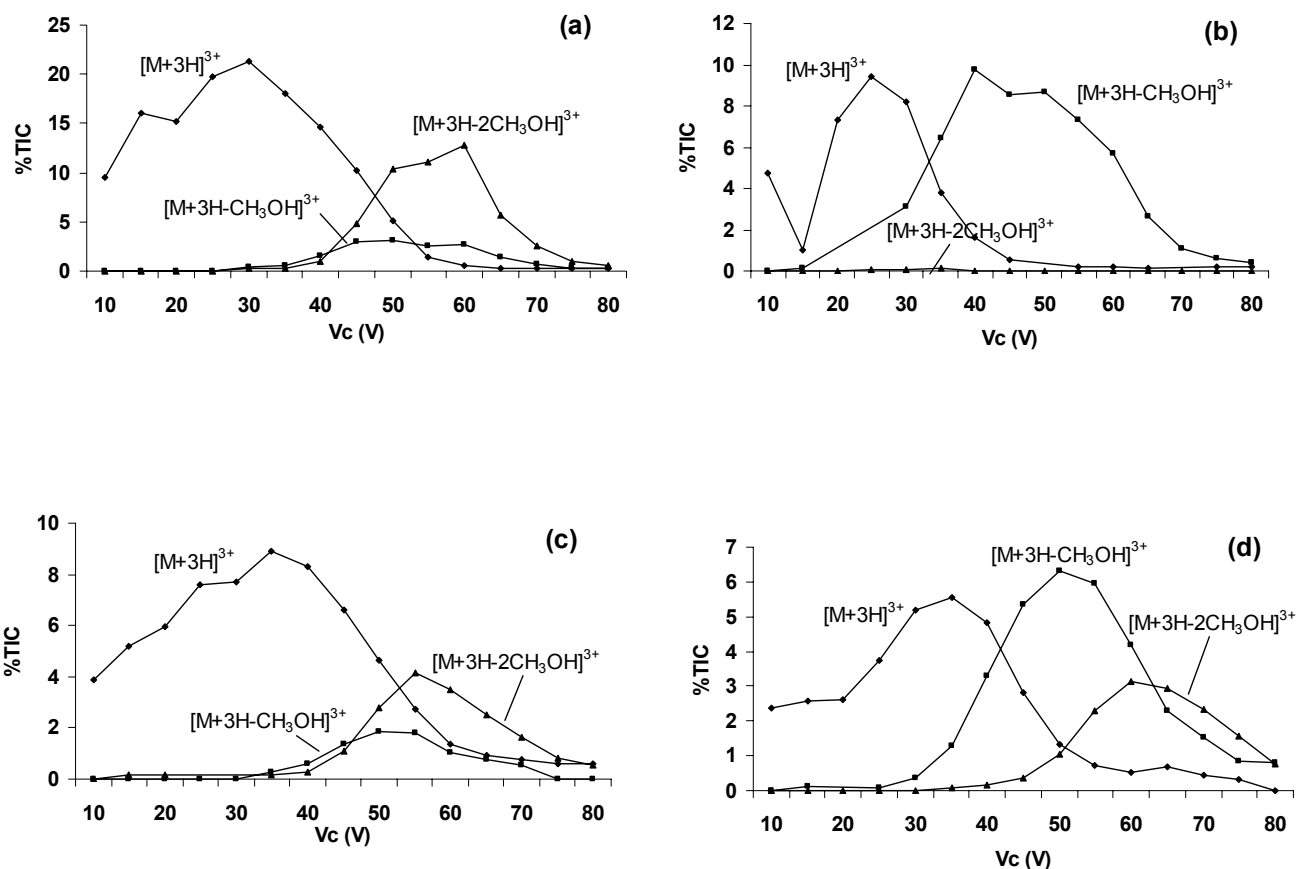


Figure 6 : Fragmentation dans la source du **peptide acétal 19-mer** (a) et du **peptide acétal 19-mer** comportant une protection **K(For)** (b), **S(tBu)** (c) et **R(Pbf)** (d) en fonction de Vc.

Le peptide acétal 19-mer présente une et deux pertes de méthanol qui se font en même temps (figure 6a), la deuxième perte étant supérieure à la première. Lorsque l' ϵ -NH₂ de la lysine en n-2 est bloqué (figure 6b), il n'y a qu'une perte de méthanol alors qu'il y a deux pertes lorsque l' ϵ -NH₂ est libre (figure 6a). Ce résultat confirme que l'ion résultant de la perte de deux molécules de méthanol ou d'eau correspond au résultat d'une cyclisation entre l' ϵ -NH₂ libre d'une lysine et le carbone fonctionnel. Ce résultat montre aussi que l' ϵ -NH₂ de la lysine en n-13 et l' α -NH₂ ne sont pas disponibles pour la cyclisation intramoléculaire conduisant à la seconde perte d'eau.

Lorsque l'hydroxyle de la sérine est bloqué, la deuxième perte de méthanol est supérieure à la première et se fait en même temps (figure 6c). Le profil de fragmentation du peptide acétal

19-mer dont la sérine est bloquée (figure 6c) est proche de celui du peptide déprotégé (figure 6a). La fonction –OH bloquée de la sérine n'a aucune incidence sur la fragmentation.

Lorsque la fonction guanidinium de l'arginine est bloquée, la première perte de méthanol est très importante et la deuxième perte est décalée vers de plus hauts V_c . L'ion $[M+3H-1CH_3OH]^{3+}$ est beaucoup plus stable lorsque la chaîne latérale de l'arginine est bloquée, ce qui suggère que la charge est très retenue sur le carbone fonctionnel.

Ces observations complémentaires confirment que la composition en acide aminé et leur localisation dans la séquence ont une influence sur la fragmentation [Dongré et coll. 1996, Tsapraillis et coll. 2000].

II. Hydratation de peptides aldéhyde et cétone et réaction d'oximation

II.1. Etude de l'hydratation de peptides aldéhyde et cétone

Sous ionisation électrospray, l'hydratation covalente des peptides aldéhyde semble stable à de faibles valeurs de tension de cône. Ceci laisse penser que l'équilibre existant en solution entre peptide aldéhyde et peptide aldéhyde hydraté est probablement 'gelé' dans le processus de désolvatation et que nous en voyons le reflet en phase gazeuse sur nos spectres de masse réalisés par fragmentation dans la source. Nous avons cherché à déterminer dans quelle mesure nous pouvons utiliser cette observation pour comparer l'hydratation de plusieurs peptides aldéhyde ou cétone. Pour cela, nous avons choisi deux séries de peptides, une série modèle et une série correspondant à des peptides naturels et nous avons comparé les résultats obtenus en phase gazeuse par électrospray à ceux obtenus en phase liquide par RMN. Puis nous avons étudié une réaction chimique où la forme hydratée et/ou le carbone tétrahédrique de la forme hydratée joue un rôle, la réaction d'oximation en ligation chimique.

II.1.a. Peptides modèles

II.1.a.1. Présentation des peptides modèles

Notre but est de comparer des peptides aldéhyde et cétone dont l'hydratation attendue en solution aqueuse est différente. Pour cela, nous avons introduit des substituants électroattracteur ou électrodonneur en α du carbonyl considéré. Nous avons choisi d'étudier le peptide méthyl-aldéhyde P1, le peptide céto-aldéhyde P2 et le peptide cétone P3 (tableau 3).

Tableau 3 : Peptides modèles

Nom	Séquence	MH ⁺ (+ [M+H ₂ O+H] ⁺) (Da)	
		calculée	expérimentale
P1	YKAGLGA-NH-CH ₂ -CHO	719,8 (+ 737,8)	720,4 (+ 738,5)
P2	YKAGLA-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CO-CHO	719,8 (+ 737,8)	720,5 (+ 738,4)
P3	YKAGLG-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CO-CO-CH ₃	719,8 (+ 737,8)	720,4 (+ 738,4)

Selon les études précédemment réalisées, pour permettre une étude par ionisation électrospray, les séquences primaires de ces peptides devaient répondre à plusieurs critères: (i) masse identique pour éviter des effets de masse lors de la fragmentation, (ii) séquence très proche pour éviter des effets de séquence lors de la fragmentation, (iii) fonction aldéhyde ou cétone en C-terminal et non sur une chaîne latérale pour éviter une fragmentation supplémentaire du C-terminal (perte de H₂O si le C-terminal est libre ou de NH₃ s'il est amidé), (iv) présence d'un acide aminé tyrosine (Y) pour calculer la concentration en peptide et (v) longueur suffisante permettant une position en m/z des pics de masse de nos peptides en dehors de la zone des basses masses où se situent les pics correspondant au solvant.

Les peptides acétal, aldéhyde et cétone ont été synthétisés au Centre de Biophysique Moléculaire au sein de l'équipe 'Peptides et protéines de synthèse'.

II.1.a.2. Etude de l'hydratation des peptides par fragmentation dans la source

Pour étudier l'hydratation des peptides par fragmentation dans la source, nous avons fait varier la tension appliquée sur le cône de 10 à 70V. Chaque peptide (100 pmol/μl) est dissous dans 80/20 acétonitrile/5 mM d'acétate d'ammonium, ajusté à pH 4,6. La figure 7 montre les spectres de masse obtenus pour chaque peptide à $V_c=20V$.

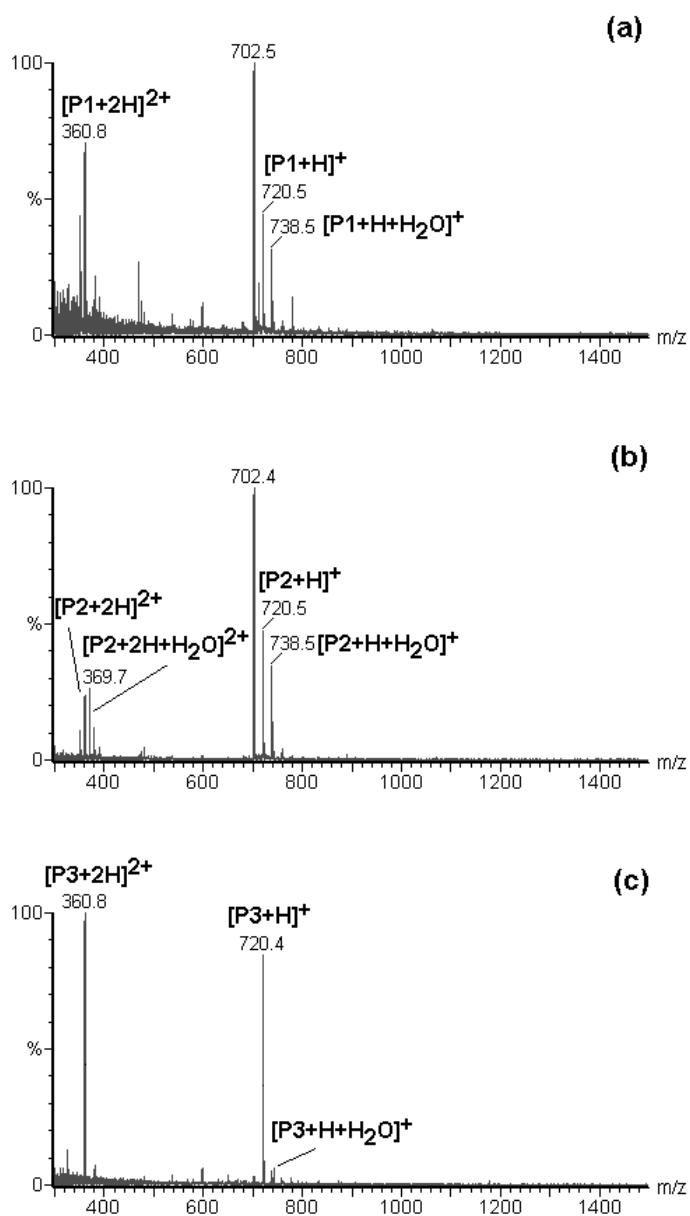


Figure 7 : Spectres de masse obtenus à $V_c=20V$ pour les peptides **P1** (a), **P2** (b) et **P3** (c).

Pour les trois peptides étudiés, méthyl-aldéhyde P1, céto-aldéhyde P2 et cétone P3, nous observons l'ion moléculaire et l'ion correspondant à l'hydratation des aldéhydes et de la cétone. Nous notons également la présence de l'ion m/z 702,4 correspondant à l'ion $[P1+H-H_2O]^+$ (figure 7a) et $[P2+H-H_2O]^+$ (figure 7b). D'après le mécanisme de fragmentation que nous avons vu dans le paragraphe précédent, cet ion proviendrait d'une attaque nucléophile par l'azote d'une amine (N-terminal ou ϵ -NH₂ de la lysine) sur le carbone comportant la fonction aldéhyde ou cétone conduisant à la perte de la deuxième molécule d'H₂O par rapport au peptide hydraté. L'apparition de cet ion dès les faibles valeurs de Vc peut suggérer plusieurs hypothèses. Il y a certainement un effet de longueur et/ou de séquence. Lorsque nous avons étudié les peptides thioester de longueur croissante (chapitre II), nous avons vu que l'efficacité de fragmentation était dépendante de la masse des peptides thioester, à savoir qu'elle était plus importante pour les faibles m/z . Ce résultat est confirmé lorsque nous comparons ces peptides diol (M = 738,5 Da) avec le peptide diol 9-mer (YRLEGVKA-NH-CH₂-CH(OH)₂; M = 994 Da), i.e. le peptide diol de plus faible m/z que nous ayons rencontré lorsque nous avons étudié les peptides diol de longueur croissante (paragraphe I de ce chapitre). Cependant, l'ion correspondant à la perte de deux molécules d'eau provenant des peptides diol P1 et P2 est très abondant à Vc=20V (figures 7a et 7b) alors que celui correspondant au peptide diol 9-mer commence à apparaître à Vc=40V. Cette différence d'abondance entre les ions fragments à ces Vc ne peut pas seulement provenir des effets de masse. Nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'il y ait également un effet de conformation du peptide favorable à l'attaque nucléophile d'une NH₂ et par conséquent à la fragmentation observée ou un effet de position de la lysine dans la séquence (en n-2 pour le diol 9-mer et en n-6 pour P1 par rapport à la fonction diol considérée). Nous observons également que cet ion m/z 702,4 est de faible abondance dans le cas du peptide cétone P3 (figure 1c) à Vc=20V mais si nous continuons à augmenter Vc, nous observons l'apparition de cet ion. Dans le cas de P3, la fragmentation semble retardée car il est probable que l'attaque nucléophile par l'azote d'une amine sur le carbone comportant la fonction cétone est défavorisée. On peut raisonnablement supposer que le carbone fonctionnel d'une cétone est moins accessible que celui d'un aldéhyde en raison de l'encombrement stérique dû au méthyl.

Pour évaluer l'évolution de la fragmentation en fonction de la tension appliquée sur le cône, nous avons établi des graphes de fragmentation à partir des spectres de masse (figure 8).

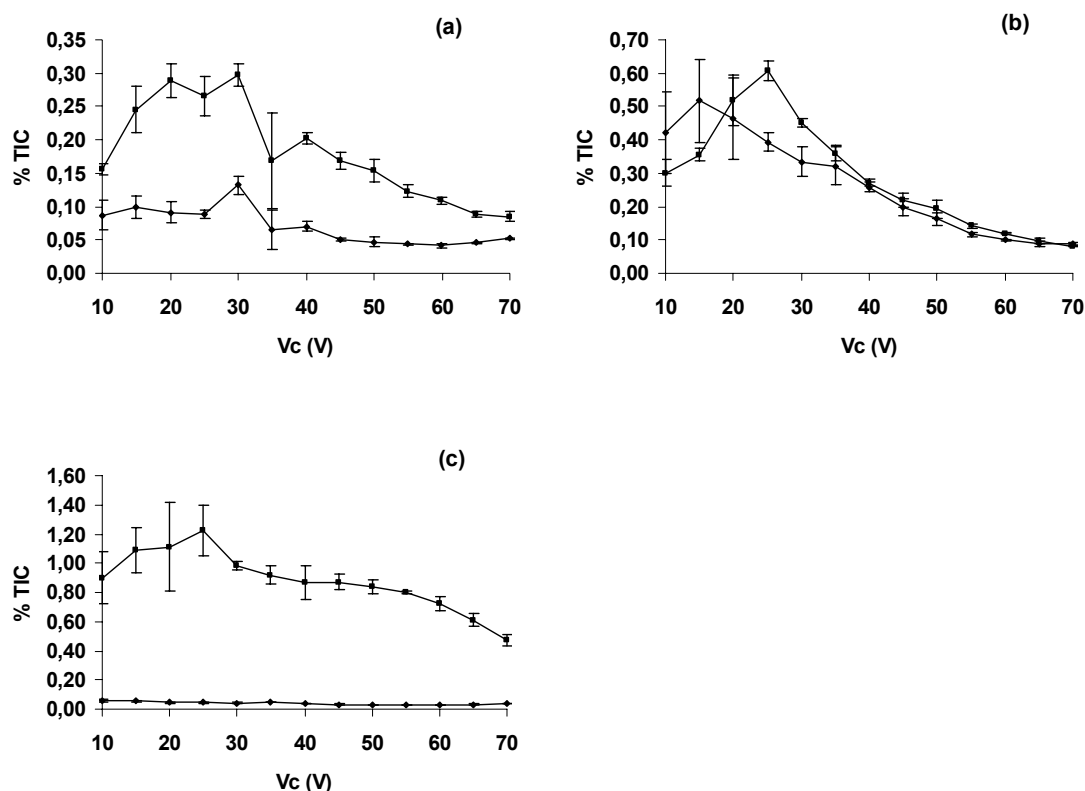


Figure 8 : Graphes de fragmentation du **peptide P1** (a), **P2** (b) et **P3** (c).

(■) représente l'ion peptide et (♦) représente l'ion peptide hydraté. Chaque peptide (100 pmol/μl) est dissous dans 80/20 acétonitrile/5 mM d'acétate d'ammonium, ajusté à pH 4,6.

Concernant le peptide méthyl-aldéhyde P1 à de faibles valeurs de V_c (figure 8a), on observe que la forme aldéhyde est plus importante que la forme hydratée, contrairement au peptide céto-aldéhyde P2 (figure 8b) où la forme hydratée est majoritaire. Concernant le peptide cétone P3 (figure 8c), la forme cétone est largement prépondérante par rapport à la forme hydratée. Nous observons ainsi que les peptides aldéhyde ont un comportement différent du peptide cétone vis-à-vis de l'hydratation. D'après les résultats obtenus, l'ordre de l'hydratation des peptides est le suivant: peptide céto-aldéhyde P2 > peptide méthyl-aldéhyde P1 >> peptide cétone P3. A $V_c < 20V$, l'abondance des ions peptides P1 et P3 et celle des ions peptides hydratés n'augmentent pas de façon parallèle, comme on aurait pu s'y attendre d'après les résultats obtenus avec les peptides diol de taille croissante (figure 4c du paragraphe I.3 de ce chapitre). Les différences entre ces deux études résident dans les séquences des peptides, certainement leur conformation et les conditions de pH qui est de 4,6 dans cette étude et de 1 dans l'étude précédente.

Afin de visualiser la stabilité de la forme hydratée en phase gazeuse, nous avons reporté, sur un graphe, la somme des intensités des ions de l'aldéhyde, ou de la cétone, par rapport à la somme des intensités des ions de l'aldéhyde hydraté, ou de la cétone hydratée, en fonction de la tension appliquée sur le cône (figure 9).

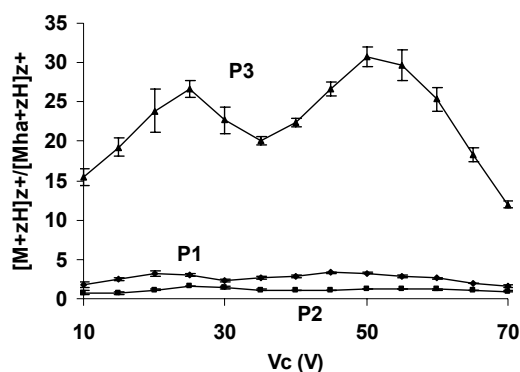


Figure 9 : Stabilité de l'hydratation des **peptides modèles** en fonction de Vc.

A des tensions appliquées sur le cône inférieures à 20V, nous remarquons que seul le peptide céto-aldéhyde P2 présente un plateau alors que les autres peptides présentent une droite de pente croissante. Nous nous attendions à visualiser un plateau pour chaque peptide, comme nous l'avons décrit pour les peptides diol de taille croissante (figure 6 de l'article du paragraphe I.5), plateau qui est caractéristique de la stabilité de la forme hydratée du peptide aldéhyde à de faibles valeurs de Vc.

Comme nous n'observons pas de plateau pour P1 et P3, la meilleure image que nous pouvons détecter en phase gazeuse de l'équilibre existant en solution entre un aldéhyde et sa forme hydratée se situe à la plus faible valeur de tension de cône que nous puissions obtenir, soit Vc=10V. En effet, aux faibles valeurs de Vc, les collisions sont minimisées. Nous avons donc calculé les pourcentages des formes hydratées et non hydratées à cette valeur (tableau 4).

Tableau 4 : Résultats obtenus par fragmentation dans la source

	Vc (V)		Pourcentage (%)	
	Forme non hydratée	Forme hydratée	Forme non hydratée	Forme hydratée
P1	10	10	64	36
P2	10	10	42	58
P3	10	10	94	6

II.1.a.3. Etude de l'hydratation des peptides par résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'absence de plateau pour P1 et P3 nous a incité à vérifier nos résultats obtenus en phase gazeuse sur l'hydratation des peptides par résonance magnétique nucléaire.

La RMN est une technique qui permet d'analyser dans une même solution un peptide aldéhyde et sa forme hydratée grâce à des déplacements chimiques différents [Andersson et coll. 1982]. D'après Andersson et coll., qui ont étudiés des amino-aldéhydes, le proton de la fonction aldéhyde -CHO a un déplacement chimique de l'ordre de 9,5 ppm et le proton de la fonction aldéhyde hydratée -CH(OH)_2 a un déplacement chimique de l'ordre de 5,2 ppm. Concernant le peptide cétone, d'après les tables de déplacement chimique, les protons de la fonction méthyl-cétone -CO-CH_3 ont un déplacement chimique de l'ordre de 2,4 ppm et les protons de la fonction méthyl-cétone hydratée $\text{-C(OH)}_2\text{-CH}_3$ ont un déplacement chimique de l'ordre de 1,5 ppm.

Afin d'estimer l'hydratation en solution de ces trois peptides, ils ont été dissous dans D_2O à pH 4,5 et analysés par RMN à $T=25^\circ\text{C}$ (figure 10). Les analyses ont été réalisées par Hervé Meudal au CBM. Les résultats figurent dans le tableau 5.

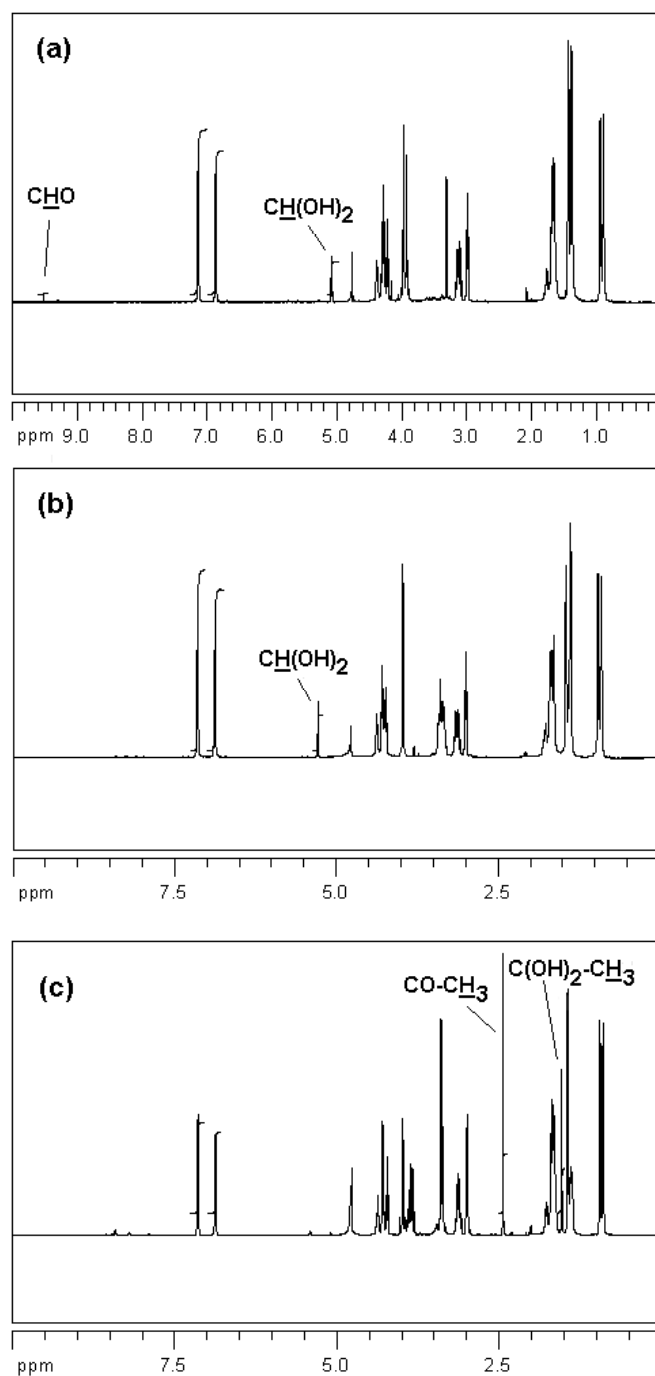


Figure 10 : Spectres de RMN des **peptides P1** (a), **P2** (b) et **P3** (c).

Les peptides sont dissous dans D₂O à pH 4,5 et analysés à T=25°C.

Tableau 5 : Résultats obtenus en RMN

	Déplacement chimique (ppm)		Pourcentage (%)	
	Forme non hydratée	Forme hydratée	Forme non hydratée	Forme hydratée
P1	9,5	5,1	7	93
P2	-	5,3	0	100
P3	2,4	1,5	60	40

Il est à noter que le peptide P1 est un composé instable qui évolue au cours du temps. En RMN, le spectre commence à évoluer en fin d'analyse (élargissement des pics), soit après environ 30 minutes. La dégradation majeure du peptide P1 semble être un produit de masse $M=701$ Da résultant d'une cyclisation entre la fonction aldéhyde en C-terminal et une fonction NH_2 libre (N-terminal ou $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine). Beaucoup de précautions ont donc été prises lors de son utilisation (conservation à sec à -20°C , remontée en température juste avant l'analyse, nouvel échantillon pour chaque analyse). Cependant, sa mise en solution semble être l'étape la plus dommageable.

Les autres peptides, P2 et P3, sont stables en RMN sur ce temps d'analyse. Cependant, le peptide céto-aldéhyde P2 n'est stable que sur quelques heures alors que le peptide cétone P3 est stable sur une journée. Cette dernière observation rejoint celle effectuée lors de l'étude de ces peptides par ESI (figure 7) où nous avons noté que la deuxième perte d'eau par attaque nucléophile et cyclisation intramoléculaire était très retardée pour le peptide cétone P3.

D'après les résultats obtenus par RMN, l'ordre d'hydratation des peptides en solution est le suivant: peptide céto-aldéhyde P2 > peptide méthyl-aldéhyde P1 >> peptide cétone P3. Si l'on compare l'hydratation analysée par ionisation électrospray (tableau 4) avec celle analysée par RMN (tableau 5), nous constatons que nous obtenons en mesure relative le même ordre d'hydratation. Cependant, la présence de la forme hydratée des peptides est sous-estimée en phase gazeuse par rapport à la solution. Nous remarquons également que la sous-estimation du taux d'hydratation du peptide méthyl-aldéhyde est plus importante en phase gazeuse par rapport à la solution que celui du peptide céto-aldéhyde, ce qui laisse penser que la forme hydratée du peptide méthyl-aldéhyde est moins stable en phase gazeuse que celle du céto-aldéhyde.

La sous-estimation des résultats d'hydratation des peptides P1-P3 en phase gazeuse par rapport aux résultats obtenus en solution pourrait s'expliquer par un effet de masse de ces peptides et/ou par l'instabilité des peptides P1 et P2, i.e. leur aptitude à perdre de l'eau en solution.

II.1.b. Peptides naturels

II.1.b.1. Présentation des peptides

Pour documenter l'influence du processus de collision sur la valeur de l'hydratation déterminée par spectrométrie de masse et le minimiser, nous avons voulu tester des peptides de rapport m/z supérieur. De plus, ces peptides ne comporteront pas dans leur séquence de lysine susceptible d'engendrer une perte d'eau par cyclisation intramoléculaire. Pour éviter l'instabilité du peptide méthyl-aldéhyde, nous avons choisi d'étudier un peptide méthyl-aldéhyde connu pour être stable. C'est un peptide naturel (MUC: PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA) de 20 acides aminés issu de la mucine MUC1.

Ce peptide MUC-méthyl-aldéhyde est utilisé comme synthon par l'équipe 'Peptides et protéines de synthèse' dans le contexte d'une approche vaccinale thérapeutique dirigée contre la forme tumorale de MUC1 [Cremer et coll. 2004]. La protéine MUC1 normale, dont le squelette peptidique est composé d'unités répétitives de 20 acides aminés hautement conservés, est fortement glycosylée. Elle est présente à la surface de la plupart des muqueuses. Dans les adénocarcinomes, les cellules tumorales exposent à leur surface des formes sous-glycosylées de la mucine MUC1. L'objectif de l'équipe de synthèse peptidique du CBM est la synthèse de petites protéines artificielles analogues de la forme tumorale de la protéine MUC1, fortement immunogènes pour induire une réaction immunitaire efficace, et suffisamment différentes de l'antigène naturel pour franchir la barrière de tolérance immunitaire chez l'homme. Pour cela, l'équipe de synthèse peptidique du CBM cherche à introduire des liaisons non-naturelles entre les unités de répétition. Ils ont choisi d'enchaîner les unités répétitives de mucine par la méthode de ligation chimique oxime qui résulte de la condensation d'un peptide aldéhyde avec un peptide aminooxy (H_2NO -peptide) [Cremer et coll. 2004]. Dans ce but, le peptide MUC est modifié en C-terminal par une fonction méthyl-

aldéhyde (P4, tableau 6) afin d'introduire la liaison pseudo-peptidique oxime au site de ligation.

Pour notre étude, nous avons utilisé des peptides dérivés de la séquence MUC (tableau 6) dont la masse est très légèrement différente puisqu'il faut conserver la séquence MUC intacte et introduire les différentes fonctionnalités selon les possibilités de la synthèse peptidique. Les peptides P4 et P5 se distinguent grâce au carbone en α de la fonction aldéhyde en C-terminal: P4 est un méthyl-aldéhyde et P5 est un céto-aldéhyde. Le peptide P6 est une cétone. Par souci de clarté dans le tableau 6, nous appelons 'pep' la séquence PPAHGVTSAPDTRPAGST, i.e. la séquence répétitive de MUC sans alanine en C-terminal.

Tableau 6 : Peptides naturels

Nom	Séquence	MH ⁺ (+ [M+H ₂ O+H] ⁺) (Da)	
		calculée	expérimentale
P4	pep-A-NH-CH ₂ -CHO	1928,1 (+ 1946,1)	1928,3 (+ 1946,3)
P5	pep-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CO-CHO	1914,1 (+ 1932,1)	1914,3 (+ 1932,1)
P6	pep-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CO-CO-CH ₃	1928,1 (+ 1946,1)	1928,6 (+ 1946,3)

II.1.b.2. Etude de l'hydratation des peptides par fragmentation dans la source

Pour étudier l'hydratation de ces peptides par fragmentation dans la source, nous avons fait varier la tension appliquée sur le cône de 10 à 70V. Chaque peptide (200 pmol/μl) est dissous dans 80/20 acétonitrile/5 mM d'acétate d'ammonium, ajusté à pH 4,6. La figure 11 montre les spectres de masse obtenus pour chaque peptide à Vc=20V.

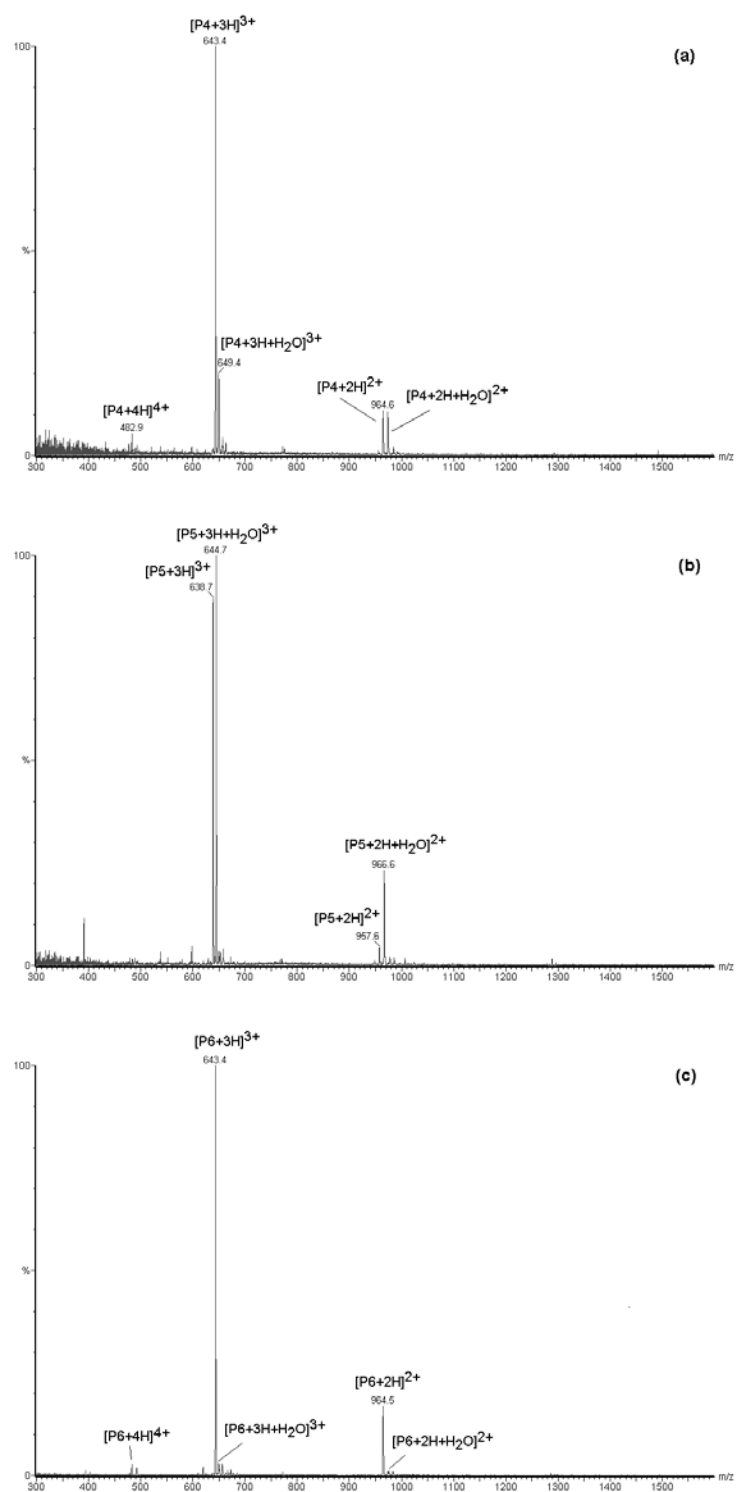


Figure 11 : Spectres de masse obtenus à $V_c=20V$ pour les **peptides P4** (a), **P5** (b) et **P6** (c).

Nous constatons que l'ion fragment correspondant à la perte de deux molécules d'eau provenant des peptides hydratés n'apparaît plus sur les spectres de masse à $V_c=20$ V (figure 11). Si nous continuons à augmenter V_c , nous observons que cet ion fragment apparaît pour les peptides hydratés P4 et P5 et est quasiment inexistant pour le peptide P6. Nous constatons que le peptide P4 ne se dégrade pas au cours du temps. Ceci est vraisemblablement dû à l'absence de lysine dans la séquence.

A partir des spectres de masse, nous avons établi des graphes de fragmentation (figure 12).

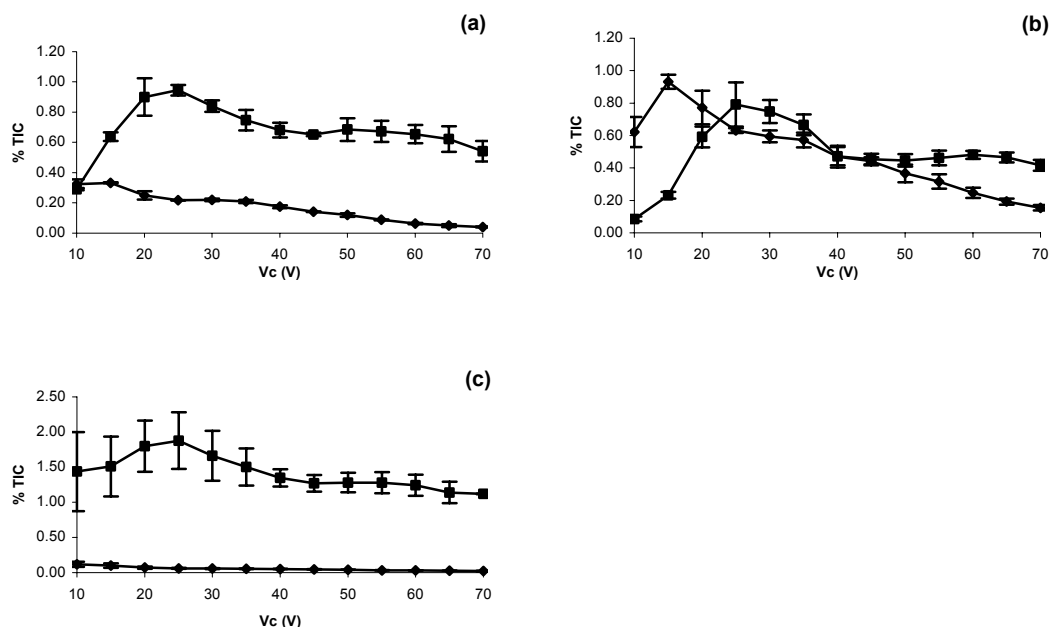


Figure 12 : Graphes de fragmentation du **peptide P4** (a), **P5** (b) et **P6** (c).

(■) représente l'ion peptide et (◆) représente l'ion peptide hydraté. Chaque peptide (200 pmol/ μ l) est dissous dans 80/20 acétonitrile/5 mM d'acétate d'ammonium, ajusté à pH 4,6.

Nous obtenons les mêmes résultats qu'avec les peptides modèles précédents, i.e. le peptide cétone P6 (figure 12c) a un comportement complètement différent des deux peptides aldéhyde P4 et P5 (figures 12a et 12b), n'étant pratiquement pas hydraté. Le peptide méthyl-aldéhyde est moins hydraté que le peptide céto-aldéhyde.

Nous avons reporté, sur un graphe, la somme des intensités des ions de l'aldéhyde, ou de la cétone, par rapport à la somme des intensités des ions de l'aldéhyde hydraté, ou de la cétone hydratée, en fonction de la tension appliquée sur le cône (figure 13). Nous pouvons alors comparer l'hydratation des aldéhydes et cétone étudiés.

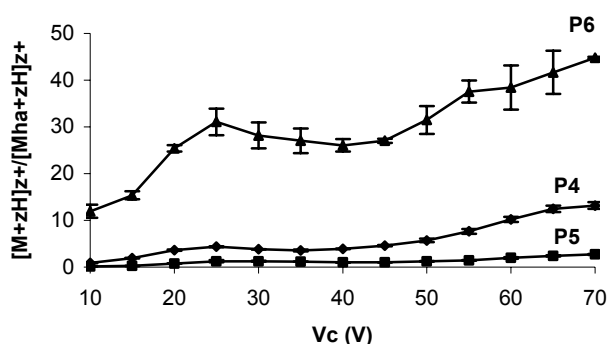


Figure 13 : Stabilité de l'hydratation des **peptides naturels** en fonction de Vc.

Comme pour la série de peptides modèles P1-P3, l'abondance des ions peptides et peptides hydratés n'évoluent pas de façon parallèle à $V_c < 20V$, contrairement aux peptides aldéhyde de taille croissante étudiés dans le paragraphe I de ce chapitre.

Lorsque nous comparons le graphe représentant la stabilité de l'hydratation des peptides naturels (figure 13) et celui représentant les peptides modèles (figure 9), nous constatons qu'à de faibles valeurs de V_c , les peptides céto-aldéhyde P2 et P5 ont une hydratation stable. A $V_c < 20V$, l'hydratation des peptides P4 et P6 semble être plus stable que les peptides modèles respectifs P1 et P3.

Comme nous n'avons toujours pas de plateau pour les peptides P4 et P6, nous avons calculé les pourcentages des formes hydratées et non hydratées de chaque peptide pour une valeur de $V_c = 10V$ (tableau 7).

Tableau 7 : Résultats obtenus par fragmentation dans la source

	Vc (V)		Pourcentage (%)	
	Forme non hydratée	Forme hydratée	Forme non hydratée	Forme hydratée
P4	10	10	48	52
P5	10	10	13	87
P6	10	10	92	8

La forme hydratée est plus importante pour les peptides aldéhyde P4-P5 que pour les peptides aldéhyde P1-P2, modèles de masse plus faible, et les résultats pour les peptides cétone P3 et P6 sont proches. Ces résultats confirment l'hypothèse que l'hydratation des peptides aldéhyde et cétone par spectrométrie de masse ESI dépend, entre autres, de la longueur du peptide.

II.1.b.3. Etude de l'hydratation des peptides par résonance magnétique nucléaire

Afin d'estimer l'hydratation en solution de ces trois peptides, ils ont été dissous dans D₂O à pH 4,5 et analysés par RMN à T=25°C (figure 14). Les résultats figurent dans le tableau 8.

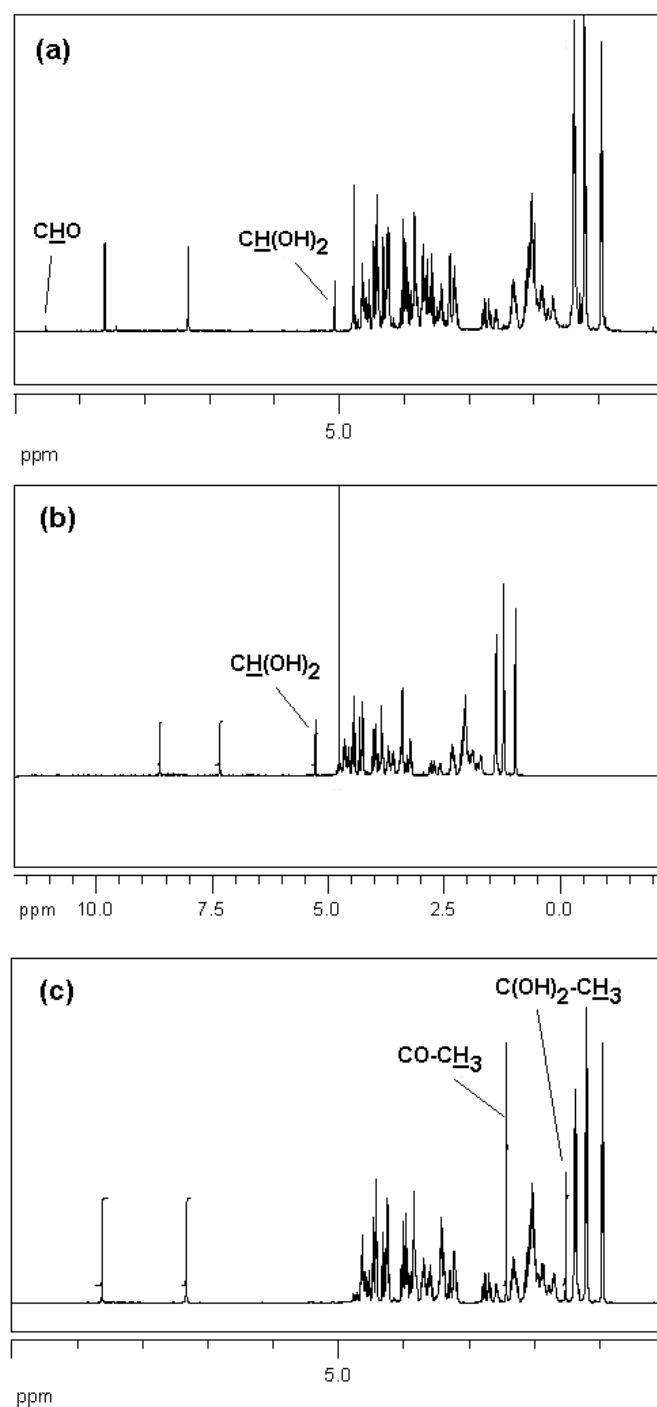


Figure 14 : Spectres de RMN des **peptides P4** (a), **P5** (b) et **P6** (c).

Les peptides sont dissous dans D_2O à pH 4,5 et analysés à $T=25^\circ\text{C}$.

Tableau 8 : Résultats obtenus en RMN

	Déplacement chimique (ppm)		Pourcentage (%)	
	Forme non hydratée	Forme hydratée	Forme non hydratée	Forme hydratée
P4	9,5	5,1	8	92
P5	-	5,3	0	100
P6	2,4	1,5	62	38

Il est à noter que tous les peptides naturels sont stables dans le temps ce qui élimine les problèmes liés à la cyclisation intramoléculaire due à une conformation particulière des peptides modèles ou plus vraisemblablement à la présence d'une lysine dans leur séquence.

Les résultats obtenus avec les peptides naturels confirment ceux des peptides modèles avec le même ordre d'hydratation, peptide céto-aldéhyde P5> peptide méthyl-aldéhyde P4>> peptide cétone P6, observé dans les deux techniques et un taux d'hydratation sous-estimé en phase gazeuse.

II.1.c. Discussion

Les analyses en RMN ont été effectuées afin de comparer l'hydratation en solution des peptides aldéhyde et cétone à leur taux d'hydratation en phase gazeuse déterminée par spectrométrie de masse ESI. Les résultats obtenus par RMN sur l'hydratation des peptides naturels en solution sont identiques à ceux obtenus avec les peptides modèles tant du point de vue qualitatif avec l'ordre d'hydratation suivant, peptide céto-aldéhyde > peptide méthyl-aldéhyde >> peptide cétone, que du point de vue quantitatif avec des taux d'hydratation identiques (tableaux 5 et 8). Ceci montre qu'en solution, l'hydratation est dépendante de la fonction, méthyl-aldéhyde, céto-aldéhyde ou cétone, mais non de la séquence ou de la longueur du peptide.

Si l'ordre d'hydratation des peptides en RMN (tableaux 5 et 8) suit le même ordre d'hydratation qu'en spectrométrie de masse (tableaux 4 et 7), i.e. céto-aldéhyde>méthyl-aldéhyde>>cétone, les résultats obtenus par fragmentation dans la source montrent que la présence de la forme hydratée des peptides est sous-estimée en phase gazeuse par rapport

à la solution. Cette sous-estimation est moindre pour les peptides naturels de 20 acides aminés que pour les peptides modèles de 7 acides aminés. Il semblerait que l'estimation de l'hydratation en phase gazeuse soit dépendante non seulement de la fonction étudiée mais aussi de la possibilité de fragmentation de ces peptides qui est dépendante de leur longueur. Le processus de collision induit certainement une sous-estimation supplémentaire pour les ions de faible m/z . Cette observation pourrait s'expliquer aussi par les différences entre la phase gazeuse et la solution telles que, par exemple, la concentration et la conformation des peptides. La différence majeure entre les deux états est le processus de désolvatation intervenant dans la source qui pourrait induire une déshydratation du peptide diol.

En phase gazeuse, la sous-estimation du taux d'hydratation du méthyl-aldéhyde est plus importante que celle du céto-aldéhyde ce qui suggère que sa forme hydratée tétrahédrique soit moins stable (tableau récapitulatif 9).

Tableau récapitulatif 9 : Hydratation en RMN et ESI		
	RMN	ESI
Peptide méthyl-aldéhyde		
modèle (7AA) P1	93	36
naturel (20 AA) P4	92	52
Peptide céto-aldéhyde		
modèle (7AA) P2	100	58
naturel (20 AA) P5	100	87
Peptide cétone		
modèle (7AA) P3	40	6
naturel (20 AA) P6	38	8

L'estimation de la forme hydratée de nos peptides par RMN semble être la méthode de choix puisqu'elle est reproductible sur les deux séries de peptides que nous avons étudiées. Cette hydratation dépend donc principalement des fonctions méthyl-aldéhyde, céto-aldéhyde et cétone. Cependant, la spectrométrie de masse apporte une estimation qualitative reproductible sur l'hydratation des peptides puisque l'ordre d'hydratation en phase gazeuse correspond à l'ordre d'hydratation en solution même si cette information n'est pas reproductible du point de vue quantitatif sur les deux séries de peptides étudiées. La

spectrométrie de masse a tout de même l'énorme avantage de consommer peu d'échantillon par rapport à la RMN.

Il faut souligner que la spectrométrie de masse apporte des informations supplémentaires par rapport à la RMN sur le comportement des fonctions aldéhyde et cétone et de leur hydrate. Entre autres, elle nous indique que la cétone comporte un encombrement stérique et que l'hydrate du méthyl-aldéhyde est moins stable que celui du céto-aldéhyde. En conclusion, les deux méthodes sont complémentaires puisque la RMN atteste la forme hydratée en solution et l'ionisation électrospray illustre le comportement en phase gazeuse du carbonyl étudié et de sa forme hydratée tétrahédrique.

11.2. Ligation chimique par liaison oxime

L'hydratation de l'aldéhyde et de la cétone et/ou la stabilité de cette forme tétrahédrique peut jouer un rôle important dans un certain nombre de réactions chimiques. Nous nous sommes intéressées à la formation de liaison oxime qui résulte de la condensation d'un peptide aldéhyde sur un peptide aminooxy en milieu aqueux (schéma 3). Cette réaction s'apparente aux méthodes de ligation chimique en chimie de peptide.

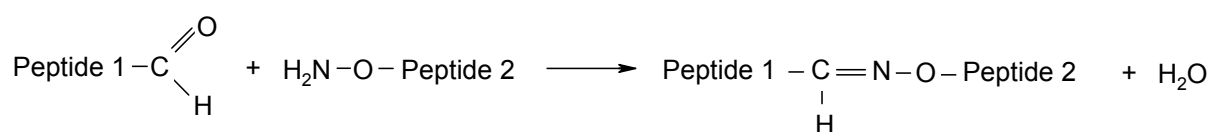


Schéma 3 : Réaction de ligation entre un peptide aldéhyde et un peptide aminooxy.

La ligation chimique en chimie de peptide concerne les réactions de formation d'une liaison covalente en milieu aqueux entre deux fragments peptidiques déprotégés. Le but est d'assembler par voie convergente des synthons macromoléculaires synthétisés indépendamment pour former une macromolécule plus grande que ce qu'il est possible de synthétiser par voie récurrente. Ceci implique la présence de deux fonctions chimiques

complémentaires présentes respectivement sur l'un et l'autre des fragments peptidiques à condenser. Dans notre cas, la réaction de ligation se fait entre un peptide comportant un électrophile en C-terminal, une fonction aldéhyde (ou cétone), et un peptide comportant un nucléophile en N-terminal, un groupe aminooxy (schéma 3). La réaction d'oximation est optimale en milieu aqueux à pH 4,6.

Le choix d'une fonction aldéhyde présente l'avantage d'être très réactive et d'être absente des séquences peptidiques. L'acide conjugué du groupe aminooxy ($\text{H}_2\text{N-O}^-$) présente un pK_a de 3,5 ce qui permet à la seule amine du groupe aminooxy d'être déprotonnée au pH de la réaction, les autres amines étant protégées par protonation. Ceci confère à la réaction d'oximation chimio et régiosélectivité.

La formation de la liaison oxime s'effectue en deux étapes. En milieu acide, la première étape correspond à une addition nucléophile sur le groupe carbonyle et à la protonation de l'oxygène induisant la formation d'une forme tétrahédrique (schéma 4). D'après Sayer et coll. [1974], cette première étape peut s'effectuer soit par un mécanisme concerté (schéma 4) si nous sommes en présence d'une amine faiblement basique, soit par un mécanisme par étapes, passant par un intermédiaire d'addition zwitterionique, si nous sommes en présence d'une amine fortement basique. Lors de notre réaction de ligation, nous travaillons en milieu acide à pH 4,6 avec un peptide aminooxy faiblement basique de pK_a de 3,5, ce qui nous laisse supposer que nous travaillons selon un mécanisme concerté dans la première étape de la réaction.

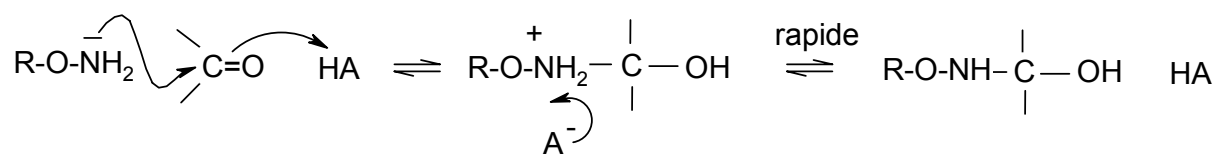


Schéma 4 : Mécanisme concerté de l'addition nucléophile sur le groupe carbonyle et de la protonation de l'oxygène induisant la formation d'une forme tétrahédrique carbinolamine.

La deuxième étape correspond à la protonation de l'hydroxyle, puis à la déshydratation induisant la formation de l'oxime (schéma 5).

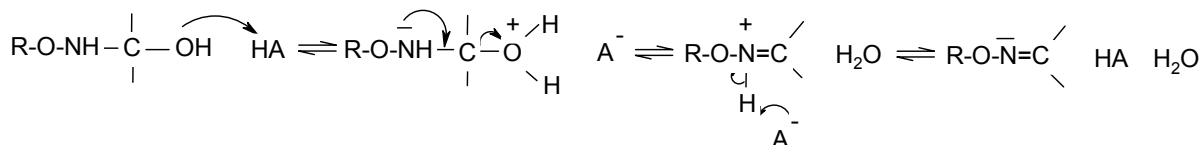


Schéma 5 : Protonation de l'hydroxyle puis déshydratation induisant la formation de l'oxime.

II.2.a. Cinétique de la réaction de ligation suivie par HPLC

Par RMN, nous avons déterminé l'hydratation en solution de deux séries de peptides composées chacune de deux peptides aldéhyde et d'un peptide cétone, précédemment décrites, ainsi que le comportement de ces composés et de leur forme tétrahédrique en phase gazeuse par spectrométrie de masse ESI. Nous allons maintenant évaluer la réactivité de ces peptides aldéhyde et cétone vis-à-vis d'un peptide aminooxy en suivant la formation des peptides oxime par HPLC en phase inverse au cours du temps.

Le peptide aminooxy modèle Paoa (tableau 10) a été choisi selon les critères suivants: (i) présence d'un acide aminé tryptophane (W) pour calculer la concentration en peptide et (ii) longueur moyenne. Les peptides aminooxy sont connus pour se dégrader facilement, même à -20°C d'où la présence de pics supplémentaires sur les chromatogrammes lors de la cinétique de la réaction de ligation. Ce peptide est utilisé sans purification préalable. La plupart des pics issus de la dégradation de ce peptide sont connus [Buré et coll. 2000] et correspondent à l'addition nucléophile de l'aminooxy sur le groupe carbonyle de petites molécules, telles que le formaldéhyde, l'acétaldéhyde et l'acétone.

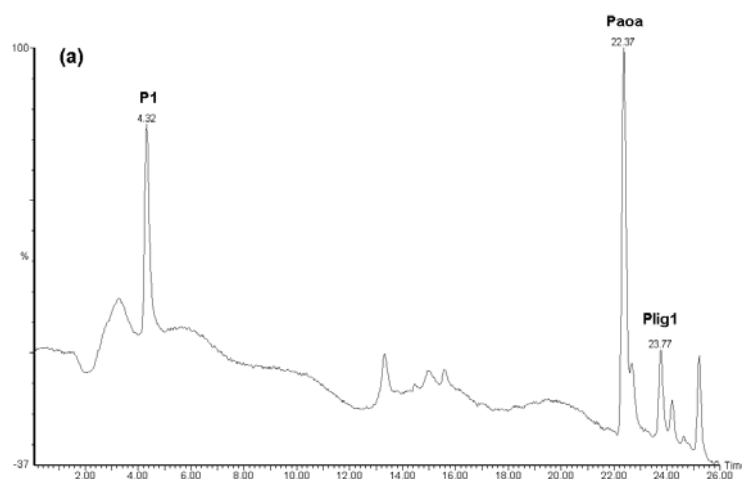
Les peptides résultant de la ligation chimique entre Paoa et les peptides aldéhyde et cétone précédemment décrits (tableaux 3 et 6) sont les peptides Plig1-Plig6 (tableau 10).

Tableau 10 : Peptide aminooxy et peptides issus de la ligation chimique

Nom	Séquence	MH ⁺ calculée (Da)	MH ⁺ expérimentale (Da)
Paoa	H ₂ N-O-CH ₂ -CO-ALKWSLA	861.0	861.6
Plig1	YKAGLGA-NH-CH ₂ -CH=N-O-CH ₂ -CO-ALKWSLA	1562.8	1563.1
Plig2	YKAGLA-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CO-CH=N-O-CH ₂ -CO-ALKWSLA	1562.8	1563.3
Plig3	YKAGLA-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CO-C(CH ₃)=N-O-CH ₂ -CO-ALKWSLA	1562.8	1563.2
Plig4	pep-A-NH-CH ₂ -CH=N-O-CH ₂ -CO-ALKWSLA	2771.1	2771.5
Plig5	pep-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CO-CH=N-O-CH ₂ -CO-ALKWSLA	2757.1	2757.6
Plig6	pep-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-CO-C(CH ₃)=N-O-CH ₂ -CO-ALKWSLA	2771.1	2771.3

II.2.a.1. Cinétique de la réaction de ligation suivie par HPLC pour les peptides modèles

Nous avons suivi par HPLC la cinétique de la réaction de ligation entre les peptides modèles (tableau 3), en excès, et le peptide aminooxy. Les peptides sont mis en solution dans un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,6, juste avant ligation à température ambiante. La réaction est suivie par HPLC, à 25°C, pendant 37 heures. La durée d'une analyse étant de 36 min, l'évolution de la réaction est mesurée environ toutes les 38 min. Des exemples de chromatogrammes à $t_0 = 4$ min et $t = 2$ h30 sont montrés respectivement figures 15 et 16. Les produits de ligation apparaissent faiblement à t_0 sauf pour Plig1. La figure à $t = 2$ h30 confirme ce résultat en montrant Plig1 très supérieur en proportion à Plig2 et Plig3.



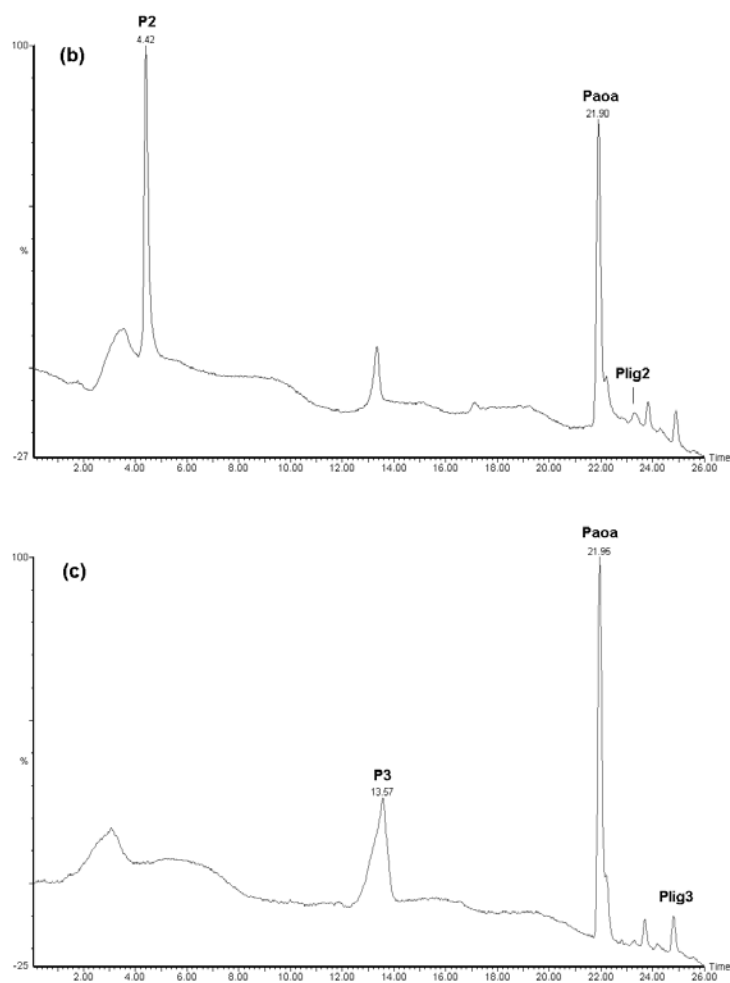
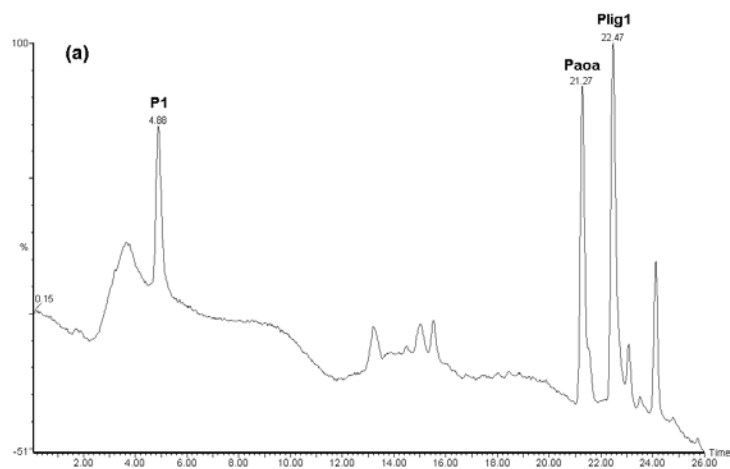


Figure 15 : Chromatogrammes représentant réaction de ligation entre les peptides P1 (a), P2 (b) et P3 (c) avec le peptide aminooxy à $t_0 = 4$ min.

La réaction est effectuée dans un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,6, à 25°C. Le solvant A est H₂O+0,1% TFA et le solvant B est acétonitrile + 0,1% TFA. Le gradient est de 10 à 30% de B en 20 min, 30 à 100 % de B en 3 min, 100 à 10 % de B en 3 min puis 10% de B pendant 10 min. La détection est effectuée à 280 nm.



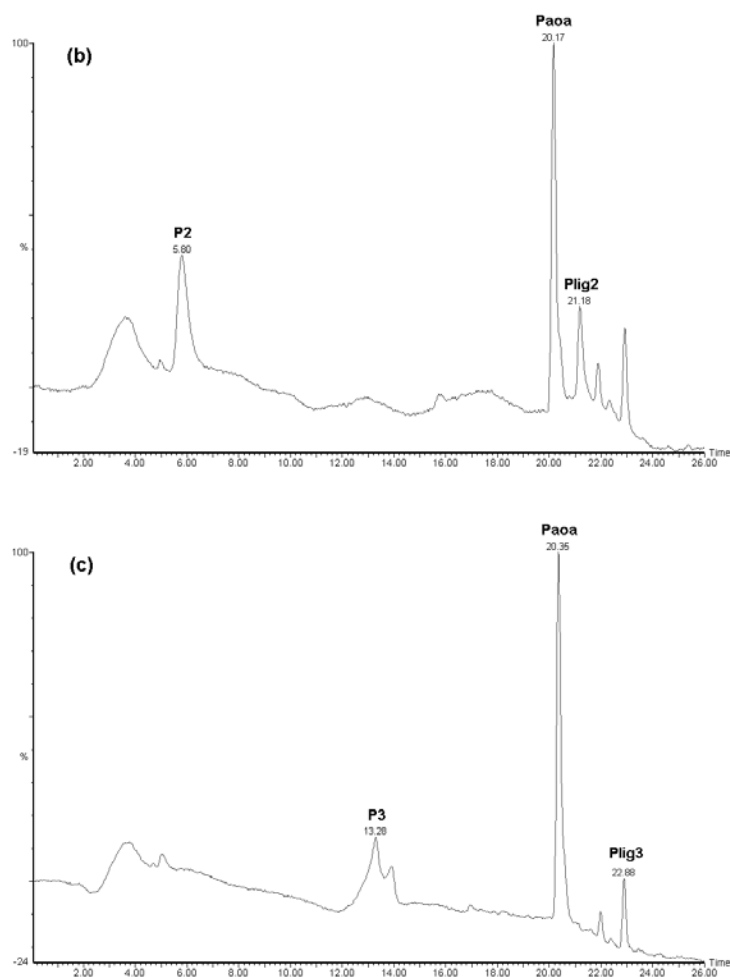


Figure 16 : Chromatogrammes représentant réaction de ligation entre les **peptides P1** (a), **P2** (b) et **P3** (c) avec le peptide aminooxy à **t= 2h30**.

La réaction est effectuée dans un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,6, à 25°C. Le solvant A est H₂O+0,1% TFA et le solvant B est acétonitrile + 0,1% TFA. Le gradient est de 10 à 30% de B en 20 min, 30 à 100 % de B en 3 min, 100 à 10 % de B en 3 min puis 10% de B pendant 10 min. La détection est effectuée à 280 nm.

La cinétique d'apparition du produit de ligation est reportée figure 17 sur un graphe dont l'abscisse est le temps et l'ordonnée est le pourcentage du produit de ligation obtenu selon l'équation (3), Paoa étant le partenaire en défaut:

$$\% \text{ Produit de ligation} = \frac{\text{Aire (Plig x)}}{\text{Aire (Paoa) + Aire (Plig x)}} \times 100 \quad \text{Equation (3)}$$

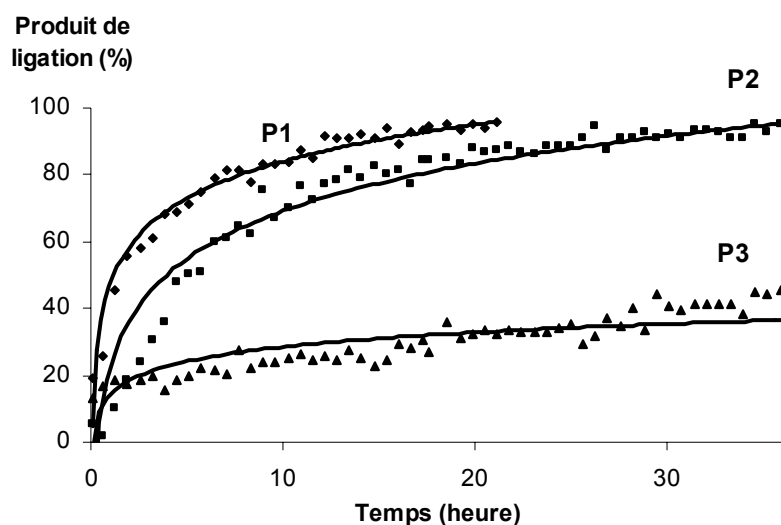


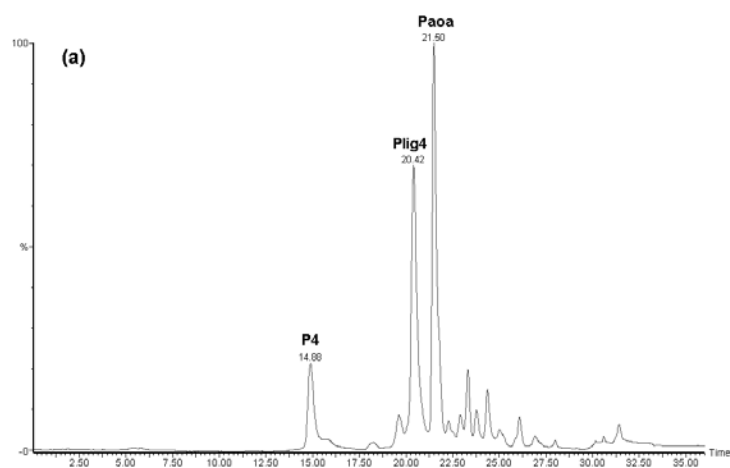
Figure 17 : Cinétique de la réaction de ligation des trois peptides **P1**, **P2** et **P3** avec le peptide aminooxy **Paoa**.

D'après la figure 17, 50% du produit de ligation du peptide méthyl-aldéhyde P1 est obtenu au bout d'environ 1h30 alors que pour ce temps, seulement 20% de produit de ligation sont formés pour le peptide céto-aldéhyde P2 et 15% pour le peptide cétone P3. 100% du produit de ligation est obtenu au bout d'environ 18h avec le peptide P1 et 35h avec P2 alors qu'avec P3, nous obtenons 37% du produit de ligation au bout de 37h. Nous observons la forte réactivité, pour le peptide aminooxy, des peptides aldéhyde par rapport au peptide cétone. Le peptide méthyl-aldéhyde P1 est plus réactif que le peptide céto-aldéhyde, surtout en début de réaction. L'ordre de réactivité des peptides aldéhyde et cétone vis-à-vis d'un peptide aminooxy est le suivant: peptide méthyl-aldéhyde P1 > peptide céto-aldéhyde P2 > peptide cétone P3.

II.2.a.2. Cinétique de la réaction de ligation suivie par HPLC pour les peptides naturels

Nous avons suivi par HPLC la cinétique de la réaction de ligation entre les peptides naturels (tableau 6), en excès, et le peptide aminooxy selon le même mode opératoire que pour les

peptides modèles P1-P3. Des exemples de chromatogrammes à $t_0=4$ min et $t= 2h30$ sont montrés respectivement figures 18 et 19.



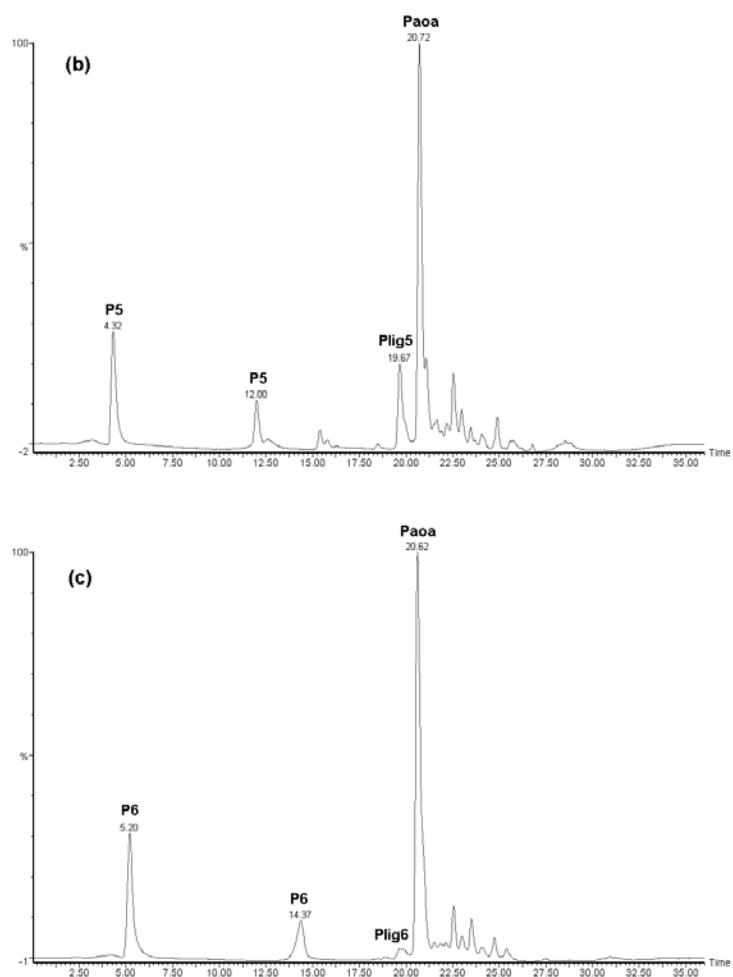
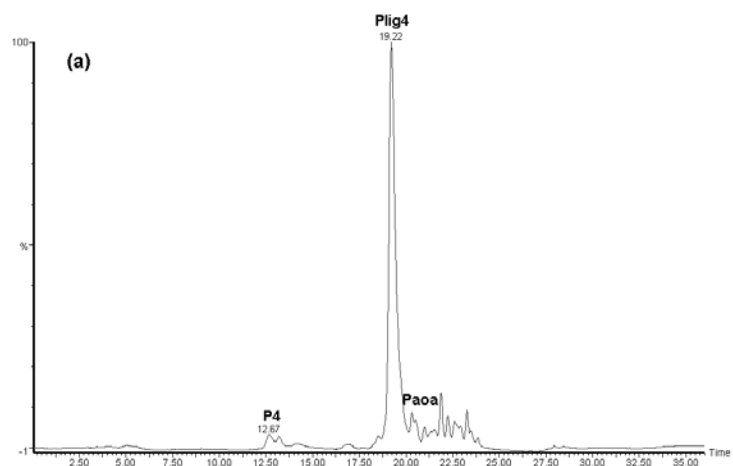


Figure 18 : Chromatogrammes représentant réaction de ligation entre les **peptides P4 (a), P5 (b) et P6 (c)** avec le peptide aminooxy à $t_0 = 4$ min.

La réaction est effectuée dans un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,6, à 25°C. Le solvant A est H₂O+0,1% TFA et le solvant B est acétonitrile + 0,1% TFA. Le gradient est de 10 à 30% de B en 20 min, 30 à 100 % de B en 3 min, 100 à 10 % de B en 3 min puis 10% de B pendant 10 min. La détection est effectuée à 280 nm.



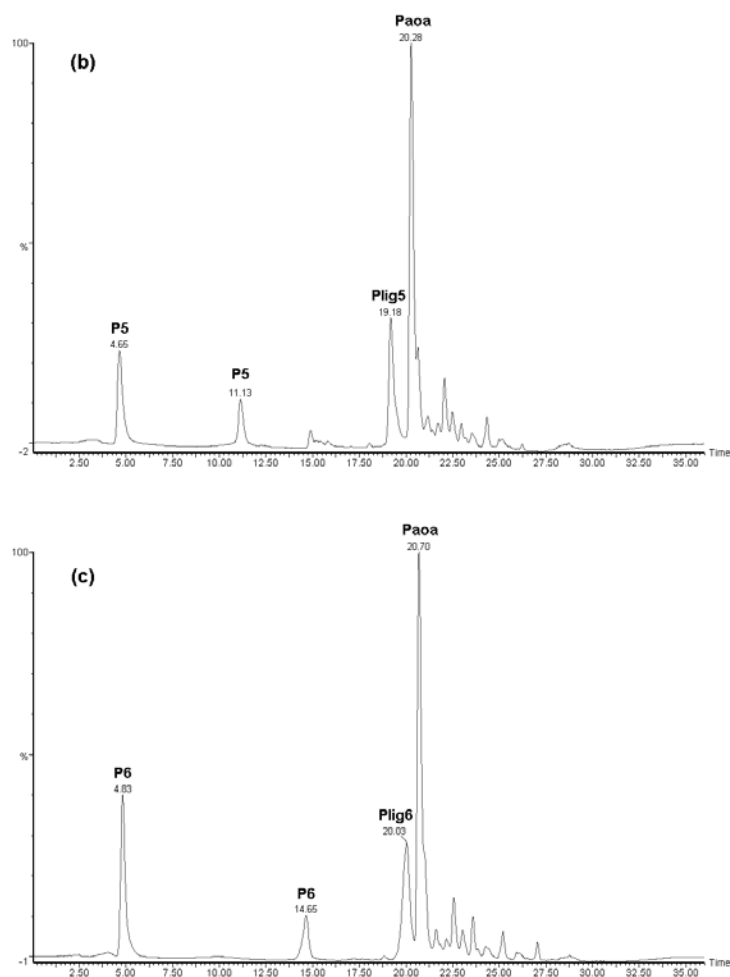


Figure 19 : Chromatogrammes représentant réaction de ligation entre les **peptides P4 (a), P5 (b) et P6 (c)** avec le peptide aminooxy à **t= 2h30**.

La réaction est effectuée dans un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,6, à 25°C. Le solvant A est H₂O+0,1% TFA et le solvant B est acétonitrile + 0,1% TFA. Le gradient est de 10 à 30% de B en 20 min, 30 à 100 % de B en 3 min, 100 à 10 % de B en 3 min puis 10% de B pendant 10 min. La détection est effectuée à 280 nm.

La cinétique d'apparition du produit de ligation est reportée figure 20.

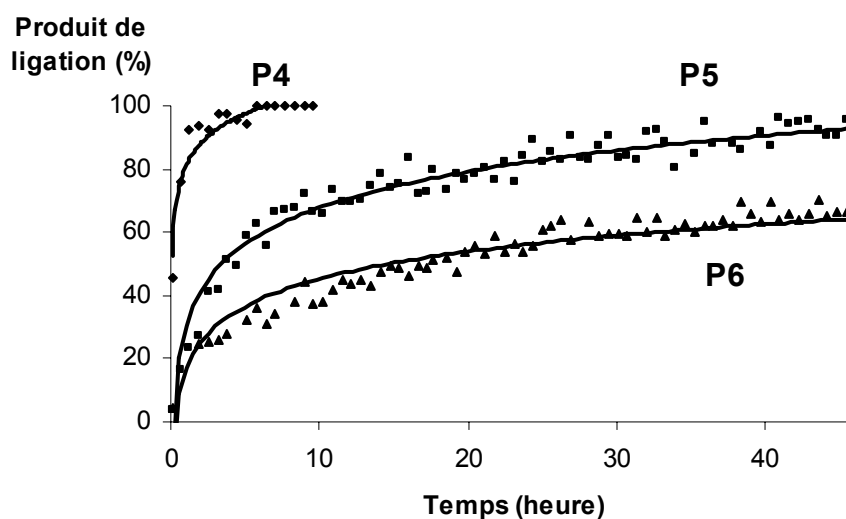


Figure 20 : Cinétique de la réaction de ligation des trois peptides **P4**, **P5** et **P6** avec le peptide aminooxy **Paoa**.

D'après la figure 20, 50% du produit de ligation avec le peptide P4 est obtenu quasiment immédiatement alors qu'au temps t_0 , environ 4% de produit de ligation sont formés pour P5 et P6. 100% du produit de ligation est obtenu au bout d'environ 6h avec le peptide P4 et 41h avec P5 alors qu'avec P6, nous obtenons 60% du produit de ligation au bout de 48h. Nous confirmons la forte réactivité pour le peptide aminooxy du peptide méthyl-aldéhyde. Le peptide méthyl-aldéhyde P4 est plus réactif que le peptide céto-aldéhyde, surtout en début de réaction. L'ordre de réactivité est le suivant: peptide méthyl-aldéhyde P4 > peptide céto-aldéhyde P5 > peptide cétone P6. Nous obtenons le même ordre de réactivité qu'avec les peptides modèles.

II.2.b. Discussion

La première étape de la réaction de ligation (schéma 4) correspond à une addition nucléophile sur le groupe carbonyle et à la protonation de l'oxygène induisant la formation d'une forme tétrahédrique carbinolamine et la deuxième étape correspond à la protonation de l'hydroxyle de cette forme tétrahédrique suivie du départ d'une molécule d'eau pour conduire à la formation de l'oxime (schéma 5). Il est tentant de vouloir extrapoler au comportement de cette carbinolamine, qu'on ne peut pas isoler, celui de la forme tétrahédrique diol qui résulte de l'hydratation des aldéhyde et des cétone.

Comme nous avons obtenu le même comportement pour les deux séries de peptides aldéhyde et cétone concernant leur hydratation et leur réactivité par rapport à Paoa, nous allons raisonner de façon générale en nommant nos peptides P1 et P4, P2 et P5, P3 et P6, respectivement peptides méthyl-aldéhyde, céto-aldéhyde et cétone. On rappelle que le taux d'hydratation des peptides aldéhyde et cétone en solution a été déterminé par RMN (hydratation des peptides: peptide céto-aldéhyde > peptide méthyl-aldéhyde >> peptide

cétone) et que la fragmentation dans la source de ces peptides a apporté des informations complémentaires.

Nous avons noté que, lors de l'étude par ESI des peptides modèles, la seconde perte d'eau due à une attaque nucléophile d'une amine sur le carbonyl fonctionnel était très retardée pour le peptide cétone par rapport aux peptides aldéhyde. Ceci a été confirmé par le comportement en solution de ces peptides montrant que le peptide cétone était le plus résistant à la cyclisation intramoléculaire par attaque nucléophile d'une amine. Nous avons également observé par RMN que les peptides cétone s'hydratent peu suggérant que l'attaque nucléophile de l'eau sur le carbonyl ne soit pas favorisée. De plus, la réaction d'oximation est plus lente pour les peptides cétone que pour les peptides aldéhyde. L'ensemble de ces différentes observations indique que l'addition nucléophile de l'eau ou d'une amine sur une cétone est plus difficile que sur un aldéhyde. En effet, le carbone fonctionnel d'une cétone est moins accessible que celui d'un aldéhyde en raison de l'encombrement stérique. Si on applique cette observation à la première étape de la réaction d'oximation, on peut raisonnablement en déduire que le peptide cétone est peu réactif vis-à-vis de l'attaque du nucléophile $\text{H}_2\text{N-O-}$. Ainsi, la première étape de la réaction de ligation semble être l'étape limitante pour les peptides cétone.

Dans le cas des peptides aldéhyde, le céto-aldéhyde est légèrement plus hydraté en solution que le méthyl-aldéhyde. Dans la première étape de la réaction de ligation, l'addition nucléophile est conditionnée par l'électrophilie du carbone fonctionnel (schéma 4). Le carbone fonctionnel d'un céto-aldéhyde est plus électrophile que le carbone fonctionnel d'un méthyl-aldéhyde, en raison de l'effet attracteur du carbonyl en α du carbone fonctionnel du céto-aldéhyde et de l'effet inducteur du méthyl en α du carbone fonctionnel du méthyl-aldéhyde (schéma 6).

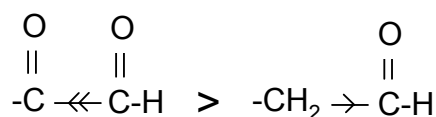


Schéma 6 : Electrophilie du carbone fonctionnel.

Si ces effets électroniques peuvent expliquer l'hydratation d'un céto-aldéhyde légèrement plus importante que celle d'un méthyl-aldéhyde, il semble qu'ils n'entrent pas en jeu dans la première étape de la réaction d'oximation puisqu'on observe un ordre de réactivité inverse. Cette observation est en accord avec les études de Sayer et coll. [1974] qui proposent que la vitesse de formation d'une liaison oxime n'est pas sous la dépendance de l'électrophilie du carbonyle.

Nous allons alors raisonner sur la deuxième étape de la réaction de ligation (schéma 5) qui correspond à la protonation de l'hydroxyle, puis à la déshydratation induisant la formation de l'oxime. Cette étape semble conditionnée par la protonation de l'oxygène de la fonction hydroxyle (schéma 5). L'effet attracteur du carbonyle en α du carbone fonctionnel du céto-aldéhyde rend cet oxygène moins basique que celui du méthyl-aldéhyde dont l'effet inducteur du méthyl en α du carbone fonctionnel augmente la basicité (schéma 7).

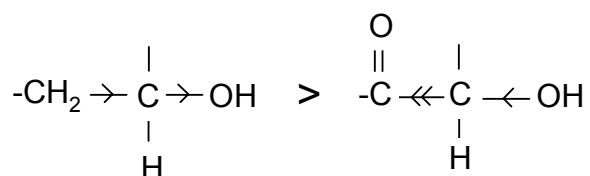


Schéma 7 : Basicité de l'oxygène de la fonction hydroxyle.

L'oxygène de la fonction hydroxyle étant plus basique pour le méthyl-aldéhyde que pour le céto-aldéhyde, il devrait lui être plus facile de capter un proton présent dans le milieu de

réaction ce qui faciliterait l'élimination de la molécule d'eau. Or nous avons vu qu'en phase gazeuse, la forme hydratée du peptide méthyl-aldéhyde est moins stable que la forme hydratée du peptide céto-aldéhyde. Par analogie, nous pouvons penser qu'en solution, l'élimination d'une molécule d'eau de la carbinolamine issue du peptide méthyl-aldéhyde serait plus facile que de celle issue du peptide céto-aldéhyde. Cette hypothèse pourrait expliquer la raison pour laquelle la réaction d'oximation est plus rapide avec les peptides méthyl-aldéhyde qu'avec les peptides céto-aldéhyde, et que pour ces peptides aldéhyde, c'est la deuxième étape de la réaction d'oximation qui est déterminante.

II.2.c. Conclusion

La réaction d'oximation s'effectue en deux étapes. La première étape semble être conditionnée par une addition nucléophile sur le carbonyle et la deuxième par la protonation de l'hydroxyle de la forme tétrahédrique.

La première étape de la réaction de ligation semble être l'étape limitante pour les peptides cétone. Ces peptides sont les peptides les moins réactifs vis-à-vis d'un peptide aminooxy, certainement du fait de l'encombrement stérique de la fonction carbonyle qui empêcherait l'attaque du nucléophile $\text{H}_2\text{N-O-}$.

Dans le cas des peptides aldéhyde, l'hydratation d'un céto-aldéhyde est légèrement supérieure à celle d'un méthyl-aldéhyde. Le carbone fonctionnel d'un céto-aldéhyde étant plus électrophile que le carbone fonctionnel d'un méthyl-aldéhyde, l'attaque nucléophile de l'eau serait favorisée dans le cas des céto-aldéhyde. Cependant, ces effets électroniques n'expliquent pas les résultats observés lors de la cinétique de la réaction de ligation, i.e. méthyl-aldéhyde > céto-aldéhyde.

La basicité de l'oxygène de la fonction hydroxyle semble jouer un rôle dans la formation de l'oxime. Le fait qu'elle soit plus importante pour le méthyl-aldéhyde que pour le céto-aldéhyde devrait expliquer que la réaction d'oximation est plus rapide avec les peptides

méthyl-aldéhyde qu'avec les peptides céto-aldéhyde. Ainsi, la deuxième étape de la réaction de ligation serait déterminante.

Chapitre IV : Fragmentation dans la source électrospray d'oligodésoxynucléotides bromés

Nous avons réalisé une dernière étude de fragmentation dans la source mais, cette fois-ci, en mode négatif. Elle porte sur des oligodésoxynucléotides bromés dont la fragmentation principale correspond à la perte de la base bromée.

Même si la fragmentation par spectrométrie de masse des oligonucléotides est beaucoup moins développée que celle des peptides, de nombreuses études concernant les mécanismes de fragmentation ont été publiées [Mc Luckey et Habibi-Goudarzi 1993, Wan et coll. 2001, Wan et Gross 2001, Cerny et coll. 1986, Mc Luckey et coll. 1995] avec un intérêt croissant pour l'étude d'oligonucléotide comportant des nucléobases modifiées. Marzilli et coll. [1999] et Mc Luckey et Habibi-Goudarzi [1994] ont montré l'influence de la localisation d'une base méthylée sur la fragmentation. Bien que les oligodésoxynucléotides (ODNs) halogénés soient communément utilisés en cristallographie pour faciliter la résolution tridimensionnelle par radiocristallographie, le seul article existant sur le comportement de la fragmentation par ESI-MS des ODNs contenant une base halogénée concerne un ODN iodé [Barry et coll. 1995].

I. Présentation des oligodésoxynucléotides

Notre séquence d'intérêt est un oligodésoxynucléotide dibromé 13-mer 5'-d(CBrUCTTTGTTTCBrUC)-3' (série 0, tableau 1) choisi pour déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine Fpg (Formamidopyrimidine-DNA glycosylase) en complexe. Ce complexe a été étudié, en cristallographie, par la technique MAD (dispersion anormale par multi-longueur d'ondes) mais sans succès en raison de l'absence de signal d'un des deux

bromes. L'intégrité de la séquence de cet oligodésoxynucléotide a été établie par spectrométrie de masse en mode négatif mais seulement à une très faible tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (-15V) (figure 1a). Habituellement, dans notre laboratoire, la masse des oligonucléotides est déterminée sans fragmentation à des valeurs de Vc de l'ordre de -25 à -30V. Or, dans le cas présent, à Vc=-25V, cet ODN se fragmente en perdant une première base bromée (figure 1b) puis à Vc=-35V, une seconde base bromée (figure 1c).

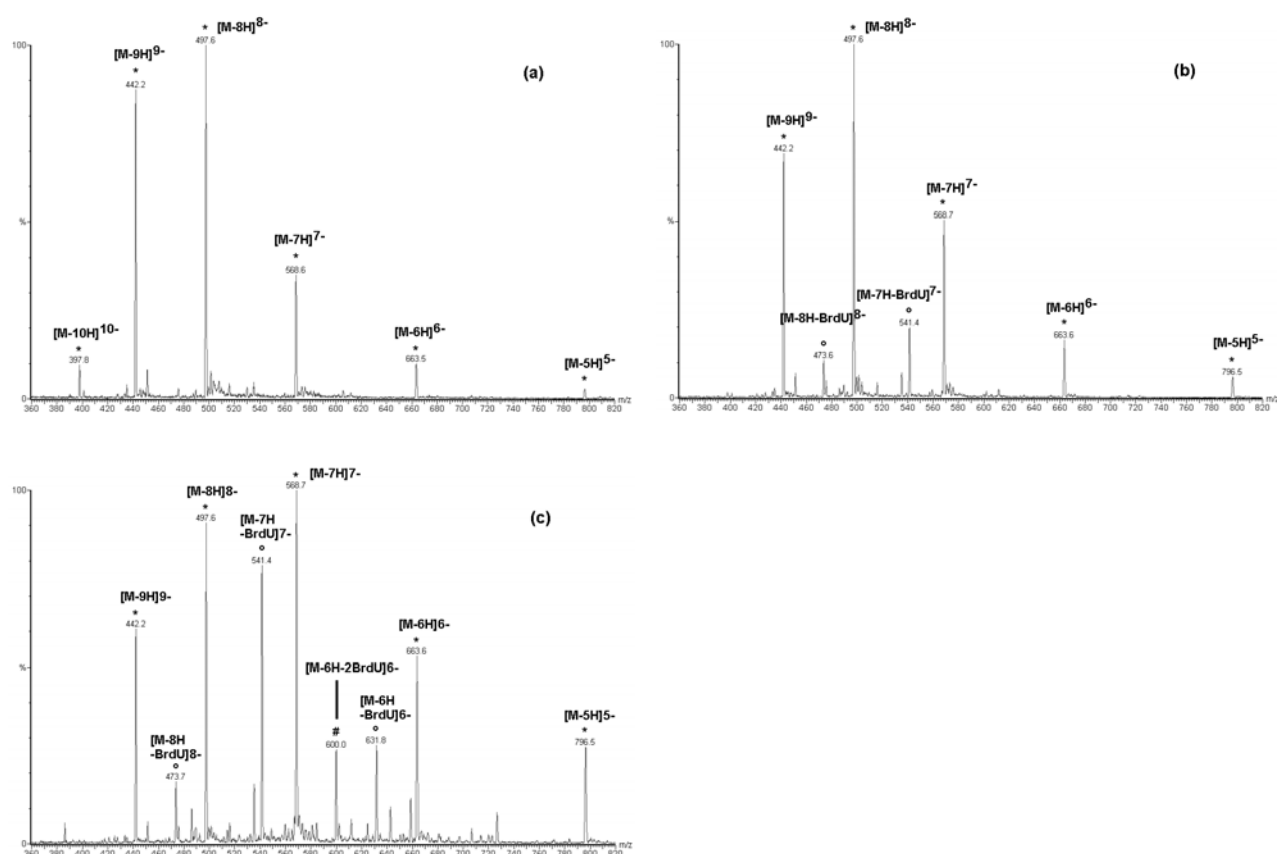


Figure 1 : Spectres de masse en mode négatif non montrés dans la publication correspondant à l'oligodésoxynucléotide dibromé de la série 0 à Vc=-15V (a), -25V (b) et -35V (c).

Les * correspondent aux ions de l'ODN étudié, ° aux ions de l'ODN ayant perdu une base bromée et # aux ions de l'ODN ayant perdu deux bases bromées.

Comme la fragmentation de cet ODN était précoce et inattendue, nous avons étudié le comportement de plusieurs ODNs monobromés (tableau 1) en faisant varier la valeur de Vc de -90V à -10V. Nous avons choisi les ODNs des séries 1 et 2 pour étudier l'influence de la

nature de la base pyrimidine bromée, 5-bromodésoxyuridine (BrdU) et 5-bromodésoxycytidine (BrdC), et les ODNs de la série 3 pour montrer l'influence de la position de la base bromée sur la fragmentation. La séquence de ces oligodésoxynucléotides est la plus proche possible de la séquence initiale (série 0). Toute l'étude a été réalisée en mode négatif et les valeurs de Vc seront exprimées en valeur relative dans la suite de ce mémoire.

Tableau 1 : Séries des oligodésoxynucléotides 13-mer étudiés

Séries	Séquence	Masse expérimentale (Da)
0	5'-d(CBrUCTTTGTTTCBrUC)-3'	3987,3
1	5'-d(CBrUCTTTGTTTCUC)-3'	3908,4
	5'-d(CUCTTTGTTTCBrUC)-3'	3908,4
2	5'-d(CBrCCTTTGTTTCUC)-3'	3907,4
	5'-d(CUCTTTGTTTCBrCC)-3'	3907,4
3	5'-d(BrUTCTTTGTTTCTC)-3'	3937,5
	5'-d(CBrUCTTTGTTTCTC)-3'	3922,4
	5'-d(CTCBrUTTGTTCCTC)-3'	3922,4
	5'-d(CTCTTBrUGTTTCTC)-3'	3922,4
	5'-d(CTCTTTGBrUTTCTC)-3'	3922,4
	5'-d(CTCTTTGTTBrUCTC)-3'	3922,4
	5'-d(CTCTTTGTTTCBrUC)-3'	3922,4
	5'-d(CTCTTTGTTTCTBrU)-3'	3937,5

II. Publication

Les arguments, ainsi que les résultats que nous avons obtenus, sont développés dans l'article: 'Fragmentation of brominated oligodeoxynucleotides by in-source collision-induced dissociation' (joint page suivante).

'Fragmentation of brominated oligodeoxynucleotides by in-source collision-induced dissociation'

Corinne Buré, Bertrand Castaing, Catherine Lange and Agnès Delmas

Fragmentation of brominated oligodeoxynucleotides by in-source Collision-Induced Dissociation

Corinne Buré*, Bertrand Castaing, Catherine Lange[†], Agnès Delmas*

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301[#], rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France

[†] Spectrométrie de Masse Bio-organique, CNRS-UMR 6014, Université de Rouen, (F) 76821 Mont Saint Aignan cedex

* Authors for correspondence.

e-mail: bure@cnrs-orleans.fr; delmas@cnrs-orleans.fr

Tel: 33 2 38 25 54 57

Fax: 33 2 38 63 15 17

[#] affiliated with the University of Orléans and INSERM

Abstract

Bromine-modified oligodeoxynucleotides (ODNs) were fragmented in the electrospray source to study the influence of brominated bases on fragmentation. Several 13-mer ODNs containing a brominated pyrimidine base, BrdU (5-Bromodeoxyuridine) or BrdC (5-Bromodeoxycytidine), were analysed. Low cone voltage fragmentation yields a loss of the brominated base with a preferential loss for the modified base closed to the 5' end (2-position>4-position>12-position) as well a preferential loss of BrdU over BrdC. Higher cone voltage produce backbone fragmentation with complementary a_n -Base and w_m ions close to the modified base. Based on these observations, we located the brominated base in the sequence for all of the ODNs studied.

Introduction

Over the last ten years, the analysis of oligodeoxynucleotides (ODNs) by mass spectrometry (MS) has been widely developed. Electrospray ionization (ESI) has been shown to be effective in forming multiply charged ions from oligonucleotides enabling accurate mass measurement [1]. Furthermore, fragmentation of these multiply-charged ions leads to structurally diagnostic fragments. Mc Luckey and Habibi-Goudarzi established a nomenclature and some rules of decomposition to facilitate the interpretation of mass spectra [2]. They demonstrated that multiply-charged oligodeoxynucleotide anions fragment first by loss of a nucleobase, the order of preference being A>T>G, C for highly charged anions [2]. This loss is followed by the cleavage of the 3' C-O bond of the sugar from which the base was lost. The resulting ions are then the (a_n -Base) ions corresponding to the 5'-side of the oligonucleotide and their complementary w_m ions indicating the 3'-side [2,3].

Even if the fragmentation of oligonucleotide by mass spectrometry has been much less developed than that of peptides, numerous studies have been published concerning the mechanisms of fragmentation [2,4-7], with special focus on the effect of the charge state on fragmentation [2,7,8]. Moreover, there is an increasing interest in the study of nucleobase-modified oligonucleotides by mass spectrometry. The influence of the location of the modified base on the fragmentation has been shown [9,10] as well as the effect of the charge state of the studied ion [11,12]. Methylated ODNs [9,10], modifications resulting from an oxidative process [12,13] as well as ODNs modified with a nucleobase carrying an electron withdrawing group [11] have been examined. Although halogenated ODNs, with a preference for brominated derivatives, are commonly used in crystallography for structure determination using the multi-wavelength anomalous dispersion (MAD) technique [14], the only existing report on the fragmentation behavior of ODNs containing a halogenated-modified base by ESI-MS concerns an iodo-modified ODN [11].

Here we report the influence of the nature and location of a brominated base on the loss of the modified base, and on the fragmentation of the phosphodiester backbone. We show that the location of the brominated base in the ODN sequence can be determined by in-source collision-induced dissociation (CID).

EXPERIMENTAL

Materials

All oligodeoxynucleotides (Table 1) were purchased from Eurogentec (Herstal, Belgium) and were used without further purification. The modified nucleic acid bases are 5-Bromodeoxyuridine (BrdU) and 5-Bromodeoxycytidine (BrdC).

Water was purified in-house using a Milli-Q-System (Millipore water). Acetonitrile was obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and triethylamine from Sigma Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France).

Mass spectrometry (MS)

Analyses were performed in negative ion mode on a triple quadrupole mass spectrometer (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) equipped with a nebulizer assisted electrospray source. The high-flow nebulizer was operated in standard mode with N₂ as both nebulizing (20 L/h) and drying (250 L/h) gas. A voltage difference of 3 kV was applied between the capillary and the counter electrode. The ion source was kept at 80°C. Instrument control and data analysis were accomplished using Masslynx application software, version 3.4, from Micromass (Manchester, UK).

In-source CID mass spectra were obtained by increasing the sample cone voltage (V_c) from -90 to -10 V in 5-V increments. Each oligodeoxynucleotide was dissolved in 80/20 acetonitrile/water + 0,1% triethylamine at a concentration of 5 pmol/μL. MS experiments were achieved from the injection of 3 μL of this solution into a Rheodyne 7125 injection valve with a 10 μL sample loop. The compound was eluted into the mass spectrometer using 80/20 acetonitrile/water as mobile phase delivered by an isocratic LC-10AD pump (Shimadzu, Les Ulis, France) at a 20 μL/min flow rate. Results are presented as breakdown graphs which represent the percentage of the fragment ions expressed as a function of the sample cone voltage. The experimental errors were evaluated to be 5 %. The percentage of the fragment ions is calculated as the ratio between the sum of the intensities of the ions resulting

from the sole loss of the brominated base of the oligodeoxynucleotide studied ($[M-zH-BrdX]^{z-}$ with z being the charge state and X being a base) and the sum of the intensities of the molecular ions ($[M-zH]^{z-}$), multiplied by 100. The corresponding equation is the following one:

$$\% \text{ fragment ions} = \frac{\sum \text{intensities of the ions corresponding to the loss of the BrdU base from the oligodeoxynucleotide studied}}{\sum \text{intensities of the ions corresponding to the oligodeoxynucleotide studied}} \times 100, \text{ i.e from figure}$$

$$1c-d : \% \text{ fragment ions} = \frac{\sum \text{fragment ions marked } (^\circ)}{\sum \text{molecular ions marked } (*)} \times 100$$

RESULTS AND DISCUSSION

This work was initiated during the determination of the three-dimensional structure of the Fpg (Formamidopyrimidine-DNA glycosylase) protein using, as a first approach, a complex with the dibrominated oligodeoxynucleotide 5'-d(CBrUCTTTGTTTCBrUC)-3' to take advantage of the MAD technique in crystallography. The integrity of the dibrominated ODN sequence was unambiguously established by negative ESI-MS, but only at low cone voltage. As already observed [15], partial debromination induced by X-ray prevented structure determination, which was subsequently resolved using a selenomethionylated Fpg mutant [16].

Selective loss of the brominated base located at the 2-position of the 5'-side versus 3'-side

The partial debromination observed under X-ray prompted us to study the behaviour of brominated ODNs by negative in-source CID. Although in-source CID is not a general method to determine a compound in a mixture, it is a useful method for the fragmentation chemistry of pure compounds [17,18] such as the brominated oligodeoxynucleotides used here. For this purpose, two 13-mer oligodeoxynucleotides analogous to the dibrominated 5'-d(CBrUCTTTGTTTCBrUC)-3' but carrying only one BrdU base at the 2-position either from the 5'-side or from the 3'-side, that is 5'-d(CBrUCTTTGTTTCUC)-3' and 5'-d(CUCTTTGTTTCBrUC)-3', respectively (Table 1, series 1), were analyzed by ESI-MS. At low cone voltage (Figure 1a-b), the negative electrospray mass spectra exhibit a distribution of multiply charged molecular ions with a charge state ranging from 5 up to 9 and few adduct ions. When negative ESI mass spectra were recorded at a cone voltage of 25 V (Figure 1c-d), a new charge state distribution appears, with the m/z ratio exhibiting a Δm of -190 Da when compared to the m/z of the molecular anions. This corresponds to the loss of the BrdU base, leading to the $[M-zH-BrdU]^{z-}$ anions. The fragment anions resulting from the loss of the BrdU base are more intense for 5'-d(CBrUCTTTGTTTCUC)-3' (Figure 1c) than for 5'-d(CUCTTTGTTTCBrUC)-3' (Figure 1d). This suggests that the brominated base located at the 5'-side is preferentially lost over the brominated base located at the 3'-side.

To verify the selective loss of the brominated base at the 2-position from the 5'-side, a detailed study using in-source collision-induced dissociation (CID) was carried out. Mass spectra of the series-1 oligodeoxynucleotides were successively recorded as the cone voltage of the electrospray source was altered in 5-V increments from -10 V to -90 V. The results are expressed as breakdown graphs where the percentage of the fragment ions resulting from the loss of the brominated base is expressed as a function of the sample cone voltage (for more details, see the experimental part). Figure 2a shows that, for 5'-d(CBrUCTTTGTTTCUC)-3', the production of 10% fragment ions requires a cone voltage of 21 V whereas for 5'-d(CUCTTTGTTTCBrUC)-3', the production of 10% fragment ions requires a cone voltage of 32 V. The modified BrdU base located at the 5'-side is more easily fragmented than the one located at the 3'-side. This result is in agreement with studies showing that the loss of a base at the 3'-side is disfavored, whether it is modified [19] or not [2,20].

Order of preference of the loss of brominated pyrimidine bases

It is not yet understood why the loss of one nucleobase is favored over another, despite several studies dealing with the influence of the nature of the nucleobase on the fragmentation of ODNs [2,3,13]. Moreover, no such study exists for brominated pyrimidine (BrdU and BrdC) bases. The loss of BrdU (monobrominated ODNs of the series 1, Table 1) was compared to the loss of BrdC (monobrominated ODNs of the series 2, Table 1) (Figures 2a and 2b). At 7% of the fragment ions, the loss of the brominated base located at the 2-position from the 5'-end is observed at 20V for 5'-d(CBrUCTTTGTTTCUC)-3' (Figure 2a) and at 26V for 5'-d(CBrCCTTTGTTTCUC)-3' (Figure 2b). Likewise, the loss of the brominated base is seen at 30V for 5'-d(CUCTTTGTTTCBrUC)-3' (Figure 2a) and at 38V for 5'-d(CUCTTTGTTTCBrCC)-3' (Figure 2b) giving the same order of preference for the loss of the modified base at the 2-position from the 3'-end. These results extend those obtained above concerning the preference for the loss of the modified base at the 2-position from the 5'-end over that from the 3'-end, independent of the nature of the brominated base, BrdU or BrdC. Moreover, the order of preference for the loss of brominated pyrimidine bases resulting from these fragmentation studies is BrdU > BrdC, whether the base is located at the 2-position from the 5'-end or from the 3'-end.

Influence of the position of the brominated base on its loss

To extend our knowledge about the influence of the location of the modified base on the base loss, a third series of monobrominated oligodeoxynucleotides (Table 1), with a BrdU base every two nucleotides, was studied by in-source CID. Breakdown graphs corresponding to the loss of the BrdU base from ODNs modified at position 2, 4, 6, 8, 10 and 12 were established. Figure 3 shows that the cone voltage needed to lose the modified base is different for each modified ODNs. The more intense percentages of the fragment ions correspond to the ODN modified in position 2, 4 and 12 with a very intense curve for the 2-position. At 10% of the fragment ions, the loss of the brominated base appears at 22, 24 and 30V for the

oligodeoxynucleotides modified in position 2, 4 and 12 from the 5'-side, respectively. Note that the internal positions (6, 8 and 10) are disfavored for the loss of the modified base. This study indicates that the position of the modified base plays an important part in fragmentation with the more favorable positions for the loss of the modified base being located at the 5' and 3' termini with the following order: 2-position > 4-position > 12-position.

Identification of the position of the brominated base

Mc Luckey et al [2,3] have shown that the loss of the nucleobase is followed by cleavage at the 3' C-O bond of the sugar from which the base was lost leading to the (a_n-B_n) ions and their complementary w_m ions (scheme 1). To study the backbone fragmentation of the monobrominated oligodeoxynucleotides of the series 3 (Table 1), mass spectra were recorded at a cone voltage permitting the backbone fragmentation in the source. Figure 4 represents the ESI mass spectrum of the oligodeoxynucleotide 5'-d(CBrUCTTTGTTTCTC)-3' obtained at a cone voltage of 45 V. The backbone fragmentation of the oligodeoxynucleotide, whose base at the 2-position is modified, essentially provides the $(a_2-BrdU)^-$ and w_{11}^{z-} ions (Scheme 1), z being the charge state ranging from 4 to 7. These ions are characteristic of the backbone fragmentation resulting from the loss of the modified base in position 2. All 13-mer oligodeoxynucleotides of series 3 fragment in the same way.

The pair of complementary ions $(a_n-B_n)/w_{13-n}$, which appears at high cone voltage, is indicative of the location of the brominated base at the n -position. Other chemical modifications at nucleobases can weaken the glycosidic linkage and facilitate base loss, inducing backbone cleavage [9-11]. Barry et al. reported that ODNs modified with a nucleobase carrying an electron withdrawing group show a strong tendency for the loss of the modified nucleobase [11]. Mc Luckey and Habibi-Goudarzi [10] compared two isomeric hexamers 5'-d(N-6meATGCAT)-3' and 5'-d(ATG5meCAT)-3', and found that the methylated base can be identified, but only the methylated adenine can be located in the sequence. Likewise, Marzilli et al [9] determined the position of all methylated guanines in oligodeoxynucleotides by MS^3 with an ion trap instrument. In the present work, we were able to locate the brominated base in a 13-mer oligodeoxynucleotide sequence by exploiting in-

source CID, the simplest and the most readily implemented method of activation, without requiring a tandem mass spectrometer [18].

CONCLUSIONS

Monobrominated 13-mer ODNs were studied by ESI in-source fragmentation. At low cone voltage only, mass spectrometry experiments established the integrity of the brominated ODNs. At medium cone voltage, the major fragmentation of ODNs modified by BrdU at various positions corresponds to the loss of the modified pyrimidine base. This loss is preferential when the base is located at the 2-position from the 5'-side instead of the 2-position from the 3'-side, the internal positions being unfavorable for base loss. By comparing brominated ODNs containing a BrdC base with brominated ODNs containing a BrdU base, a classification of the loss of some pyrimidine bases has been established, $\text{BrdU} > \text{BrdC}$, the modified base being located at the 2-position either from the 5'-end or from the 3'-end. In-source CID experiments allow the location of the modified base in the sequence using high cone voltage to fragment backbone, with the production of major fragment ions which are the ($a_n\text{-B}$) and w_m complementary ions close to the modified base.

Acknowledgements

Corinne Buré and Bertrand Castaing would like to acknowledge Laurence Serre for helpful discussion about X-ray crystallography. The authors thank Martine Cadène for a careful reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Covey, T.R.; Bonner, R.F.; Shushan, B.I.; Henion, J. The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988, 2, 249-256.
2. Mc Luckey, S.A.; Habibi-Goudarzi, S. Decompositions of multiply charged oligonucleotide anions. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 12085-12095.
3. Mc Luckey, S.A.; Van Berkel, G.J.; Glish, G.L. Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1992, 3, 60-70.
4. Wan, K.X.; Gross, J.; Hillenkamp, F.; Gross, M.L. Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides studied by H/D exchange and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001, 12, 193-205.
5. Wan, K.X.; Gross, M.L. Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides: effects of replacing phosphates with methylphosphonates and thymines with other bases in T-rich sequences. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001, 12, 580-589.
6. Cerny, R.L.; Gross, M.L.; Grotjahn, L. Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the study of dinucleotides. *Anal. Biochem.* 1986, 156, 424-435.
7. Mc Luckey, S.A.; Vaidyanathan, G.; Habibi-Goudarzi, S. Charged vs. neutral nucleobase loss from multiply charged oligonucleotide anions. *J. Mass Spectrom.* 1995, 30, 1222-1229.
8. Premstaller, A.; Huber, C.G. Factors determining the performance of triple quadrupole, quadrupole ion trap and sector field mass spectrometer in electrospray ionization mass spectrometry. 2. Suitability for de novo sequencing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001, 15, 1053-1060.
9. Marzilli, L.A.; Barry, J.P.; Sells, T.; Law, S.-J.; Vouros, P.; Harsch, A. Oligonucleotide sequencing using guanine-specific methylation and electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1999, 34, 276-280.

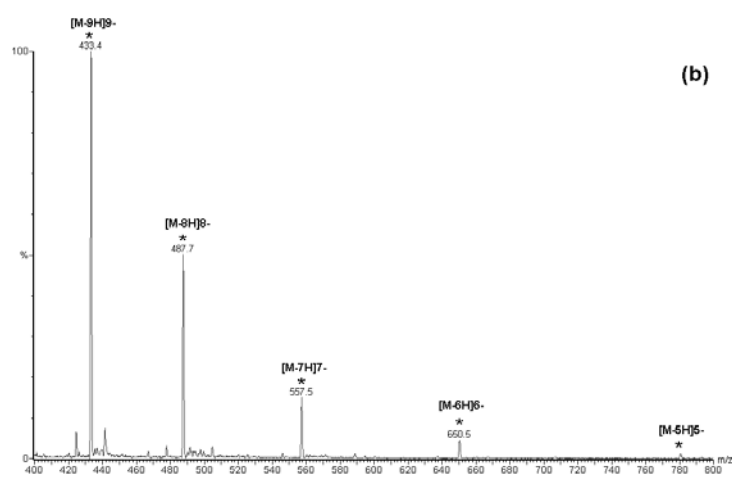
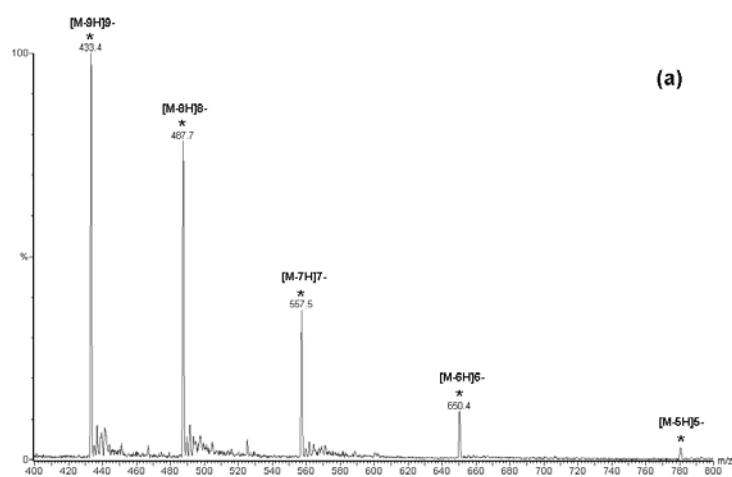
10. Mc Luckey, S.A.; Habibi-Goudarzi, S. Ion trap tandem mass spectrometry applied to small multiply charged oligonucleotides with a modified base. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1994, 5, 740-747.
11. Barry, J.P.; Vouros, P.; Schepdael, A.V.; Law, S.-J. Mass and sequence verification of modified oligonucleotides using electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1995, 30, 993-1006.
12. Wang, Y.; Men, L.; Vivekananda, S. Fragmentation of deprotonated ions of oligodeoxynucleotides carrying a 5-formyluracil or 2-aminoimidazolone. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2002, 13, 1190-1194.
13. Luo, H.; Lipton, M.S.; Smith, R.D. Charge effects for differentiation of oligodeoxynucleotide isomers containing 8-oxo-dG residues. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2002, 13, 195-199.
14. Correll, C.C.; Freeborn, B.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. Use of chemically modified nucleotides to determine a 62-nucleotide RNA crystal structure: a survey of phosphorothioates, Br, Pt and Hg. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1997, 15, 165-172.
15. Ennifar, E.; Carpentier, P.; Ferrer, J.-L.; Walter, P.; Dumas, P. X-ray-induced debromination of nucleic acids at the Br K absorption edge and implications for MAD phasing. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2002, 58, 1262-1268.
16. Serre, L.; Pereira de Jesus, K.; Boiteux, S.; Zelwer, C.; Castaing, B. Crystal structure of the *Lactococcus lactis* formamidopyrimidine-DNA glycosylase bound to an abasic site analogue-containing DNA. *EMBO J.* 2002, 21, 2854-2865.
17. Buré, C.; Le Falher, G.; Lange, C.; Delmas, A. Fragmentation study of peptide acetals and aldehydes using in-source collision-induced dissociation. *J. Mass Spectrom.* 2004, 39, 817-823.
18. Wang, Z.; Wan, K.X.; Ramanathan, R.; Taylor, J.S.; Gross, M.L. Structure and fragmentation mechanisms of isomeric T-rich oligodeoxynucleotides: A comparison of four tandem mass spectrometric methods. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 9, 683-691.

19. Crain, P.F.; Gregson, J.M.; Mc Closkey, J.A.; Nelson, C.C.; Peltier, J.M.; Phillips, D.R.; Pomerantz, S.C.; Reddy, D.M., Characterization of posttranscriptional modification in nucleic acids by tandem mass spectrometry. In *Mass Spectrometry in the Biological Sciences*, Burlingame, A.L.; Carr, S.A., Eds.; Humana Press: Totawa, NJ, 1996; p. 497.
20. Little, D.P.; Mc Lafferty, F.W. Sequencing 50-mer DNAs using electrospray tandem mass spectrometry and complementary fragmentation methods. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 6783-6784.

Table 1. Series of 13-mer oligodeoxynucleotides studied.

series	sequence	experimental mass (Da) ^a	calculated mass (Da) ^a
1	5'-d(CBrUCTTTGTTTCUC)-3'	3908.4	3908.7
	5'-d(CUCTTTGTTTCBrUC)-3'	3908.4	3909.0
2	5'-d(CBrCCTTTGTTTCUC)-3'	3907.4	3907.8
	5'-d(CUCTTTGTTTCBrCC)-3'	3907.4	3907.8
3	5'-d(CBrUCTTTGTTTCTC)-3'	3922.4	3922.7
	5'-d(CTCBrUTTGTTCCTC)-3'	3922.4	3922.9
	5'-d(CTCTTBrUGTTTCTC)-3'	3922.4	3922.9
	5'-d(CTCTTTGBrUTTCTC)-3'	3922.4	3923.1
	5'-d(CTCTTTGTTBrUCTC)-3'	3922.4	3923.0
	5'-d(CTCTTTGTTTCBrUC)-3'	3922.4	3923.1

a: average mass



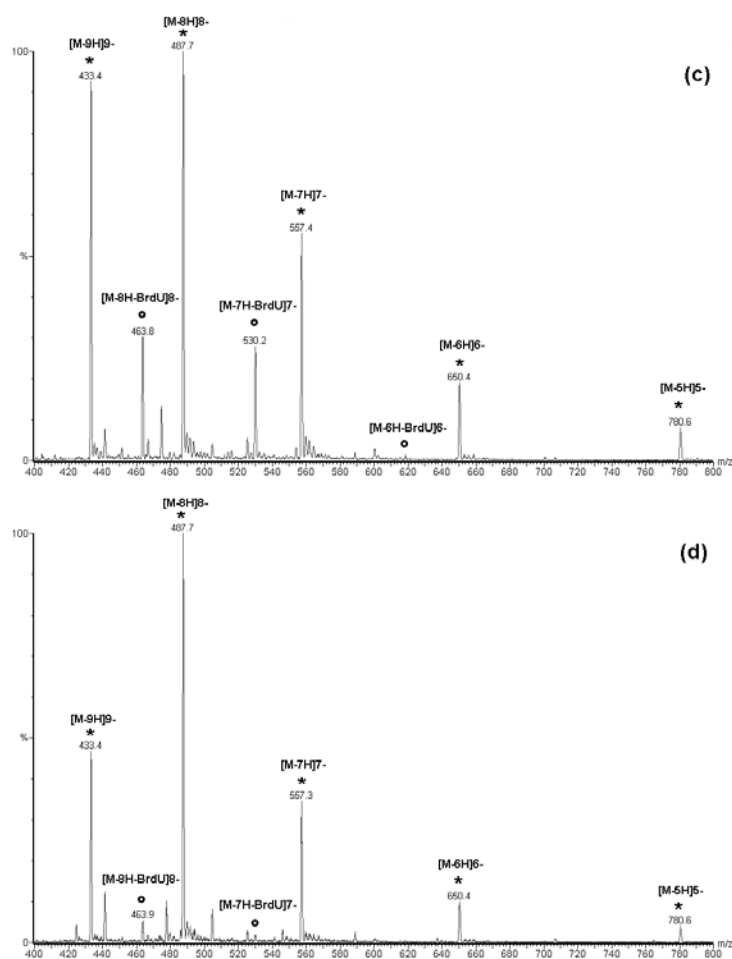


Figure 1. Low cone voltage ESI-MS analysis of ODNs brominated at position 2 from 5' or 3' end.

ESI mass spectra obtained at $V_c = 15$ V for (a) 5'-d(CBrUCTTTGTTTCUC)-3' and (b) 5'-d(CUCTTTGTTTCBrUC)-3' and ESI mass spectra obtained at $V_c = 25$ V for (c) 5'-d(CBrUCTTTGTTTCUC)-3' and (d) 5'-d(CUCTTTGTTTCBrUC)-3'.

(*) indicates the mass-to-charge ratios of the ions corresponding to the oligodeoxynucleotide studied. (°) represents the loss of the BrdU base from this oligodeoxynucleotide.

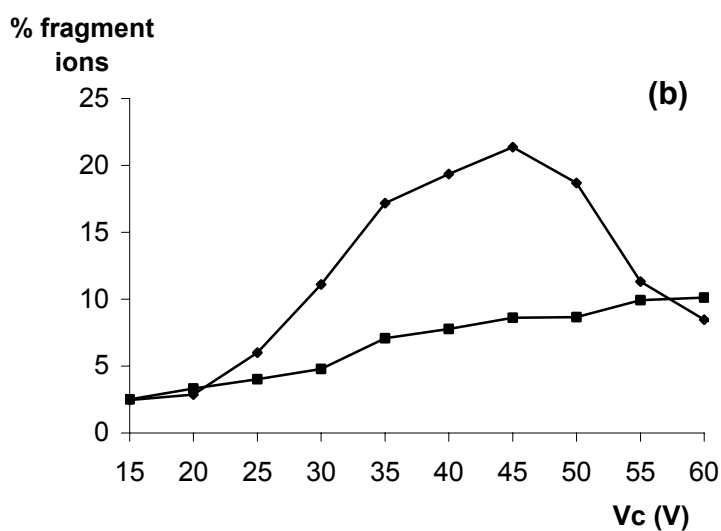
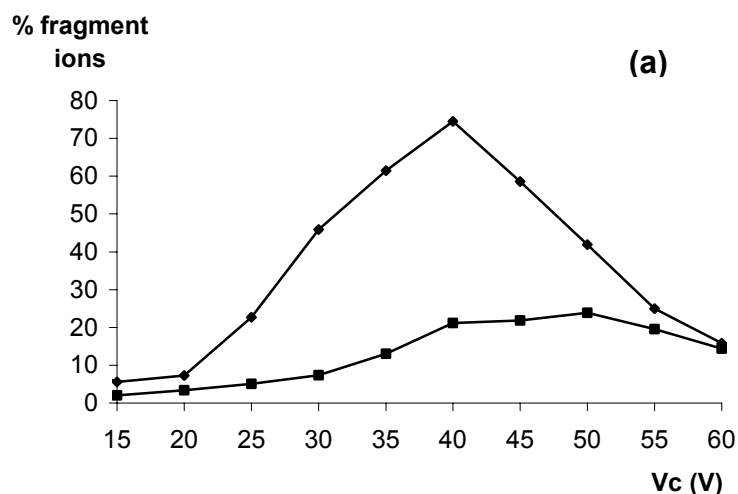


Figure 2. In-source fragmentation of ODNs brominated at position 2 from 5' or 3' end as a function of the cone voltage.

(a) loss of one BrdU base from the oligodeoxynucleotide M: (□) 5'-d(CBrUCTTTGTTTCUC)-3' and (■) 5'-d(CUCTTTGTTTCBrUC)-3' and (b) loss of the BrdC base from the oligodeoxynucleotides M: (□) 5'-d(CBrCCTTTGTTTCUC)-3' and (■) 5'-d(CUCTTTGTTTCBrCC)-3'.

For details in the calculation of % fragment ions ($[M-zH-BrdU]^z$ in (a) and $[M-zH-BrdC]^z$ in (b), see the experimental part.

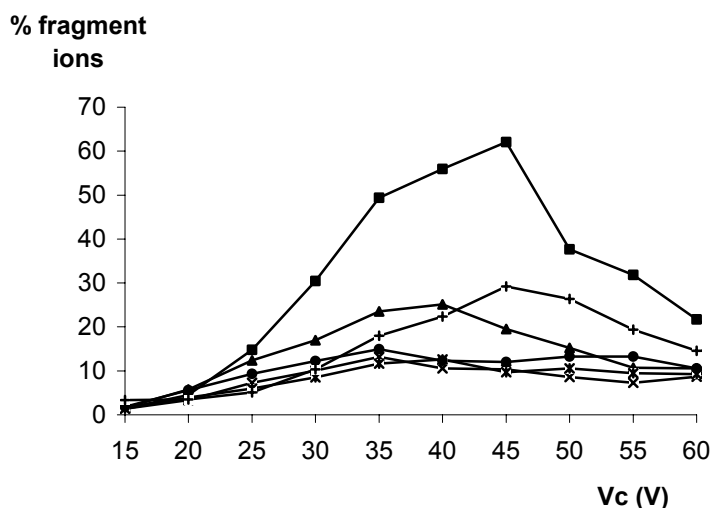


Figure 3. In-source fragmentation of ODNs brominated at position 2, 4, 6, 8, 10 or 12 as a function of the cone voltage.

Loss of the BrdU base from the oligodeoxynucleotide M: (■) 5'-d(CBrUCTTTGTTTCTC)-3', (▲) 5'-d(CTCBrUTTGTTC)-3', (x) 5'-d(CTCTTBrUGTTTCTC)-3', (*) 5'-d(CTCTTTGBrUTTCTC)-3', (●) 5'-d(CTCTTTGTTCBrUCTC)-3' and (+) 5'-d(CTCTTTGTTTCBrUC)-3'.

For details in the calculation of % fragment ions ($[M-zH-BrdU]^{z-}$), see the experimental part.

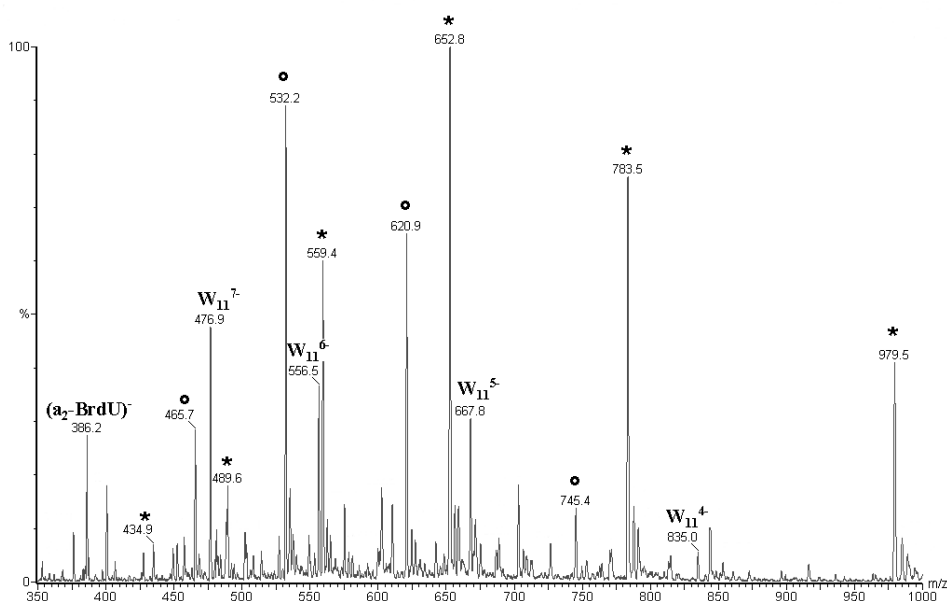
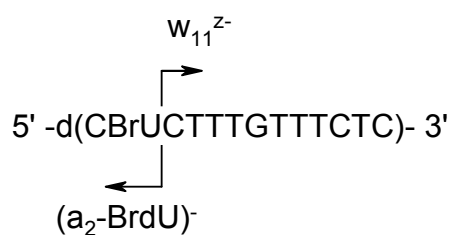


Figure 4. High cone voltage fragmentation spectrum of the oligodeoxynucleotide 5'-d(CBrUCTTTGTTTCTC)-3' (Vc = 45 V).

(*) indicates the position in the mass-to-charge ratio of the ions corresponding to the oligodeoxynucleotide studied. (°) indicates the position in the mass-to-charge ratio of the ions having lost the BrdU base from this oligodeoxynucleotide.



Scheme 1

Nous en résumons les principales conclusions.

La perte d'une base bromée est préférentielle du côté 5' plutôt que du côté 3', confirmant des résultats obtenus par Little et Mc Lafferty [1995] et Mc Luckey et Habibi-Goudarzi [1993] avec des bases non modifiées et par Mc Luckey et Habibi-Goudarzi [1994] avec des bases méthylées.

Elle est favorisée lorsque la base bromée se situe aux extrémités de la séquence plutôt qu'en interne (position 2>position 4>position 12>position 1> position 13) (figure 2).

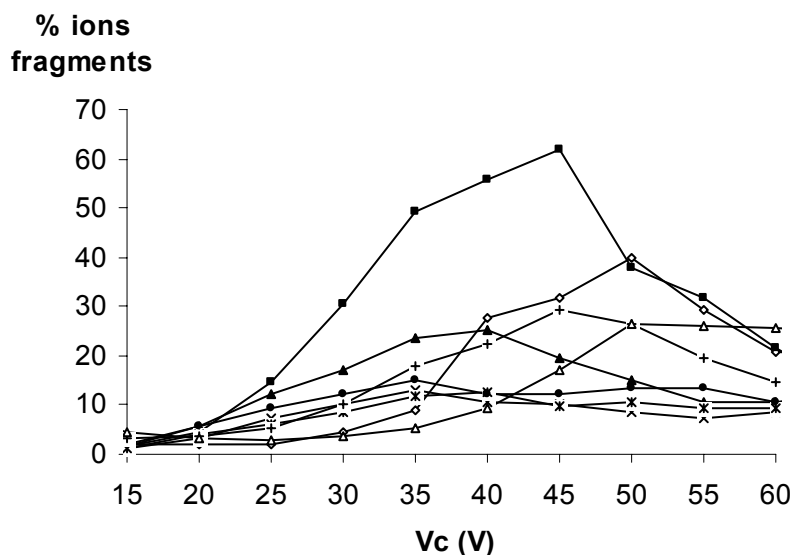


Figure 2 : Graphe de fragmentation, obtenue dans la source, correspondant à la perte de la base BrdU à partir des **oligodésoxynucléotides de la série 3:**

(◇) 5'-d(BrUTCTTTGTTTCTC)-3', (■) 5'-d(CBrUCTTTGTTTCTC)-3', (▲) 5'-d(CTCBrUTTGTTC)-3', (x) 5'-d(CTCTTBrUGTTTCTC)-3', (*) 5'-d(CTCTTTGBrUTTCTC)-3', (●) 5'-d(CTCTTTGTTCBrUCTC)-3', (+) 5'-d(CTCTTTGTTTCBrUC)-3' et (Δ) 5'-d(CTCTTTGTTTCTBrU)-3' (figure d'après la publication complétée par l'ajout des oligodésoxynucléotides (◇) et (Δ)).

Des ions fragments, correspondant aux ions complémentaires (a_n-B_n) et w_m proches de la base bromée, sont alors produits et permettent ainsi de localiser l'emplacement de la base bromée dans la séquence.

Les bases pyrimidine en position 2 (indifféremment des côtés 5' ou 3') se perdent selon l'ordre de préférence suivant: BrdU>BrdC.

Nous pensons que la perte de la base bromée se fait selon le mécanisme suivant (schéma 1) [Marzilli et coll. 1999]:

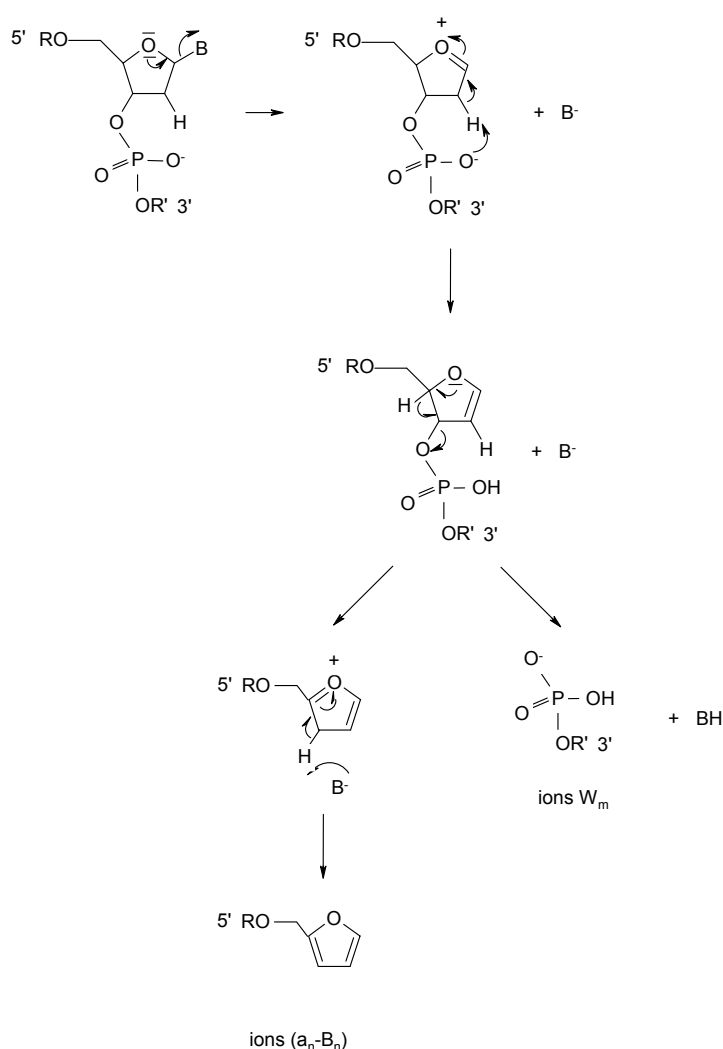


Schéma 1 : Mécanisme de perte de la base bromée et d'obtention des ions complémentaires (a_n-B_n) et w_m (d'après Marzilli et coll. [1999]).

III. Résultat complémentaire

Nous avons également établi le graphe de fragmentation correspondant à la perte de dU des oligodésoxynucléotides de la série 2 (figure 3), que nous avons comparé à la perte de BrdU et de BrdC (figure 2 de la publication).

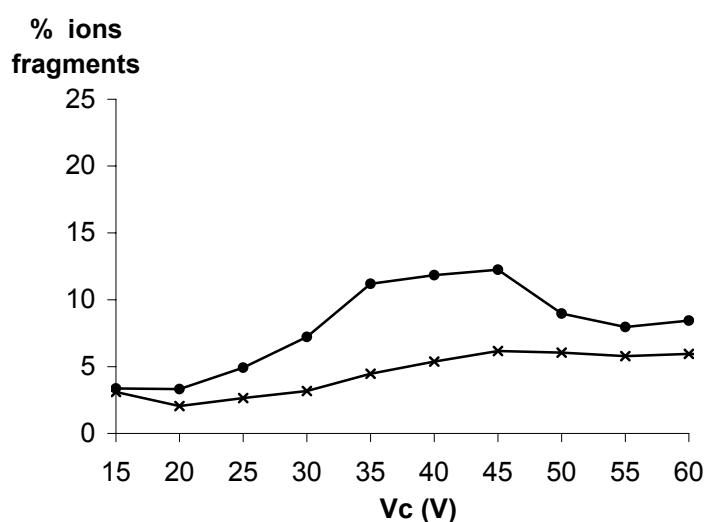


Figure 3 : Graphe de fragmentation, obtenue dans la source, correspondant à la perte de la base dU à partir des **oligodésoxynucléotides de la série 2** (x) 5'-d(CBrCCTTTGTTTCUC)-3' et (•) 5'-d(CUCTTTGTTTCBrCC)-3'.

A 7% des ions fragments, la perte de la base dU localisée en position 2 du côté 5' est observée à 30V (20V pour BrdU et 26V pour BrdC selon la figure 2 de la publication) et la même base localisée en position 2 du côté 3' est observée à 45 V (30V pour BrdU et 38V pour BrdC selon la figure 2 de la publication). Ainsi, la perte de base se produit selon l'ordre de préférence BrdU>BrdC>dU. Les bases bromées semblent se perdre plus facilement que les non bromées.

IV. Conclusion

Les oligodésoxynucléotides bromés que nous venons d'étudier se fragmentent à de faibles valeurs de V_c et les conditions idéales d'analyses permettant d'éviter la fragmentation se situent à $V_c = -15V$. La position de la base bromée dans la séquence a une influence sur la fragmentation. Si elle est localisée en interne, l'oligodésoxynucléotide sera moins sujet à la fragmentation que si elle est située sur une extrémité de la séquence.

Comme les oligonucléotides bromés sont communément utilisés en cristallographie, il serait intéressant de soumettre quelques oligodésoxynucléotides que nous avons étudiés aux rayons X et de les vérifier en spectrométrie de masse afin de connaître l'effet des rayons X sur une base bromée. Dans le cas où les rayons X induiraient une perte de brome ou de la base bromée, vérifiée par spectrométrie de masse, il serait intéressant de poursuivre cette étude pour savoir si on peut trouver des doses d'irradiation n'induisant pas de dommage.

Conclusion

La CID dans la source est un phénomène mal connu et sujet à débat. Le but de ce travail était de montrer que la CID dans la source, tout comme la CID dans une cellule de collision, pouvait 'apporter sa pierre à l'édifice' en terme d'informations sur la structure des biomolécules étudiées ainsi que sur certains mécanismes réactionnels mis en jeu par ces biomolécules en phase gazeuse aussi bien qu'en solution.

Ce travail de thèse a confirmé qu'il y avait peu de différence entre la fragmentation dans la source électrospray et la fragmentation obtenue dans une cellule de collision dans le cas d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle (Quattro II, Micromass). Nous avons montré que nous obtenions des informations structurales identiques pour les deux processus de fragmentation et que la masse et la charge avaient un effet sur la fragmentation des biomolécules étudiées. En effet, plus la valeur de m/z de l'ion est faible, plus le processus de collision est efficace.

Lors de la comparaison de ces deux processus de fragmentation, l'étude de peptides aldéhyde a permis de visualiser en source ESI le reflet en phase gazeuse de l'équilibre existant en solution entre un peptide aldéhyde et sa forme hydratée, i.e. un peptide diol. En augmentant progressivement l'énergie de collision, ces peptides diol et leurs analogues acétal perdent successivement une puis deux molécules d'eau ou de méthanol conduisant à un même ion final. Cette observation nous a amenées à penser que ces peptides se fragmentaient selon un mécanisme similaire. Nous avons alors étudié les processus de fragmentation qui sous-tendent ces pertes de méthanol ou d'eau avec des peptides modèles. Les principales conclusions de cette étude montrent que la première perte de méthanol ou d'eau proviendrait certainement d'une 'fragmentation dirigée par la charge' et que l'ion final

probablement cyclique, issu de la seconde perte, proviendrait d'une attaque nucléophile par l'azote d'une amine (N-terminal ou ϵ -NH₂ d'une lysine) sur le carbone fonctionnel.

L'observation de la forme hydratée de l'ion peptide aldéhyde, à de faibles valeurs de tensions appliquées sur le cône d'échantillonnage, nous a conduit à étudier l'hydratation de peptides aldéhyde et cétone par résonance magnétique nucléaire et par ionisation électrospray. Ces deux méthodes sont complémentaires puisque la RMN atteste la forme hydratée en solution et l'ESI illustre le comportement en phase gazeuse du carbonyl étudié et de sa forme hydratée tétrahédrique. Les résultats obtenus nous ont poussées à continuer par une étude du mécanisme de la réaction d'oximation qui résulte de la condensation d'un peptide aldéhyde ou cétone sur un peptide aminooxy en milieu aqueux. Cette réaction s'effectue en deux étapes dont l'état intermédiaire est constitué par une forme tétrahédrique. La première étape de la réaction de ligation semble être l'étape limitante pour les peptides cétone en raison de l'encombrement stérique de la fonction carbonyl. Concernant les peptides aldéhyde, la deuxième étape de la réaction de ligation semblerait déterminante en raison de la basicité de l'oxygène de la fonction hydroxyle.

L'étude d'oligodésoxynucléotides bromés, cette fois en mode négatif, par fragmentation dans la source ESI, a conduit à la perte de la base bromée. Cette perte est favorisée lorsque la base modifiée se situe aux extrémités de la séquence plutôt qu'en interne. Des ions fragments, correspondant aux ions complémentaires (a_n - B_n) et w_m proches de la base bromée, permettent ainsi de localiser l'emplacement de la base modifiée dans la séquence. Les oligonucléotides bromés étant communément utilisés en cristallographie, il serait intéressant de poursuivre cette étude en comparant le résultat des deux méthodes pour savoir si nous pouvons trouver des doses d'irradiation n'induisant pas de dommage.

La variété des informations obtenues par fragmentation dans la source électrospray illustre l'intérêt de cette technique analytique. De plus, elle a l'avantage de la rapidité et de l'économie en matériel biologique par rapport à des techniques complémentaires telles que la RMN ou la cristallographie.

Partie expérimentale

Les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées sur un spectromètre de masse triple quadripôle (Quattro II, Waters) équipé d'une source en ionisation électrospray. Le logiciel d'application est Masslynx, version 3.4. La calibration externe est effectuée au moyen de la myoglobine.

I. Etude de peptides thioester (chapitre II)

La fragmentation dans la source électrospray s'effectue en faisant varier la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (V_c) de 10 à 120 V par incréments de 5 V. La fragmentation dans la cellule de collision du triple quadripôle s'effectue en faisant varier la tension appliquée sur la cellule de collision (V_{cell}) de 0 à 54 V par incréments de 2 V avec une tension appliquée sur le cône d'échantillonnage de 22 V. La pression en argon dans la cellule de collision est maintenue à $3.2 \cdot 10^{-3}$ Torr.

Les peptides thioester ont été synthétisés au Centre de Biophysique Moléculaire au sein de l'équipe 'Exobiologie' [Bertrand et coll. 2001].

Ces peptides ont été purifiés au préalable par HPLC et sont analysés en mode positif par spectrométrie de masse. 3 μ l de chaque peptide sont injectés via une vanne Rhéodyne 7125 comportant une boucle de 10 μ l et élués avec un mélange 80/20 acétonitrile/eau à 20 μ l/min dans le spectromètre de masse. Les expériences sont répétées trois fois.

II. Etude de peptides acétal et aldéhyde (paragraphe I du chapitre II)

Les peptides acétal et aldéhyde ont été synthétisés au Centre de Biophysique Moléculaire au sein de l'équipe 'Peptides et protéines de synthèse' [Lelièvre et coll. 2002].

II.1. Obtention des peptides aldéhyde

Le peptide aldéhyde est obtenu à partir du peptide acétal en ajoutant 80% de TFA en volume à la solution de ce peptide acétal. Après une agitation de 10 minutes, on évapore à sec ('rotavapor') et on reprend le peptide aldéhyde dans la quantité voulue d'eau.

II.2. Paramètres d'analyse en spectrométrie de masse

La fragmentation dans la source électrospray s'effectue en faisant varier la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (V_c) de 10 à 80 V par incréments de 5 V. La fragmentation dans la cellule de collision du triple quadripôle s'effectue en faisant varier la tension appliquée sur la cellule de collision (V_{cell}) de 0 à 60 V par incréments de 2 V avec une tension appliquée sur le cône d'échantillonnage comprise entre 27 V à 40 V. La pression en argon dans la cellule de collision est maintenue à $2.2 \cdot 10^{-3}$ Torr.

Les peptides étudiés ont été purifiés au préalable par HPLC et sont analysés en mode positif par spectrométrie de masse. 3 μ l de chaque peptide sont injectés via une vanne Rhéodyne 7125 comportant une boucle de 10 μ l et élués avec un mélange 70/30 acétonitrile/eau à 10 μ l/min dans le spectromètre de masse. Les expériences sont répétées trois fois.

III. Etude des peptides aldéhyde et cétone (paragraphe II du chapitre II)

III.1. Obtention des peptides aldéhyde à partir de peptides acétal

Les peptides acétal, aldéhyde et cétone ont été synthétisés au Centre de Biophysique Moléculaire au sein de l'équipe 'Peptides et protéines de synthèse'.

Le peptide aldéhyde est obtenu à partir du peptide acétal en ajoutant 80% de TFA en volume à la solution de ce peptide acétal. Après une agitation de 10 minutes, on évapore à sec ('rotavapor') et on reprend le peptide aldéhyde dans la quantité voulue d'eau. Cette étape d'évaporation est effectuée trois fois afin d'élever la valeur du pH du peptide aldéhyde. Le peptide aldéhyde est ensuite purifié par HPLC analytique. Le pic d'intérêt est collecté à froid, puis évaporé à sec ('rotavapor') et repris dans de l'eau trois fois. Le peptide aldéhyde est finalement lyophilisé et conservé à -20°C. Cette manipulation doit se faire dans la même journée, les peptides aldéhyde étant très fragiles.

III.2. Quantification des peptides aldéhyde

La concentration des peptides aldéhyde et aminooxy est déterminée par dosage UV selon la loi de Beer-Lambert:

$$DO = \epsilon.l.c.$$

DO est la densité optique, ϵ est le coefficient d'absorption à une longueur d'onde donnée, l est la longueur du trajet optique et c est la concentration.

Les coefficients d'absorption ont été calculés selon Wetlaufer [1962].

Nous avons utilisé $\epsilon_{275}=1420$ pour les peptides P1, P2 et P3, $\epsilon_{280}=5600$ pour le peptide Paoa et $\epsilon_{220}=13971$ pour les peptides P4, P5 et P6.

III.3. Paramètres d'analyse en spectrométrie de masse

La fragmentation dans la source électrospray s'effectue en faisant varier la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (V_c) de 10 à 70 V par incréments de 5 V. Les peptides étudiés ont été purifiés au préalable par HPLC et lyophilisés. Ils sont analysés en mode positif par spectrométrie de masse. Chaque peptide est dissous dans 80/20 acétonitrile/5 mM d'acétate d'ammonium, ajusté au pH 4,6 avec de l'acide acétique à une concentration de 100 pmol/ μ l concernant les peptides P1, P2 et P3 et à une concentration de 200 pmol/ μ l concernant les peptides P4, P5 et P6. 3 μ l de chaque peptide sont injectés via une vanne Rhéodyne 7125 comportant une boucle de 10 μ l et élués avec un mélange 80/20 acétonitrile/eau à 20 μ l/min dans le spectromètre de masse. Les expériences sont répétées trois fois.

III.4. Paramètres d'analyse en RMN

La résonance magnétique nucléaire est une technique extrêmement puissante pour la détermination de la structure des molécules. Le spectre de RMN est composé des signaux de résonance émis par certains noyaux atomiques de l'échantillon. Pour obtenir ces signaux, l'échantillon est soumis à l'action conjointe de deux champs magnétiques, dont l'un est intense et fixe tandis que l'autre est environ 10 000 fois plus faible et variable. Le spectre de RMN correspond à l'absorption, par certains atomes de l'échantillon, de fréquences présentes dans la source électromagnétique. Ainsi, deux protons dont l'environnement atomique est différent vont résonner à des fréquences différentes. On mesure le déplacement chimique δ des protons (en partie par millions) par rapport à un témoin interne comme le tétraméthylsilane. Le déplacement chimique est donné par le rapport entre la fréquence séparant le proton du composé au tétraméthylsilane et la fréquence du spectromètre en mégahertz.

L'appareil utilisé est un spectromètre Avance-500 MHz Bruker, comportant une sonde 5 mm BBI (Broad band Inverse).

Les peptides sont dissous dans D_2O à pH 4,5 et analysés à $T=25^\circ C$.

III.5. Ligation chimique suivie par HPLC

III.5.a. Ligation chimique

Les solutions dans l'eau de peptides dosés en UV ont été remises à sec ('speed-vac') et les peptides ont été conservés à -20°C. Les peptides sont remis en solution dans un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,6, juste avant ligation. Le mélange est agité au vortex et se fait à température ambiante. La concentration finale des peptides aldéhyde est de 1135 µM et celle du peptide aminooxy est de 757µM, soit 1.5 fois moins. La réaction est suivie, à 25°C, pendant 37 heures concernant les peptides P1, P2 et P3 et 48 heures concernant les peptides P4, P5 et P6. Cette réaction de ligation est répétée trois fois pour chaque peptide aldéhyde.

III.5.b. Méthode chromatographique

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) constitue une technique séparative et quantitative. Le processus chromatographique est basé sur le fait que les composés à séparer se répartissent entre deux phases, une stationnaire et une mobile. Il est le résultat d'interactions des solutés lors de la traversée de la phase stationnaire. La séparation entre les solutés est due aux différences de leurs coefficients de partage entre les deux phases.

Les analyses en HPLC ont été réalisées sur un instrument de type CapLC (Waters). Les analyses se font environ toutes les 38 minutes. Le plateau comportant les échantillons à injecter est maintenu à 25°C. Le solvant A est H₂O+0,1% TFA et le solvant B est acétonitrile + 0,1% TFA. Le gradient est de 10 à 30% de B en 20 min, 30 à 100 % de B en 3 min, 100 à 10 % de B en 3 min puis 10% de B pendant 10 min.

Le débit est de 5 µl/min. 0,5 µl du mélange est injecté. La détection se fait sur un détecteur à barrette de diodes de 200 à 350 nm. La colonne est une colonne de phase inverse de type Symmetry C18 3,5 µm, 0,32x50 mm (Waters).

IV. Etude des oligodésoxynucléotides (chapitre IV)

Les oligodésoxynucléotides ont été achetés chez Eurogentec (Herstal, Belgique) et utilisés sans autre purification.

La fragmentation dans la source électrospray s'effectue en faisant varier la tension appliquée sur le cône d'échantillonnage (V_c) de -90 à -10 V par incréments de 5 V. Ils sont analysés en mode négatif par spectrométrie de masse. Chaque oligodésoxynucléotide est dissous dans un mélange de 80/20 acétonitrile/eau + 0,1% de triéthylamine à une concentration de 5 pmol/ μ l. 3 μ l de chaque oligodésoxynucléotide sont injectés via une vanne Rhéodyne 7125 comportant une boucle de 10 μ l et élués avec un mélange 80/20 acétonitrile/eau à 20 μ l/min dans le spectromètre de masse. Les expériences sont répétées trois fois.

Références bibliographiques

Adamczyk, M.; Gebler, J.C.; Wu, J. Charge derivatization of peptides to simplify their sequencing with an ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, *13*, 1413-1422.

Andersson, L.; Isley, T.C.; Wolfenden, R. α -aminoaldehydes : transition state analogue inhibitors of leucine aminopeptidase. *Biochemistry.*, **1982**, *21*, 4177-4180.

Barry, J.P.; Vouros, P.; Schepdael, A.V.; Law, S.-J. Mass and sequence verification of modified oligonucleotides using electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, *30*, 993-1006.

Bertrand, M.; Buré, C.; Fleury, F.; Brack, A. Prebiotic polymerization of amino acid thioesters on mineral surfaces. In *Geochemistry and the Origin of Life*; ed. by Nakashima, S.; Maruyama, S.; Brack, A.; Windley, B.F.; Tokyo : Universal Academy Press, **2001**; p. 51-60.

Biemann, K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **1988**, *16*, 99-111.

Bogusz, M.J.; Maier, R.-D.; Krüger, K.D.; Webb, K.S.; Romeril, J.; Miller, M.L. Poor reproducibility of in-source collisional atmospheric pressure ionization mass spectra of toxicologically relevant drugs. *J. Chromatogr. A*, **1999**, *844*, 409-418.

Bordoli, R.S.; Bateman, R.H. The effect of collision energy, target gas and target gas purity on the high energy collision induced product ion spectrum of renin substrate. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1992**, *122*, 243-254.

Buré, C.; Lelièvre, D.; Delmas, A. Identification of by-products from an orthogonal peptide ligation by oxime bonds using mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, *14*, 2158-2164.

Burlet, O.; Orkiszewski, R.S.; Ballard, K.D.; Gaskell, S.J. Charge promotion of low-energy fragmentations of peptide ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, *6*, 658-662.

Cerny, R.L.; Gross, M.L.; Grotjahn, L. Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the study of dinucleotides. *Anal. Biochem.* **1986**, *156*, 424-435.

Chen, H.; Tabei, K.; Siegel, M.M. Biopolymer sequencing using a triple quadrupole mass spectrometer in the ESI nozzle-skimmer/precursor ion MS/MS mode. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, *12*, 846-852.

Cole, R.B. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 763-772.

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

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

Cox, K.A.; Gaskell, S.J.; Morris, M.; Whiting, A. Role of the Site of Protonation in the Low-Energy Decompositions of Gas-Phase Peptide Ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1996**, *7*, 522-531.

Crain, P.F.; Gregson, J.M.; Mc Closkey, J.A.; Nelson, C.C.; Peltier, J.M.; Phillips, D.R.; Pomerantz, S.C.; Reddy, D.M. Characterization of posttranscriptional modification in nuclear acids by tandem mass spectrometry. In *Mass Spectrometry in the Biological Sciences*; ed. by Burlingame, A.L.; Carr, S.A.; Totawa, NJ : Humana Press, **1996**; p. 497-517.

Cremer, G.A.; Bureau, N.; Lelièvre, D.; Piller, V.; Piller, F.; Delmas, A. Synthesis of branched oxime-linked peptide mimetics of the MUC1 containing a universal T-helper epitope. *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 6353-6360.

De Hoffmann, E. Tandem mass spectrometry: A primer. *J. Mass Spectrom.*, **1996**, *31*, 129-137.

Doerge, D.R.; Bajic, S. Multiresidue determination of quinolone antibiotics using liquid chromatography coupled to atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, *9*, 1012-1016.

Dole, M.; Mack, L.L.; Hines, R.L.; Mobley, R.C.; Ferguson, L.D.; Alice, M.B. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*, **1968**, *49*, 2240-2247.

Dongré, A.R.; Jones, J.L.; Somogyi, A.; Wysocki, V.H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency : evidence for the mobile proton model. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 8365-8374.

Downard, K.M.; Biemann, K. The effect of charge state and the localization of charge on the collision-induced dissociation of peptide ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, *5*, 966-975.

Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989**, *246*, 64-71.

Ginter, J.M.; Zhou, F.; Johnston, M.V. Generating protein sequence tags by combining cone and conventional collision induced dissociation in a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, *15*, 1478-1486.

Griffiths, W.J.; Jonsson, A.P. Gas phase conformation can have an influence on peptide fragmentation. *Proteomics*, **2001a**, *1*, 934-945.

Griffiths, W.J.; Jonsson, A.P.; Liu, S.; Rai, D.K.; Wang, Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem. J.*, **2001b**, 355, 545-561.

Harrison, A.G. ; Yalcin, T. Proton mobility in protonated amino acids and peptides. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1997**, 165, 339-347.

Harrison, A.G. Fragmentation reactions of alkylphenylammonium ions. *J. Mass Spectrom.*, **1999a**, 34, 1253-1273.

Harrison, A.G. Energy-resolved mass spectrometry: a comparison of quadrupole cell and cone-voltage collision-induced dissociation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999b**, 13, 1663-1670.

Iribarne, J.V.; Thomson, B.A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.*, **1976**, 64, 2287-2294.

Johnson, R.S.; Krylov, D.; Walsh, K.A. Proton mobility within electrosprayed ions. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, 30, 386-387.

Jones, J.L.; Dongré, A.R.; Somogyi, A.; Wysocki, V.H. Sequence dependence of peptide fragmentation efficiency curves determined by electrospray ionization/surface-induced dissociation mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 8368-8369.

Karas, M. ; Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299-2301.

Karas, M. ; Bahr, U. ; Ingendoh, A. ; Hillenkamp, F. Laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 Dalton. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 760-762.

Kebarle, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 804-817.

Lelièvre, D.; Chabane, H.; Delmas, A. Simple and efficient solid-phase synthesis of unprotected peptide aldehyde for peptide segment ligation. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 9675-9678.

Lelièvre, D.; Turpin, O.; El Kazzouli, S.; Delmas, A. Influence of polar support for the synthesis of large C-terminal peptide aldehyde: application to chemoselective ligation. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5525-5533.

Little, D.P.; Mc Lafferty, F.W. Sequencing 50-mer DNAs using electrospray tandem mass spectrometry and complementary fragmentation methods. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 6783-6784.

Loo, J.A.; Udseth, H.R.; Smith, R.D. Collisional effects on the charge distribution of ions from large molecules, formed by electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 207-210.

Makowiecki, J.; Tolonen, A.; Uusitalo, J.; Jalonen, J. Cone voltage and collision cell collision-induced dissociation study of triphenylethylenes of pharmaceutical interest. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15, 1506-1513.

Marcus, R.A. Unimolecular dissociations and free radical recombination reactions. *J. Chem. Phys.*, **1952**, 20, 359-364.

Marzilli, L.A.; Barry, J.P.; Sells, T.; Law, S.-J.; Vouros, P.; Harsch, A. Oligonucleotide sequencing using guanine-specific methylation and electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **1999**, 34, 276-280.

Mc Luckey, S.A.; Van Berkel, G.J.; Glish, G.L. Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, 3, 60-70.

Mc Luckey, S.A.; Habibi-Goudarzi, S. Decompositions of multiply charged oligonucleotide anions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 12085-12095.

Mc Luckey, S.A.; Habibi-Goudarzi, S. Ion trap tandem mass spectrometry applied to small multiply charged oligonucleotides with a modified base. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, *5*, 740-747.

Mc Luckey, S.A.; Vaidyanathan, G.; Habibi-Goudarzi, S. Charged vs. neutral nucleobase loss from multiply charged oligonucleotide anions. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, *30*, 1222-1229.

Meng, C.K. ; Mann, M. ; Fenn, J.B. Of protons or proteins. 'A beam's a beam for a 'that.' (OS Burns). *Phys. D.*, **1988**, *10*, 361-368.

Meng, C. K., Mann, M. and Fenn, J. B. Electrospray ionization of some polypeptides and small proteins. In *Proceedings of the 36th American Society for Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Francisco, CA, June, **1988**, p. 771-772.

Meng, C.K.; McEwen, C.N.; Larsen, B.S. Peptide sequencing with electrospray ionization on a magnetic sector mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1990**, *4*, 151-155.

Pais, P.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M.T.; Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with in-source fragmentation for the identification and quantification of fourteen mutagenic amines in beef extracts. *J. Chromatogr. A*, **1997**, *775*, 125-136.

Paul, W. ; Steinwedel, H.S., Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Z. Naturforsch.*, **1953**, *8a*, 448-450.

Pomerantz, S.C.; Mc Closkey, J.A. Fragmentation of multiply-charged oligonucleotides in triple quadrupoles. In *Proceedings of the 43rd American Society for Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Atlanta, GA, May, **1995**, p 600.

Premstaller, A.; Huber, C.G. Factors determining the performance of triple quadrupole, quadrupole ion trap and sector field mass spectrometer in electrospray ionization mass

spectrometry. 2. Suitability for de novo sequencing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, *15*, 1053-1060.

Roepstorff, P.; Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, **1984**, *11*, 601.

Rosenstock, H.M.; Wallenstein, M.B.; Warharftig, A.L.; Eyring, H. Absolute rate theory for isolated systems and the mass spectra of polyatomic molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **1952**, *38*, 667-678.

Roth, K.D.W.; Huang, Z.-H.; Sadagopan, N.; Watson, J.T. Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **1998**, *17*, 255-274.

Sadagopan, N.; Watson, J.T. Investigation of the tris(trimethoxyphenyl)phosphonium acetyl charged derivatives of peptides by electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, *11*, 107-119.

Sayer, J.M.; Pinsky, B.; Schonbrunn, A.; Washtien, W. Mechanism of carbinolamine formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 7998-8009.

Schneider, B.B.; Douglas, D.J.; Chen, D.D.Y. Ion fragmentation in an electrospray ionization mass spectrometer interface with different gases. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, *15*, 249-257.

Shukla, A.K.; Futrell, J.H. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 1069-1090.

Tanaka, K.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. In *Proceedings of the 2nd Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*, Osaka, Japan, September, **1987**, p. 185-188.

Tanaka,K. ; Waki, H. ; Ido, Y. ; Akita, S. ; Yoshida,Y. ; Yoshida, T. Protein and polymer analysis up to m/z 100.000 by laser ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 151-153.

Tang, X.-J.; Boyd, R.K. An investigation of fragmentation mechanisms of doubly protonated tryptic peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6, 651-657.

Tang, X.-J.; Thibault, P.; Boyd, R.K. Fragmentation reactions of multiply-protonated peptides and implications for sequencing by tandem mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation. *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2824-2834.

Tsang CW, Harrison AG. Chemical ionization of amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 1301-1308.

Tsapraillis, G.; Nair,H. ; Somogyi, A. ; Wysocki, V.H. ; Zhong, W. ; Futrell, J.H. ; Summerfield, S.G. ; Gaskell, S.J. Influence of secondary structure on the fragmentation of protonated peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5142-5154.

Tsapraillis, G.; Somogyi, A.; Nikolaev, E.N.; Wysocki, V.H. Refining the model for selective cleavage at acidic residues in arginine-containing protonated peptides. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, 195/196, 467-479.

Van Dongen, W.D.; Van Wijk, J.I.T.; Green, B.N.; Heerma, W.; Haverkamp, J. Comparison between collision induced dissociation of electrosprayed protonated peptides in the up-front source region and in a low-energy collision cell. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13, 1712-1716.

Voyksner, R.D.; Pack, T. Investigation of collisional-activation decomposition process and spectra in the transport region of an electrospray single-quadrupole mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1991**, 5, 263-268.

Wan, K.X.; Gross, M.L. Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides: effects of replacing phosphates with methylphosphonates and thymines with other bases in T-rich sequences. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, 12, 580-589.

Wan, K.X.; Gross, J.; Hillenkamp, F.; Gross, M.L. Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides studied by H/D exchange and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, *12*, 193-205.

Weinmann, W.; Wiedemann, A.; Eppinger, B.; Renz, M.; Svoboda, M. Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, *10*, 1028-1037.

Weinmann, W.; Stoertzel, M.; Vogt, S.; Svoboda, M.; Schreiber, A. Tuning compounds for electrospray ionization/in-source collision-induced dissociation and mass spectra library searching. *J. Mass Spectrom.*, **2001**, *36*, 1013-1023.

Wetlaufer, D.B. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. In *Advances in protein chemistry* N°17; ed. Anfinsen, C.B.; Anson, M.L.; Bailey, K.; Edsall, J.T.; London : Academic Press, **1962**; p. 303-390.

Wysocki, V.H.; Tsaprailis, G.; Smith, L.L.; Brei, L.A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 1399-1406.

Yalcin, T.; Khouw, C.; Csizmadia, I.G.; Peterson, M.R.; Harrison, A.G. Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1995**, *6*, 1165-1174.

Yalcin, T.; Csizmadia, I.G.; Peterson, M.R.; Harrison, A.G. The structure and fragmentation of B_n (n ≥ 3) ions in peptide spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1996**, *7*, 233-242.

Yates, III, J.R. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.*, **1998**, *33*, 1-19.

Yeh, R.W.; Grimley, J.M.; Bursey, M.M. Collisionally induced fragmentation of protonated oligoalanines and oligoglycines. *Biol. Mass Spectrom.*, **1991**, *20*, 443-450.

**FRAGMENTATION DANS UNE SOURCE A ELECTRONEBULISATION
DE BIOMOLECULES DE SYNTHESE :
PEPTIDES THIOESTER, ACETAL, ALDEHYDE ET OLIGONUCLEOTIDES BROMES.**

La thèse a porté sur l'étude de peptides et d'oligonucléotides par fragmentation dans la source électrospray d'un Quattro II (Micromass). L'instrument a d'abord été évalué en mode positif avec des peptides thioester modèles puis en mode négatif avec des oligodésoxynucléotides bromés dont la fragmentation de la base modifiée permet sa localisation dans la séquence.

La fragmentation de peptides acétal et diol (aldéhyde hydraté) conduit à un même ion final cyclique. L'hydratation de peptides aldéhyde a été étudiée en solution par RMN et en phase gazeuse par fragmentation dans la source. Les informations issues de ce travail ont permis une meilleure compréhension du mécanisme de la réaction d'oximation.

MOTS-CLES : électrospray ; MS/MS ; fragmentation; mécanisme; peptide; oligonucléotide.

**IN-SOURCE FRAGMENTATION OF SYNTHETIC BIOMOLECULES :
PEPTIDE THIOESTERS, ACETALS AND ALDEHYDES
AND BROMINATED OLIGONUCLEOTIDES.**

This work dealt with the study of peptides and oligonucleotides by in-source fragmentation with a Quattro II (Micromass). This instrument was first evaluated in the positive mode with peptide thioesters and then in the negative mode with brominated oligodeoxynucleotides whose fragmentation of the modified base allows its location in the sequence.

The fragmentation of peptide acetals and diols (hydrated aldehydes) leads to a same cyclic final ion. The hydration of peptide aldehydes was studied in solution by NMR and in the gas phase by in-source fragmentation. The information coming from this work allowed a better understanding of the mechanism of the ligation chemistry by oxime bond.

KEYWORDS : electrospray ; MS/MS ; fragmentation; mechanism; peptide; oligonucléotide.

CHIMIE ANALYTIQUE

CENTRE DE BIOPHYSIQUE MOLECULAIRE

Rue Charles Sadron – 45071 ORLEANS cedex 2