

Spectrométrie de masse et activités biologiques

Alexandre Maciuk

Laboratoire de Pharmacognosie
Faculté de Pharmacie
Université Paris-Sud



I – Introduction

Déréplication :

Identifier les molécules connues pour ne pas perdre de temps à les isoler ;

Métabolomique :

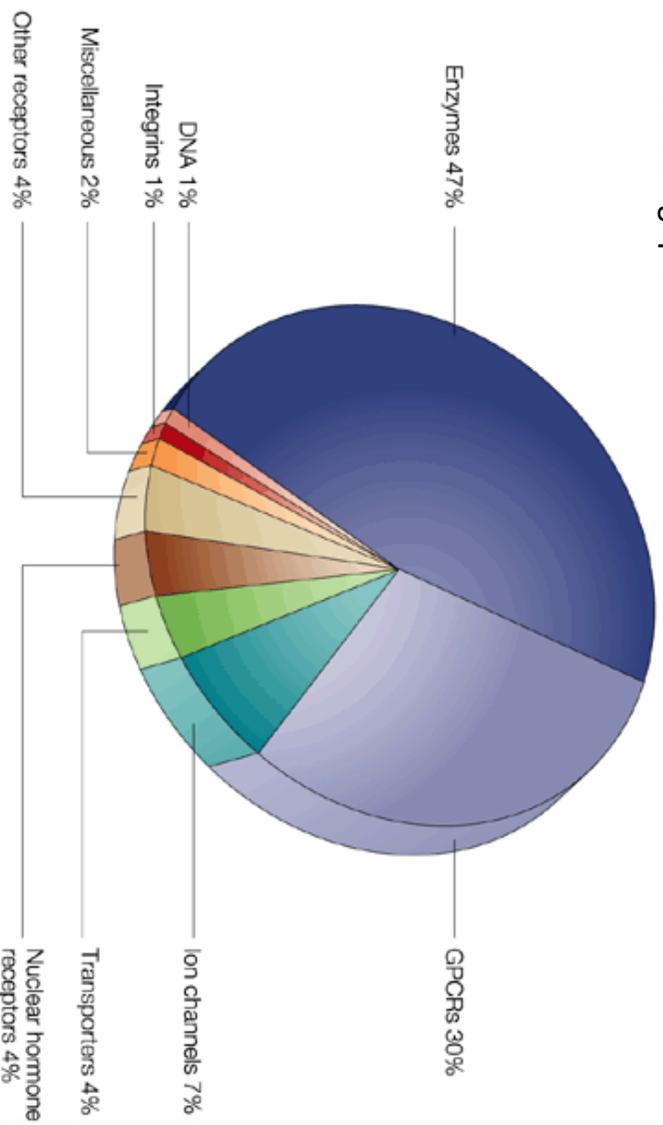
En substances naturelles, explorer la complexité pour identifier des molécules corrélées à un paramètre extérieur ;

Pharmacognosie :

Étude des matières premières et des substances d'origine biologique à **potentialité médicamenteuse = Drug discovery.**



« Activité biologique » ?



- Environ 500 cibles identifiées pour les médicaments actuels ;
- Cibles = essentiellement des protéines ;

Activité : INTERACTION avec ces cibles.

Nature Reviews Drug Discovery (2002) 1, 727-730

La spectrométrie de masse est une méthode en phase gazeuse
Utilisée en chimie analytique elle peut :

- Donner la masse d'une molécule (petite ou protéique) ;
- Utilisée en biologie/médecine/pharmacie, elle peut :
- Identifier et quantifier des marqueurs (de maladie, de vieillissement...);

Peut-elle faire plus ?



« Les massistes cherchent à appliquer la MS à virtuellement toutes les questions scientifiques ! » (Loo, *Mass Spectrom Rev* 1997).

Une interaction implique la formation d'une nouvelle espèce protéine-ligand :
La MS peut indiquer nouvelle espèce, et donc informer sur cette interaction.



MS de grosses molécules rendue possible :

- Par l'avènement de l'ESI (Fenn, *Science* 1898, Nobel 2002) ;
- puis par la diminution de RF jusqu'à 300 KHz = 32400 Da : taille virtuellement illimitée (dépend des instruments) ;
- Mise en évidence d'associations par ESI MS : 1991

Rq : ne seront pas abordés ici :

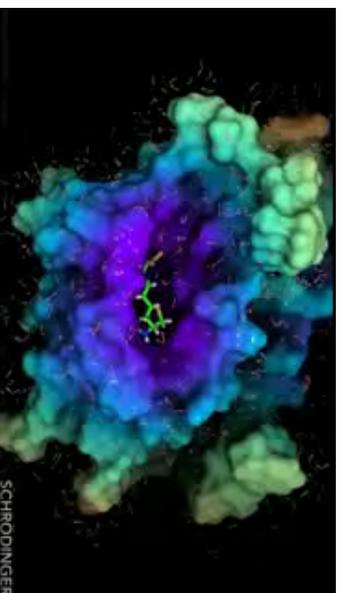
- MS comme détecteur (détection de produits de réaction enzymatique, d'adduits covalents...);
 - Crosslinking (UV, chimique) ou label par radicaux hydroxyls ;
 - Identification de protéines ;
 - Échange H-D ;
 - Daniel, Int J Mass Spec 2002
- Voir notamment Hofstadler, *Nature Rev* 2006 ; Schmidt, *FEBS Journal* 2014.

Fenn, *Angew Chem* 2003

D'autres techniques existent pour étudier les interactions biologiques.

Avantages de la MS :

- **Sensibilité** (PM de prot. - Compense l'aspect destructeur) : vs RMN, RX, ITC (mM) ;
- **Sans isolement strict** : vs quasi toutes les autres méthodes ;
- Applicable à des **mélanges** (d'intérêt ou matrice) ;
- **Rapidité** (mesure effective : 1/100 s.) ;
- **Sans marquage isotopique systématique** ;
- **Sans fixation ou étiquetage** : vs SPR, Fluorescence Anisotropy, FRET;
- **Automatisable**
- Données expérimentales relativement accessibles (vs RX par ex.) ;
- Autres techniques : RPE, CD, UV, IR, Dynamic Light Scattering, gel shift, Isothermal Titration Calorimetry, frontal chromatography...



II – Les grands principes : FAQ

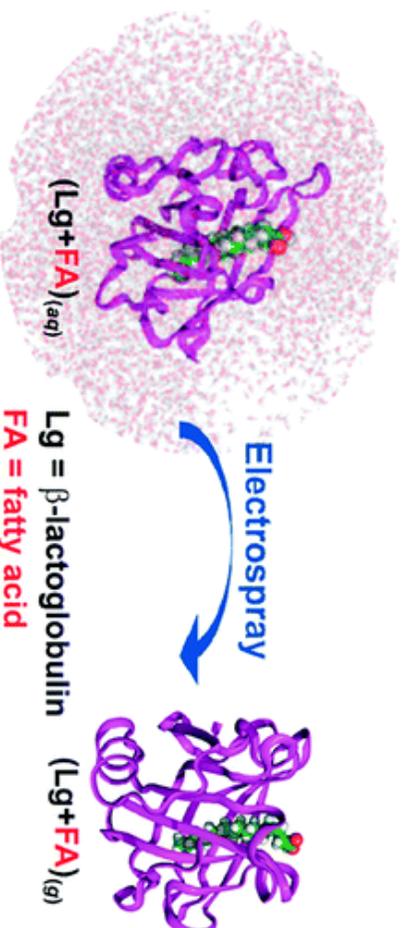
Les protéines ne sont-elles pas dégradées dans la source ?

Interactions intra-protéine :

covalentes, non covalentes ioniques, non covalentes hydrophobes

Association ligand-biomolécule :

ensemble de liaisons VdW, H, ionique, hydrophobes en solution.



Liu, JACS 2009 ; Marcoux Structure 2013 ; Breuker Int J Mass Spec 2004

Théoriquement, la désolvatation :

- peut renforcer les liaisons H au point de de les rendre aussi fortes que des liaisons covalentes ;
- Peut affaiblir les liaisons hydrophobes :
 - Sont supposées fragile en phase gazeuse,
 - mais de fait, nombreux travaux démontrent qu'elles subsistent !
 - On pense que le temps entre désolvatation et mesure est plus court (qq ms) qu'un éventuel réarrangement structural, et qu'il existe une certaine « métastabilité » de ces liaisons.
 - De plus les forces de Van der Waals ne sont théoriquement pas affectée par le vide : plus importantes que prévu ?
 - Enfin, simulations de dynamique moléculaire ont montré que la désolvatation augmente le nombre de liaisons H.
- Ne peut pas laisser inchangées les liaisons électrostatiques (constante diélectrique du vide = 1 !)

À ce stade :

Pas de règle absolue, mais plusieurs démonstrations en faveur d'une stabilité des protéines, notamment via des K_D en phase gazeuse corrélés avec K_D en solution.

Des interactions « non-biologiques » ou « non spontanées » peuvent-elles apparaître dans la source ?

Vraisemblablement non : rapide, elles sont faibles, mal orientées, se dissocieraient spontanément également...

Précaution : utilisation d'une protéine-contrôle, ne se liant pas spécifiquement
Au pire, traitement statistique d'un signal non-spécifique.

Les complexes ne se dissocient-ils pas dans la source ?

Diminuer l'état de charge contribue à diminuer ce risque (diminue l'énergie cinétique et donc les collisions).

Faut-il purifier la protéine ? Faut-il l'utiliser à des concentrations physiologiques ?

Souvent on ne connaît pas vraiment les concentrations physiologiques :
compartimentations cellulaire, associations, rafts membranaires...

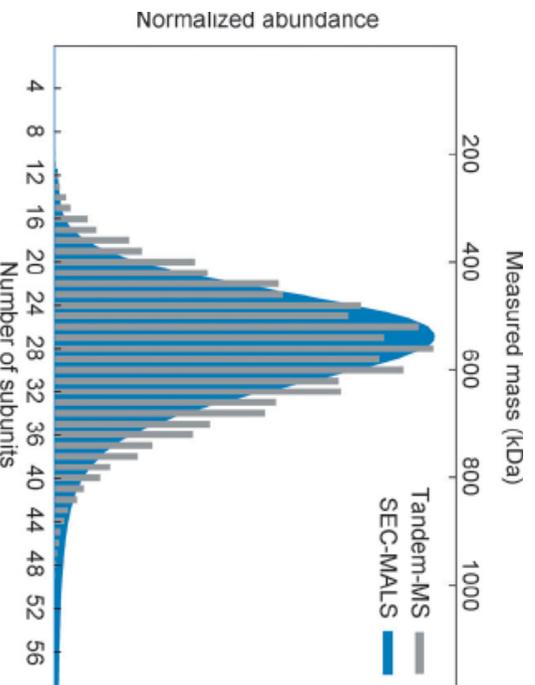
Théoriquement, on peut tester des extraits sur des mélanges de protéines, mais en pratique c'est mieux de tester une molécule sur une cible...

La MS est-elle quantitative pour des protéines ?

Oui en théorie si on compare des espèces similaires (protéine libre et prot + ligand sont considérées similaires tant que l'augmentation de masse <10%, mais pas toujours vrai).

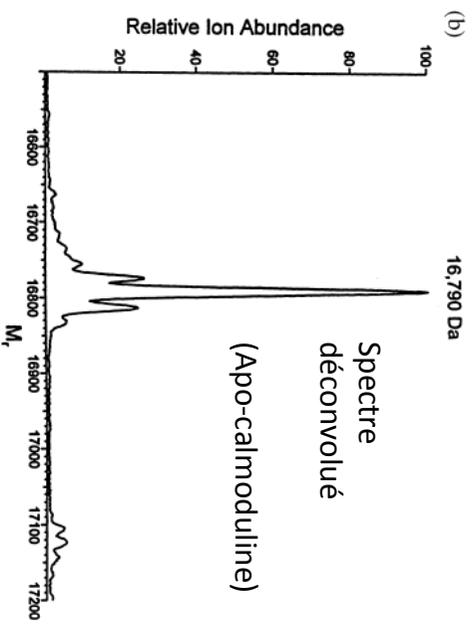
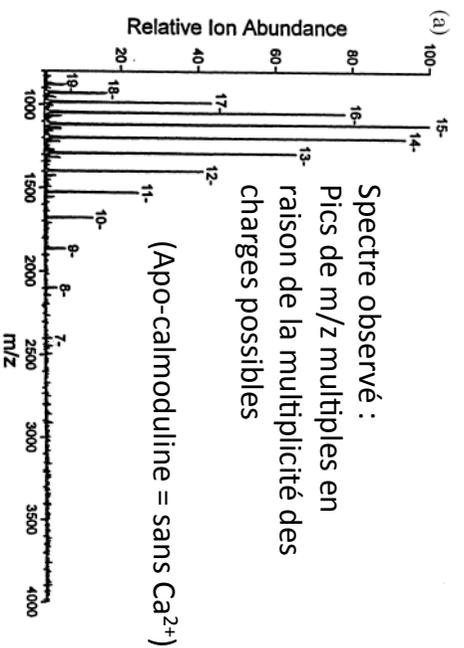
Non si on compare des espèces différentes.

Limitations liées aux grosses protéines, qui peuvent induire une mauvaise désolvatation dans la source.



Oligomères de αB-crystalline (HSP du cristallin) : la MS montrent que les oligomères de nombre pair sont plus représentés, ce que ne peut pas faire la SEC.

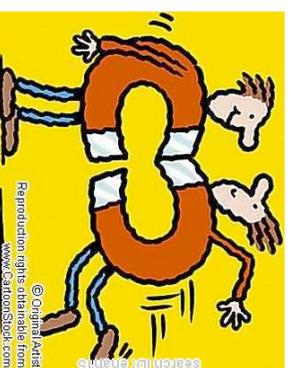
Comment voit-on une protéine en MS ?



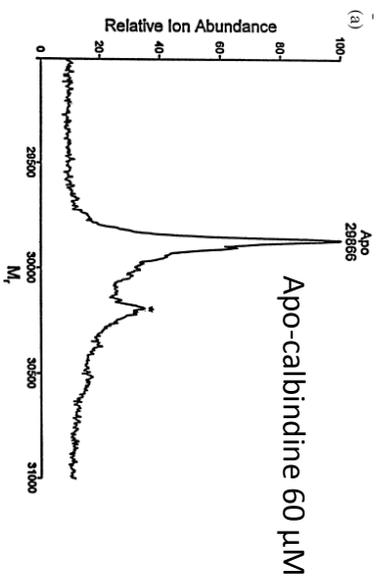
III – Quels partenaires, quelles interactions ?

Différents exemples :

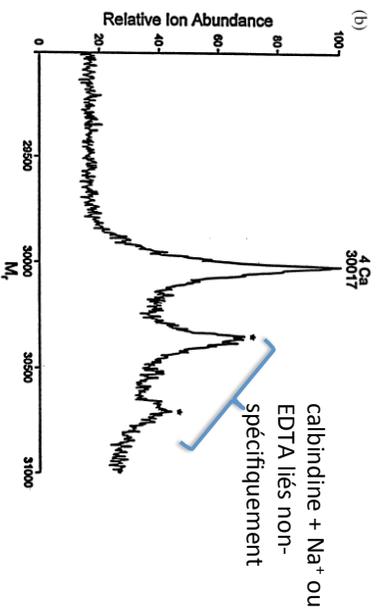
- Protéine - métal ;
- Acides nucléiques – ligand ;
- Protéines – grosses molécules ;
- Protéine – protéine ;
- Protéines transmembranaires – ligands...



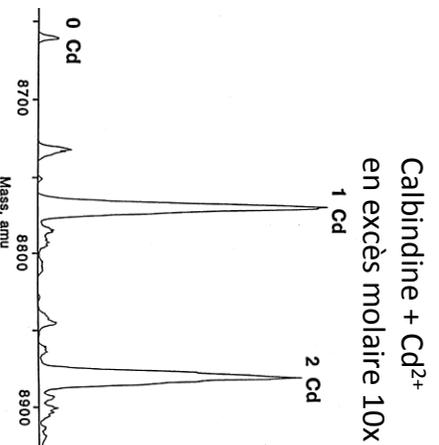
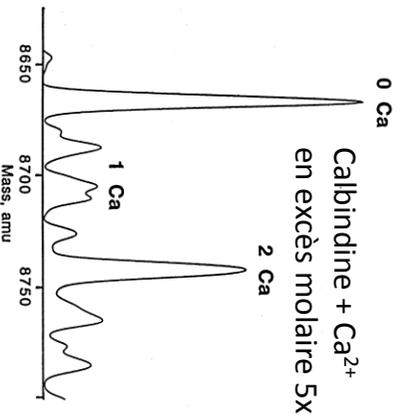
Protéine - métal :



Avec acétate de Ca 1 mM :
Calbindine - $8\text{H}^+ + 4\text{Ca}^{2+}$



Veenstra Biophys Chem 1999

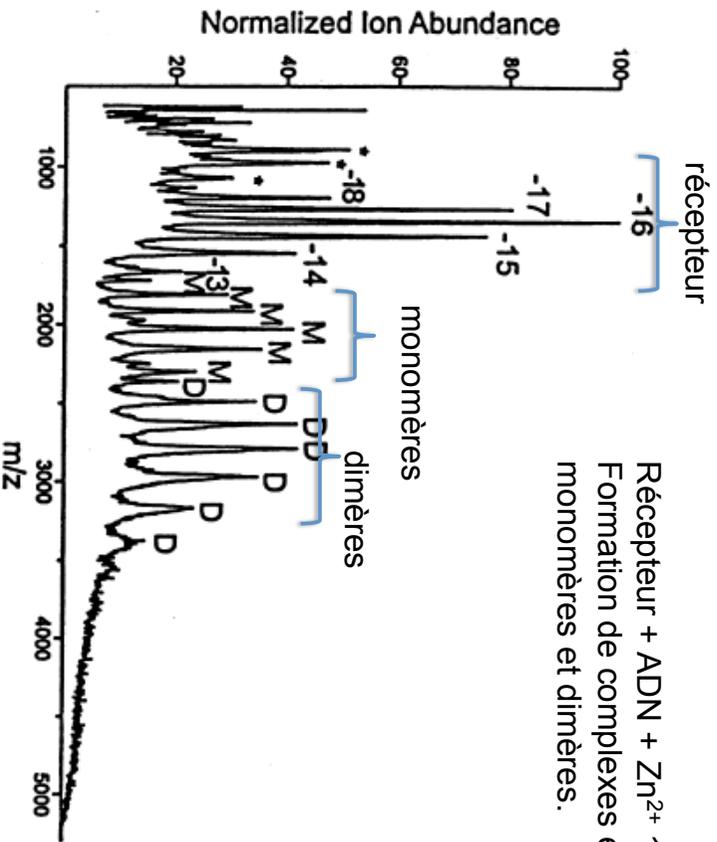


Rappel : les abondances sont proportionnelles à la concentration.

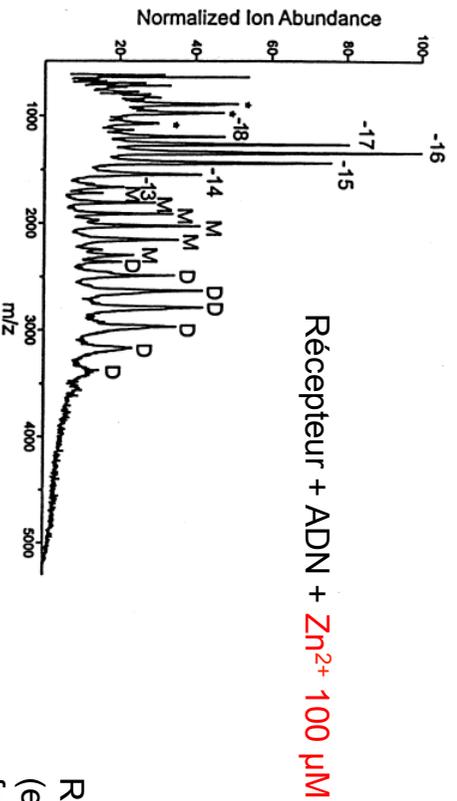
Pas de (calbindine + 1 Ca^{2+}) : soit un Ca^{2+} soit deux
La fixation d'un premier Ca^{2+} augmente l'affinité
pour le Ca^{2+} de sorte que le Ca^{2+} libre se lie
préférentiellement à la forme (calbindine + 1 Ca^{2+}).

Le Cd^{2+} se lie mais n'a pas d'effet sur la protéine.
Liaison identique sur chacun des 2 sites
indifféremment de façon non-coopérative.

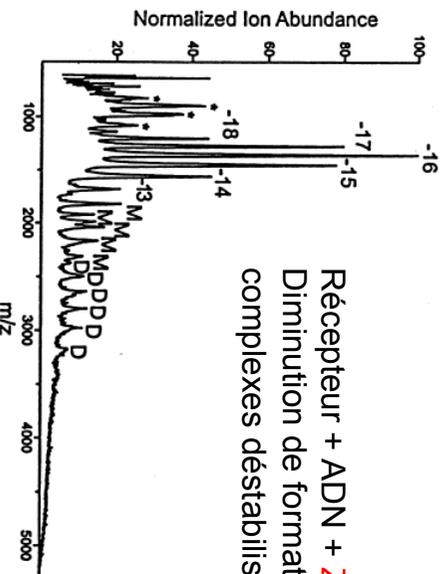
Récepteur à la Vit D : lie un ligand, puis du Zn, puis se fixe sur ADN.
 Multiples sites de fixation du Zn^{2+} : 2 de forte affinité, 3 de faible affinité.



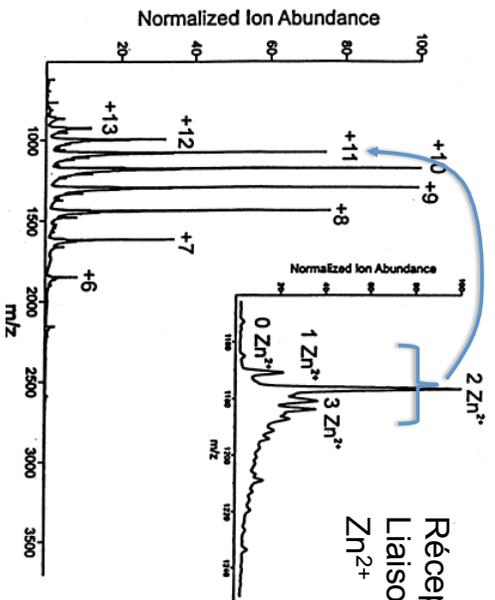
Veenstra Biophys Chem 1999



RAISON ?
 (exp démontrant que non lié à la force ionique)



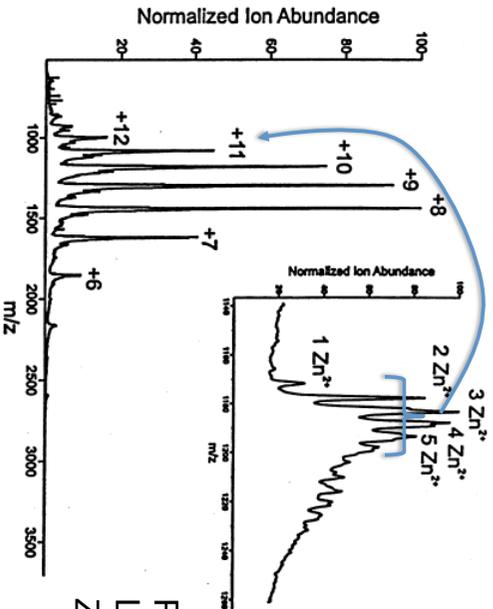
Veenstra Biophys Chem 1999



Récepteur + Zn^{2+} 100 μM :
Liaison majoritairement de 2 Zn^{2+}

Conclusion :

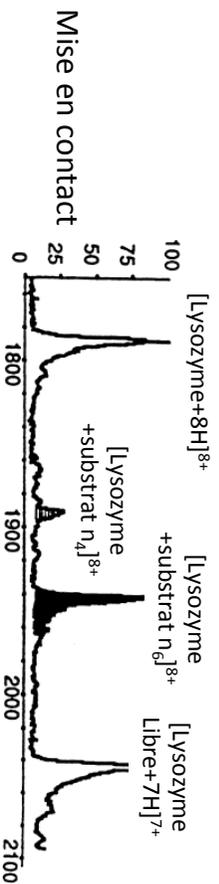
- la liaison de 2 Zn^{2+} sur les sites de forte affinité conduit à l'association récepteur-ADN



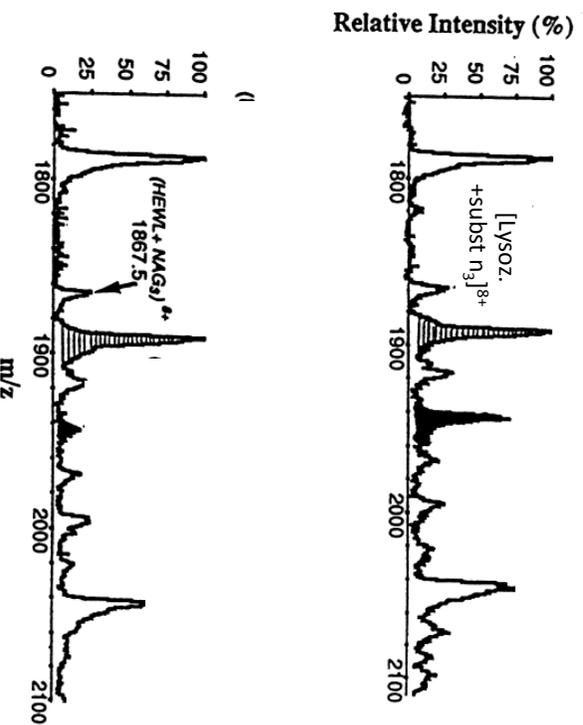
Récepteur + Zn^{2+} 200 μM :
Liaison majoritairement de 3 Zn^{2+}

Veenstra Biophys Chem 1999

Protéines - grosses molécules :

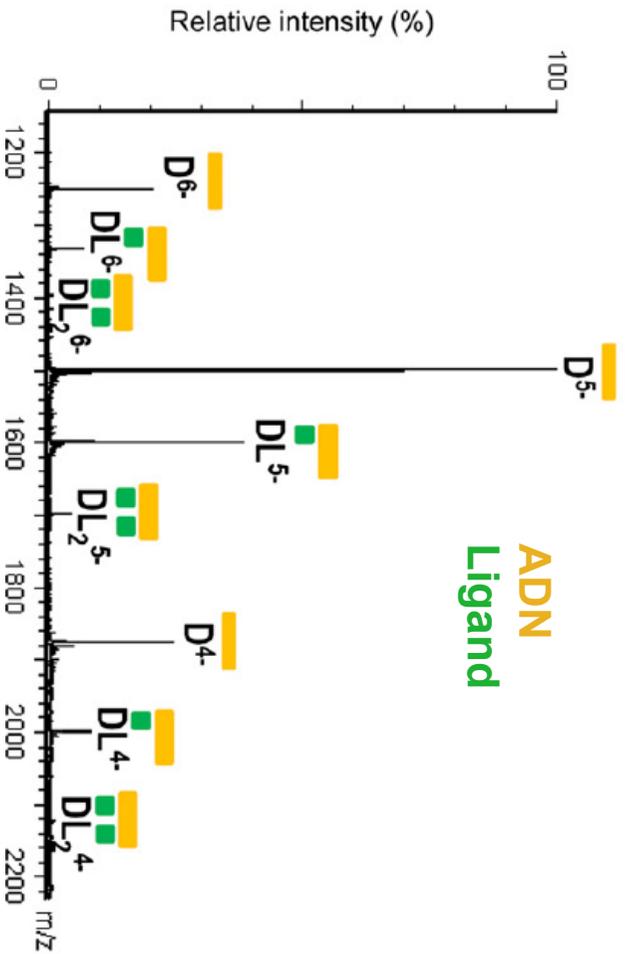


Temps croissant



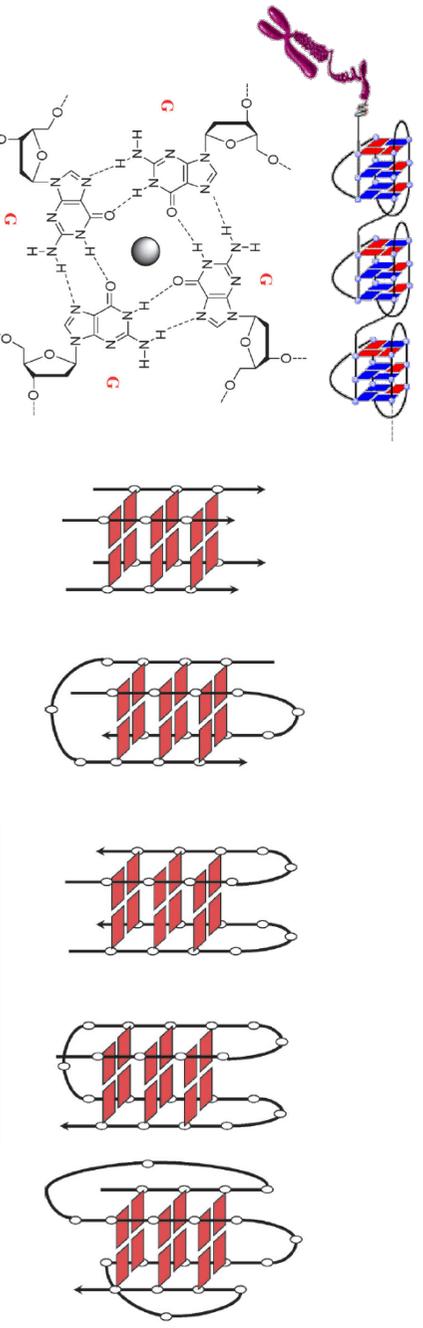
Veenstra Biophys Chem 1999

Acides nucléiques (ADN, ARN) - ligands :

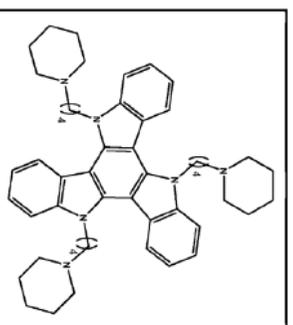
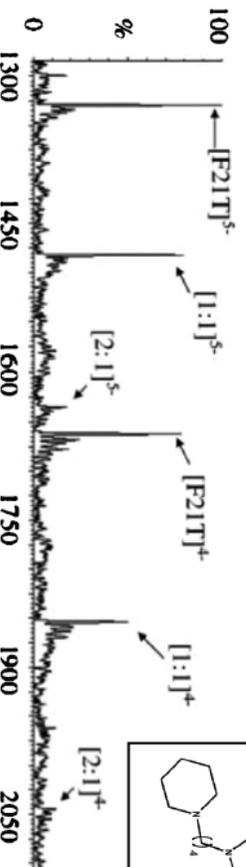


Rosu, *Biochimie*, 2008

Ligand de G-quadruplexes :



Complexes Quadruplex F21T : Azatrux

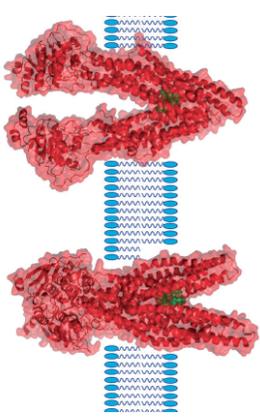


Murat, *Chem Soc Rev* 2011 :

Protéines membranaires - ligands :

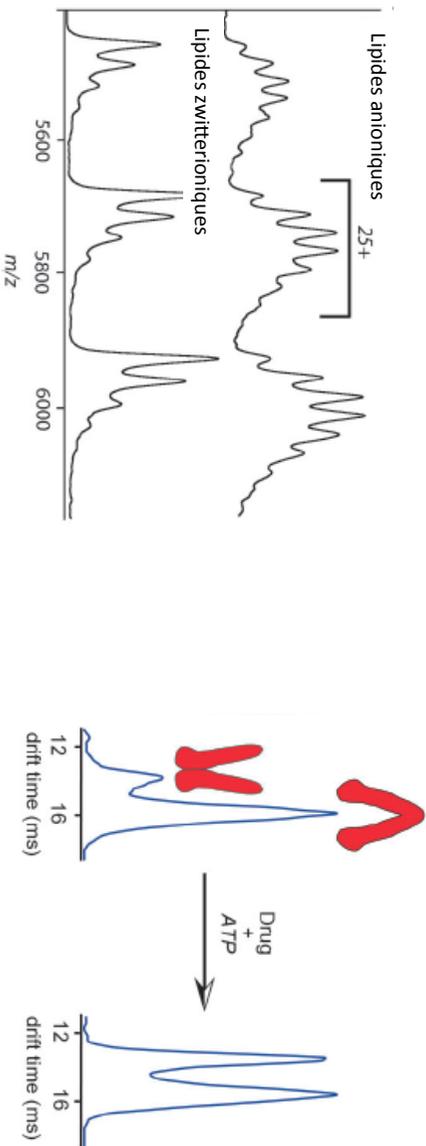
Un défi quelque soit la technique d'exploration !
ESI-MS à ses débuts dans ce domaine.

Astuce : encapsulation dans micelles de détergents, ionisation puis libération par collision. Peut libérer le ligand aussi !



Les 2 conformation de P-gp

Ex : P-gp : ATP-binding transporter, membranaire, 2 régions à 6 hélice transmembranaire.



Fixation préférentielle de lipides négatifs

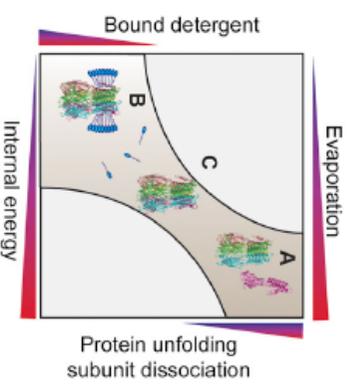
Effet d'un ligand objectivé par IM-MS

Hooper *Angew Chem* 2012, Marcoux, *Structure* 2013

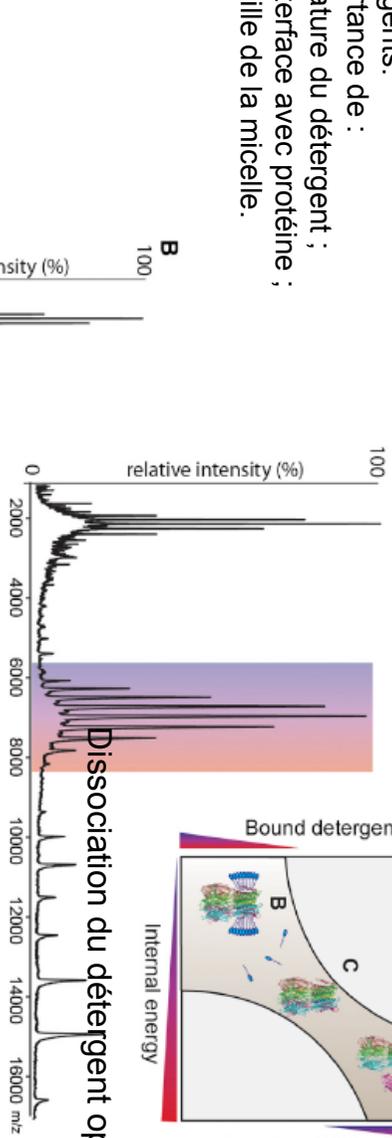
Comment libérer une protéine membranaire de sa micelle de détergent ? Il faut une énergie de collision importante, mais qui se dissipe dans la dissociation (perte de neutre) des molécules de détergents.

Importance de :

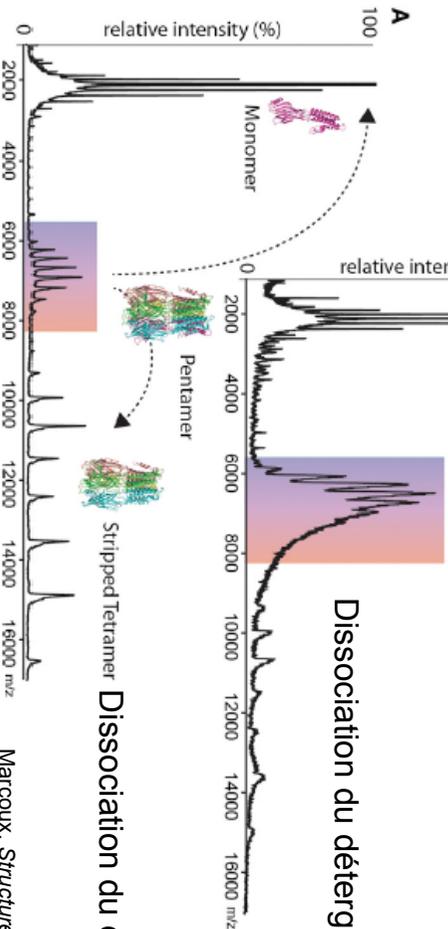
- Nature du détergent ;
- Interface avec protéine ;
- Taille de la micelle.



Dissociation du détergent optimale

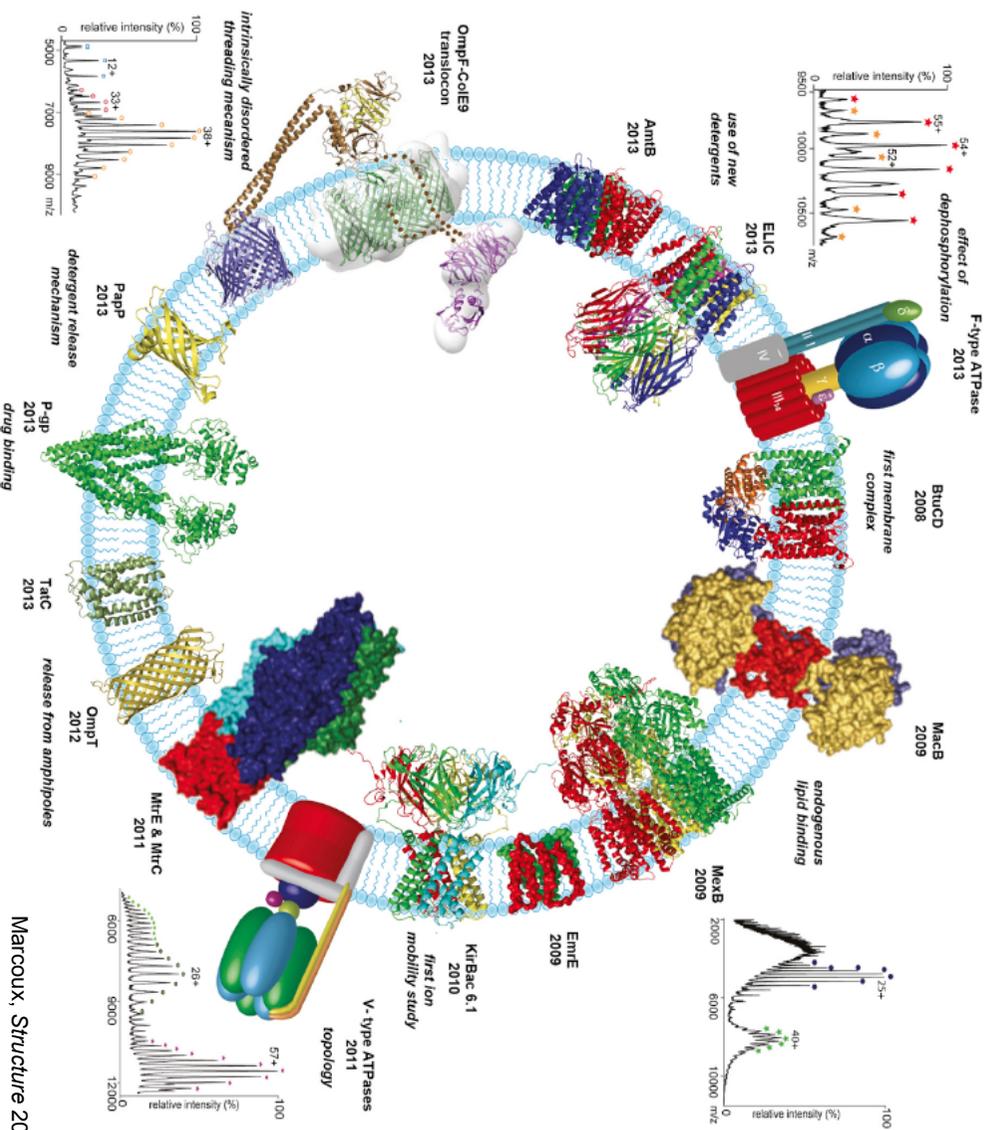


Dissociation du détergent inefficace



Dissociation du détergent excessive

Marcoux, *Structure* 2013



Marcoux, Structure 2013

Perspectives :

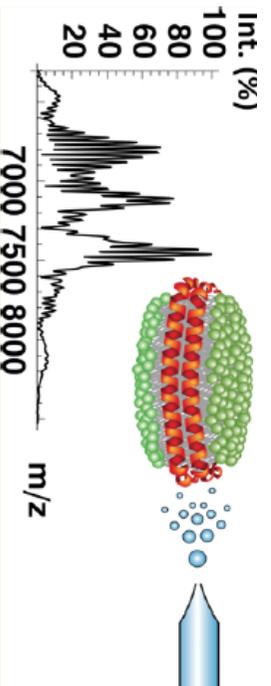
- Lors de la désolvatation, concentration des détergents : risque de dénaturation protéine.

Solutions :

- utiliser des détergents compatibles avec la MS et plus adaptés :
- mimer la membrane avec des surfactants amphiphiles
- nanodiscs...
- Observer une pompe membranaire « en action »...
- Observer la membrane autour du récepteur...

TABLE 1 | Nonionic detergents compatible with mass spectrometry of intact membrane protein complexes.

Detergent	Abbreviation	CMC (%) ^a
Glucosides		
<i>n</i> -Octyl-β-D-glucopyranoside	OG	0.53
<i>n</i> -Nonyl-β-D-glucopyranoside	NG	0.2
Thioglucoisides		
<i>n</i> -Octyl-β-D-thioglucoopyranoside	OTG	0.28
Maltosides		
<i>n</i> -Decyl-β-D-maltopyranoside	DM	0.087
<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltopyranoside	DDM	0.0087
<i>n</i> -Undecyl-β-D-maltopyranoside	UDM	0.029
<i>n</i> -Tridecyl-β-D-maltopyranoside	TDM	0.0017
Gymal-5	Gy5	0.12
Gymal-6	Gy6	0.028
Thiomaltosides		
<i>n</i> -Dodecyl-β-D-thiomaltopyranoside	DDTM	0.0026
Alkyl glycosides		
Octyl glucose neopentyl glycol	OGNG	0.058
Polyoxyethylene glycols^b		
Triton X-100	TX100	0.015



Marcoux, Structure 2013 ; Laganowsky, Nat Protocols 2013 ; Marty, Anal Chem 2012

IV – Protocoles et informations obtenues

Abordés ici :

- Couplages ;
- Détermination de K_D ;
- Changement de conformation ;
- SAR par MS ;
- Criblage...

Couplages :

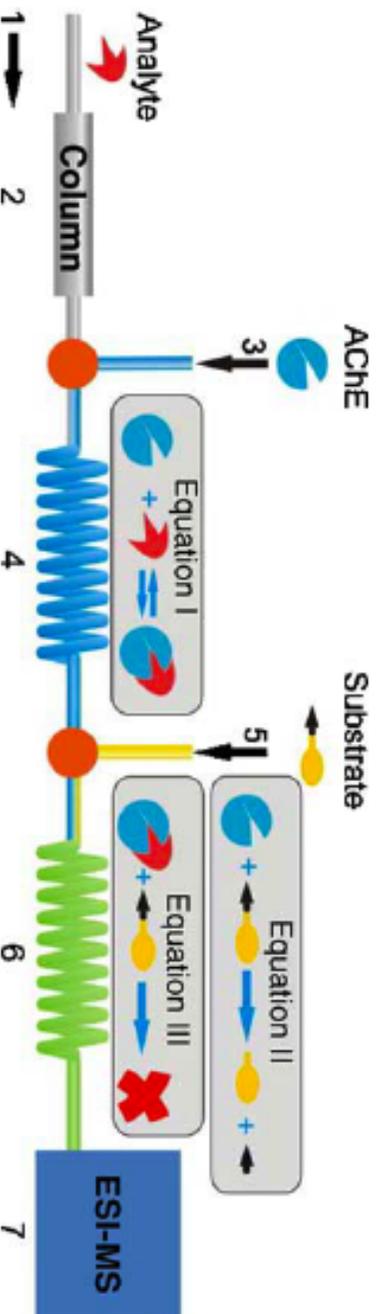
La MS utilisée dans des tests biologiques en ligne:

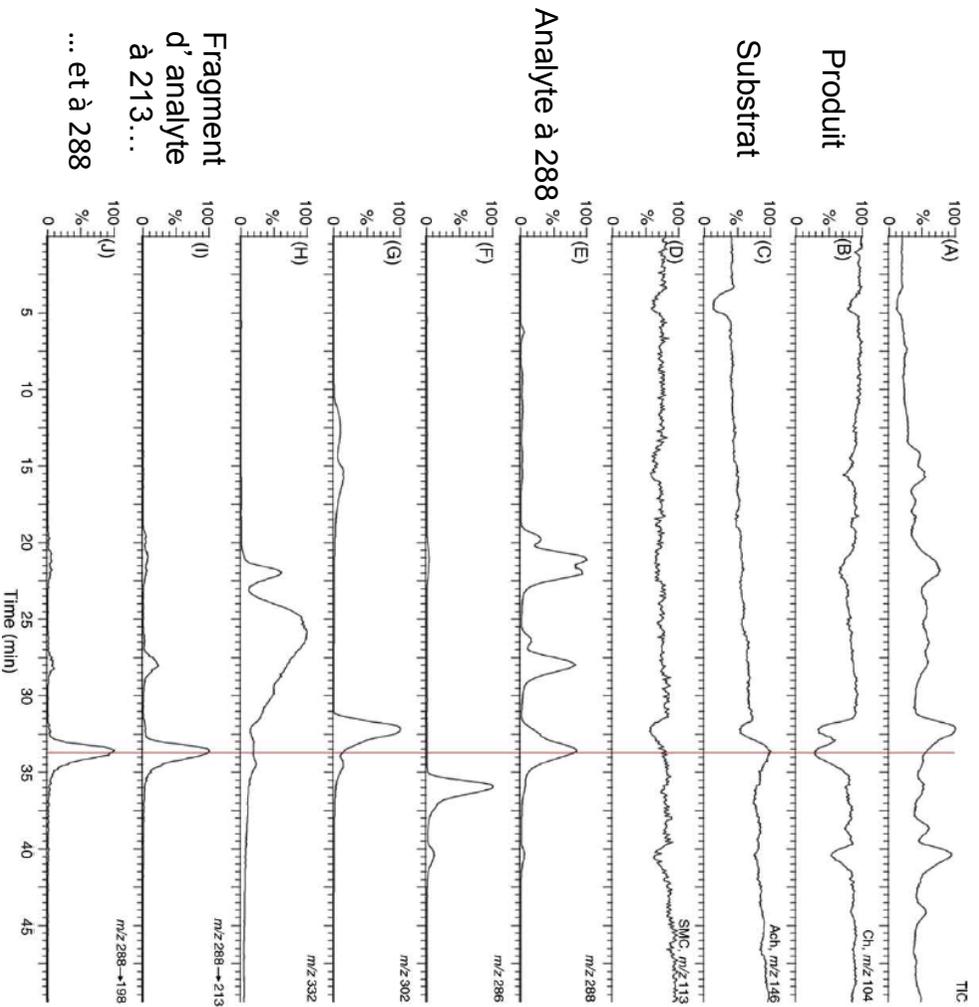
1) Réactions enzymatiques :

- Les réactions enzymatiques se font en milieu liquide;
- Les enzymes cytosoliques sont des protéines libres et solubles.

Donc: il est possible de reproduire une réaction enzymatique sur l'éluat d'une colonne HPLC.

Exemple 1 : détection de molécules inhibant l'acétylcholinestérase :





2) Affinité ligand/récepteur :

-Est-il possible de détecter une liaison entre un ligand et son récepteur ?

Exemples

Détection de ligands du récepteur aux œstrogènes alpha dans la grenade, par déplacement du coumestrol (= diminution de la fluorescence du produit):

Le coumestrol change de fluorescence selon qu'il est libre ou lié au récepteur.

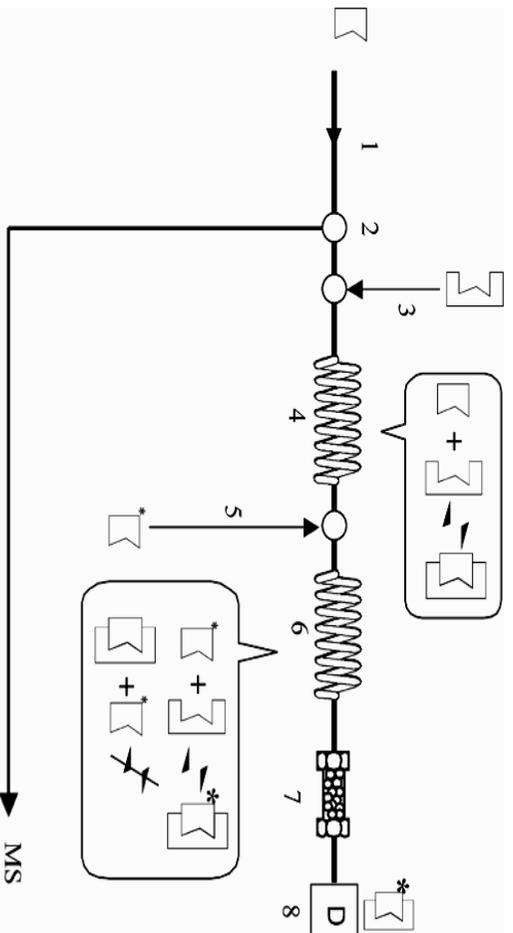
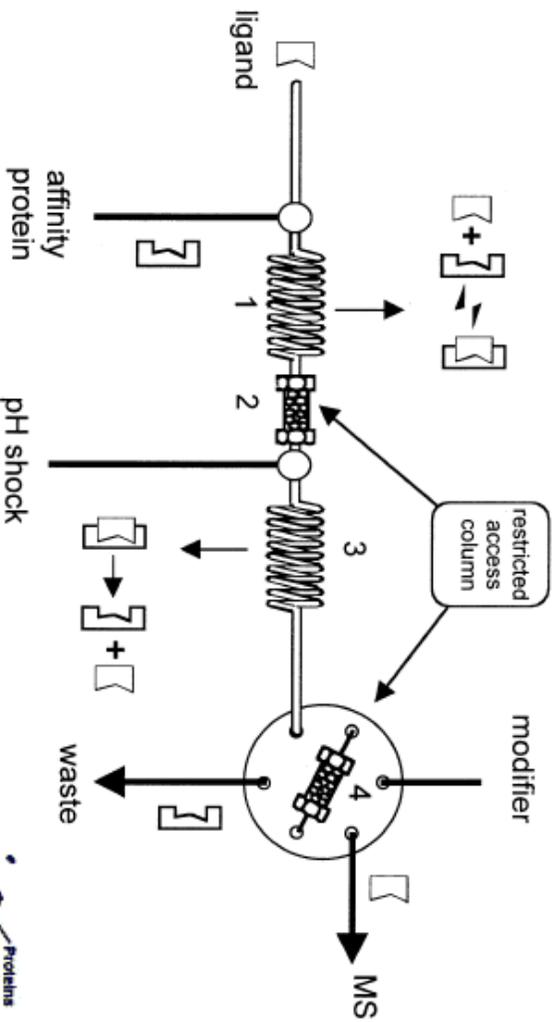
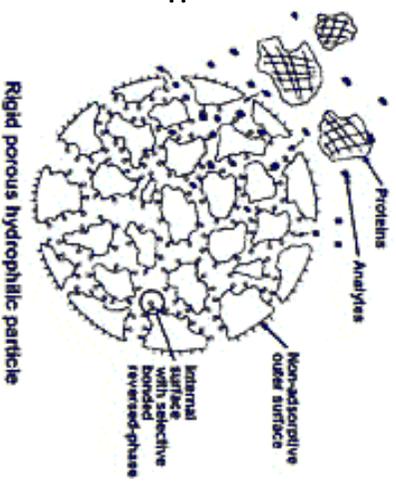


Fig. 1. Configuration of the on-line β -ER bioassay. (1) BioGradient effluent; (2) flow splitting to biochemical assay and MS; (3) reagent pump for β -ER solution; (4) reaction coil; (5) reagent pump for coumestrol solution; (6) reaction coil; (7) restricted access column (2 \times 5 mm, C18 ADS); (8) fluorescence detector (D).

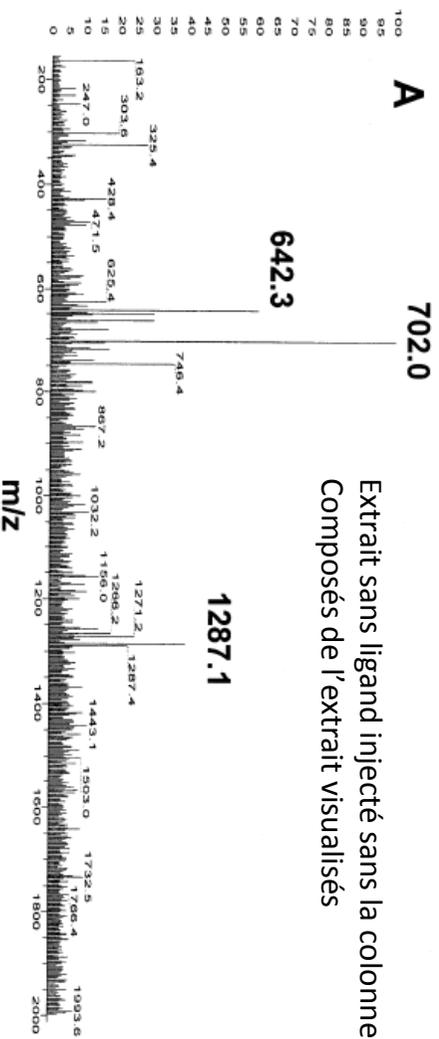
2) Criblage de ligand puis dissociation par RAM



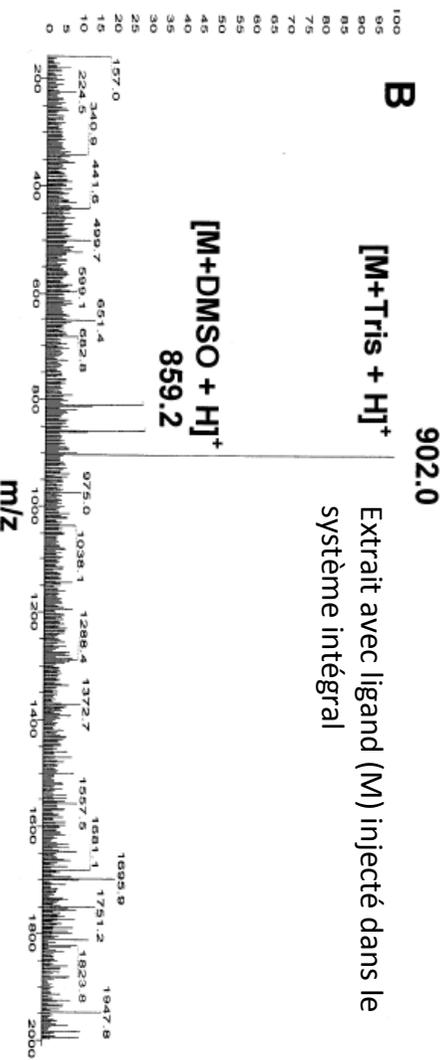
Ram medium :



van Elswijk, *Int J Mass Spec*, 2001



Extrait sans ligand injecté sans la colonne RAM N°1 :
Composés de l'extrait visualisés



Extrait avec ligand (M) injecté dans le système intégral

Détermination de K_D :

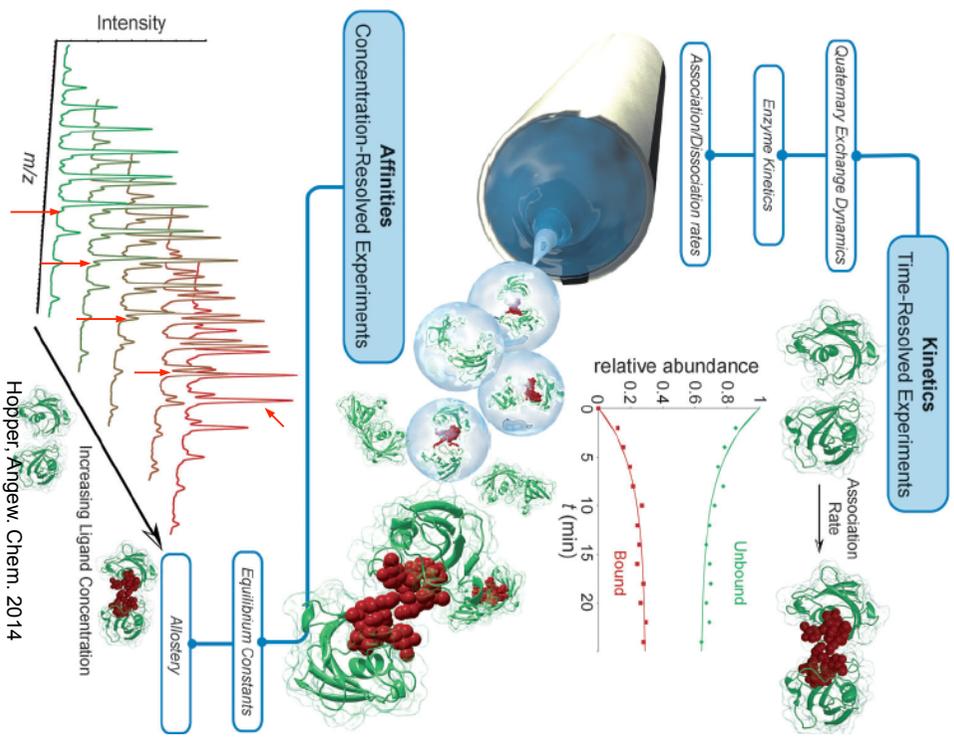
De nombreuses méthodes de détermination par MS, 2 types :

Via le contrôle des concentrations :

- Préparation de plusieurs mélanges variant par le rapport ligand/cible ;
- Incubation suffisante mais identique ;
- Acquisition de spectres à l'équilibre ;

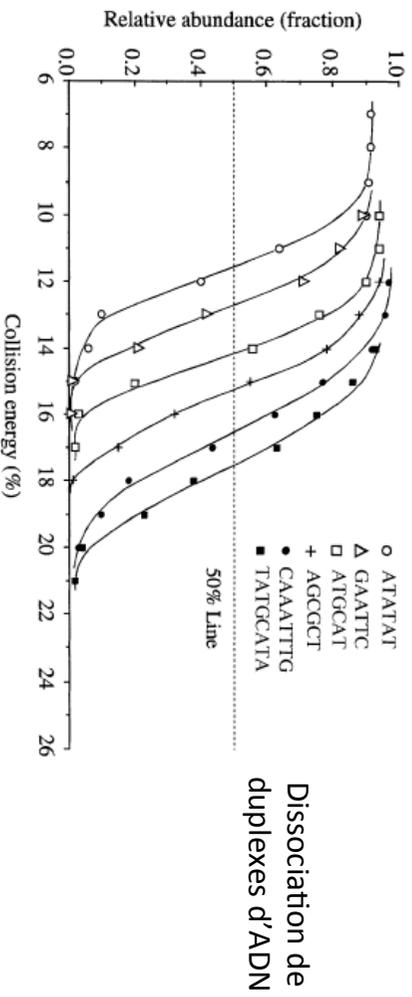
Via le contrôle cinétique :

- Incubation d'un mélange donné ;
- Mesure de l'association au cours du temps.



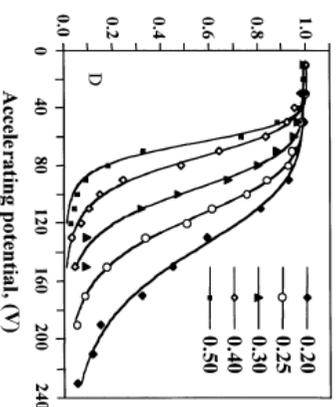
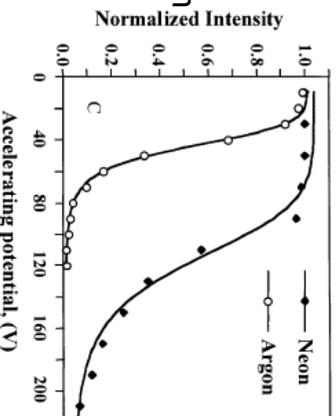
Kempen, *Anal Chem* 2000 ; Jaquillard, *J Am Soc Mass Spec* 2012 ; Rosu *Biochimie* 2008 ; Hofstadler, *Nat Rev* 2006, Daniel *Int J Mass Spec* 2002, Kitova *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 2012

Ex. de méthode de détermination des K_D : via CID



Mais très sensibles aux paramètres expérimentaux :

Influence du gaz de collision



Influence de la pression du gaz de collision (ici Kr)

Rq : CID possible dans cellule de collision, mais aussi dans le fragmenteur !

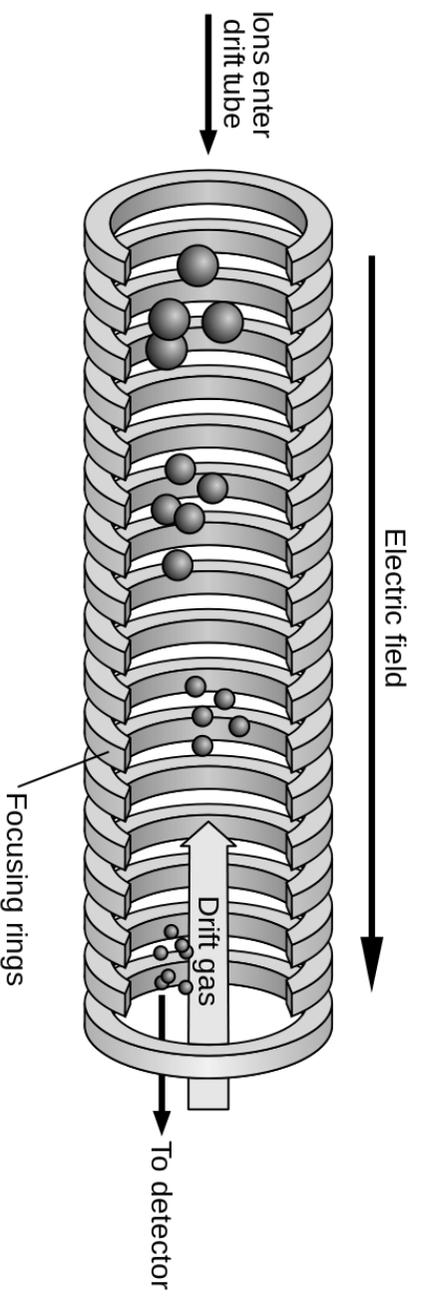
Les K_D déterminés par MS corrélient-ils avec des K_D en solution ?

- K_D en solution = gold standard ;
- Corrélation très bonne si essentiellement liaisons ioniques
Plus aléatoire si liaisons hydrophobes impliquées.
Pas de règle ni de consensus.
Par contre, l'ordre relatif des affinité toujours très corrélées au *in vitro*.

Détermination de l'allostérie

= liaison d'un modulateur entraîne un changement conduisant à une autre liaison (ex : fixation coopérative du Ca^{2+}).

Intérêt de l'exploration par IM-MS :

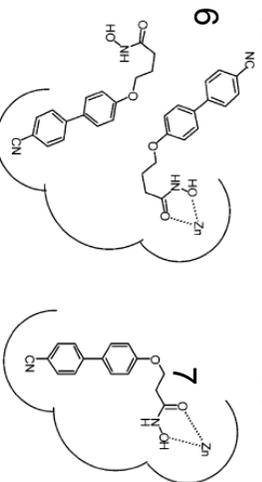


SAR by MS :

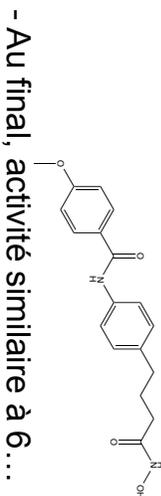
Ex. de détermination de ligands de la MMP-3 stromélysine.

Méthode :

- Liaisons des composés 6 et 7 (ligands connus) quantifiée et caractérisée : 6 dans un rapport 1:2 et 7 dans un rapport 1:1;



- Déconstruction en fragments 1-5, affinité quantifiée ;
- Conception d'un composé nouveau :



Compd	Ligands	K_d (μ M) Mass Spec. ^a	K_d (μ M) NMR
1		223 ± 0.15	160 ± 0.15
2		300 ± 0.06	170 ± 0.03
3		20 ± 0.003	20 ± 0.01
4		460 ± 0.11	480 ± 0.27
5		10,000	17,000
6		23 ± 0.29	N/D
7		8 ± 1.1	N/D

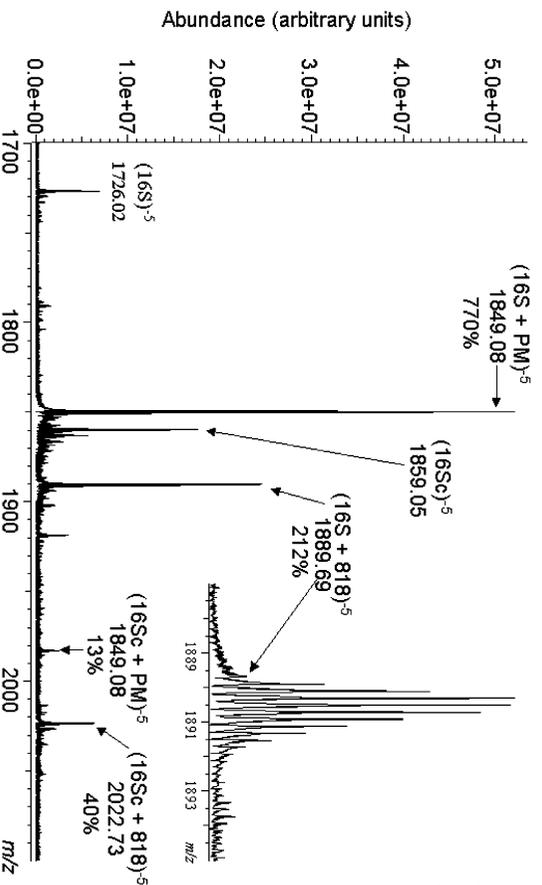
Ockey, *Bioorg Med Chem* 2004

Criblage :

Différentes mises en œuvre :

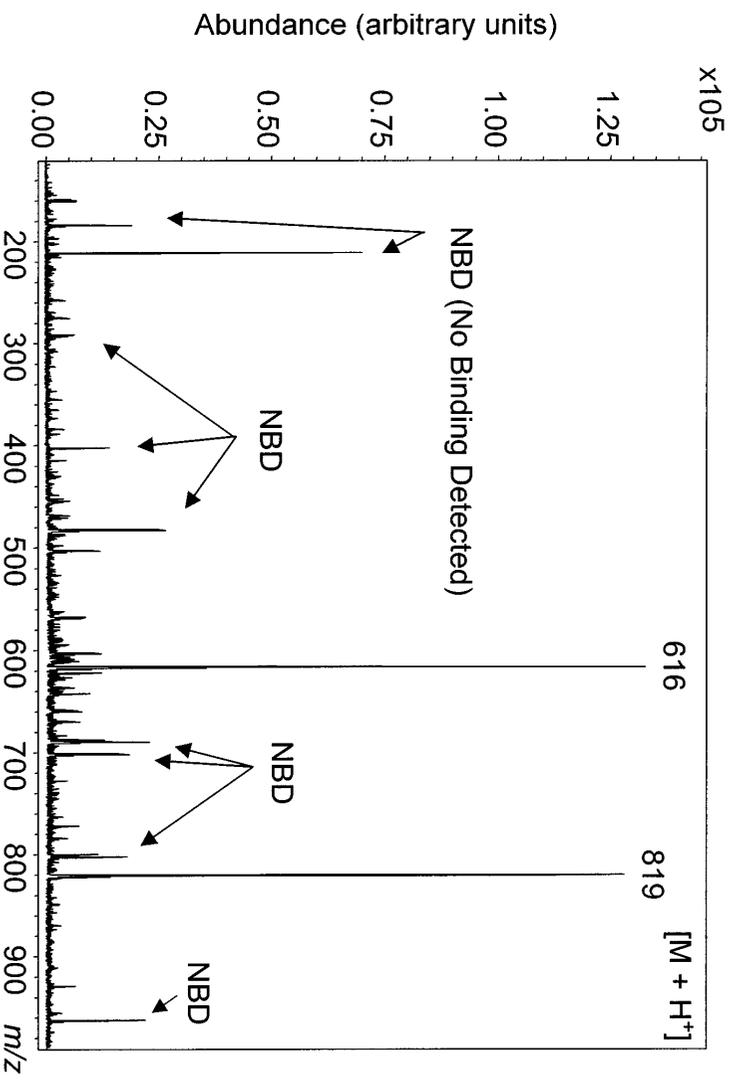
Exemple 1 : Multitarget Affinity/Specificity Screening (MASS)

- Cible : RNA synthétique mimant l'ARN ribosomal 16S (ligands = arrêt synthèse protéique) ;
- Métabolites secondaires (fractions sur C18 10 mm ID, 135 fractions) de *Streptomyces rimosus* ;
- Sur FT-ICR ;



- Fraction 146 + Protéine :
- Liaison de la paromomycine
 - Autre ligand inconnu 818

MS de la fraction 146 seule :
818 : autre aminoside.



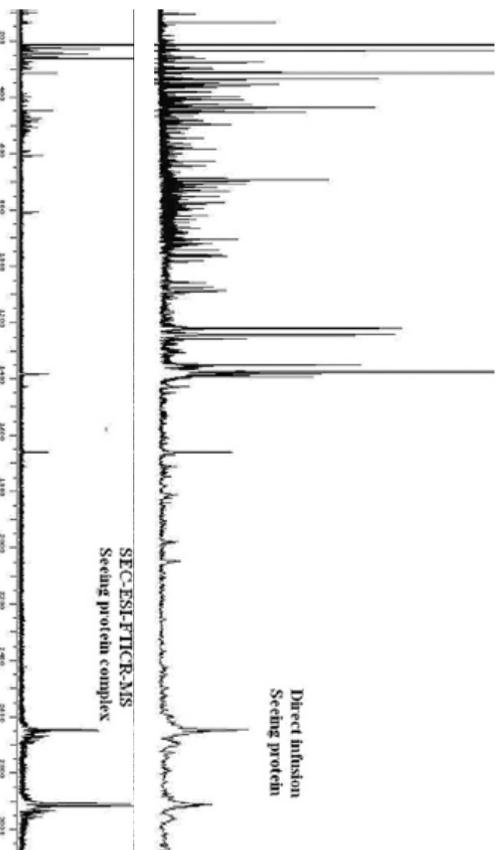
Cummins, *J Nat Prod*, 2003

Exemple 2 :

- 85 extraits MeOH, 200 mg dans 5 mL, 10µl testé sur anhydrase carbonique 34 µM
- Sur SEC-ESI-TC-ICR MS

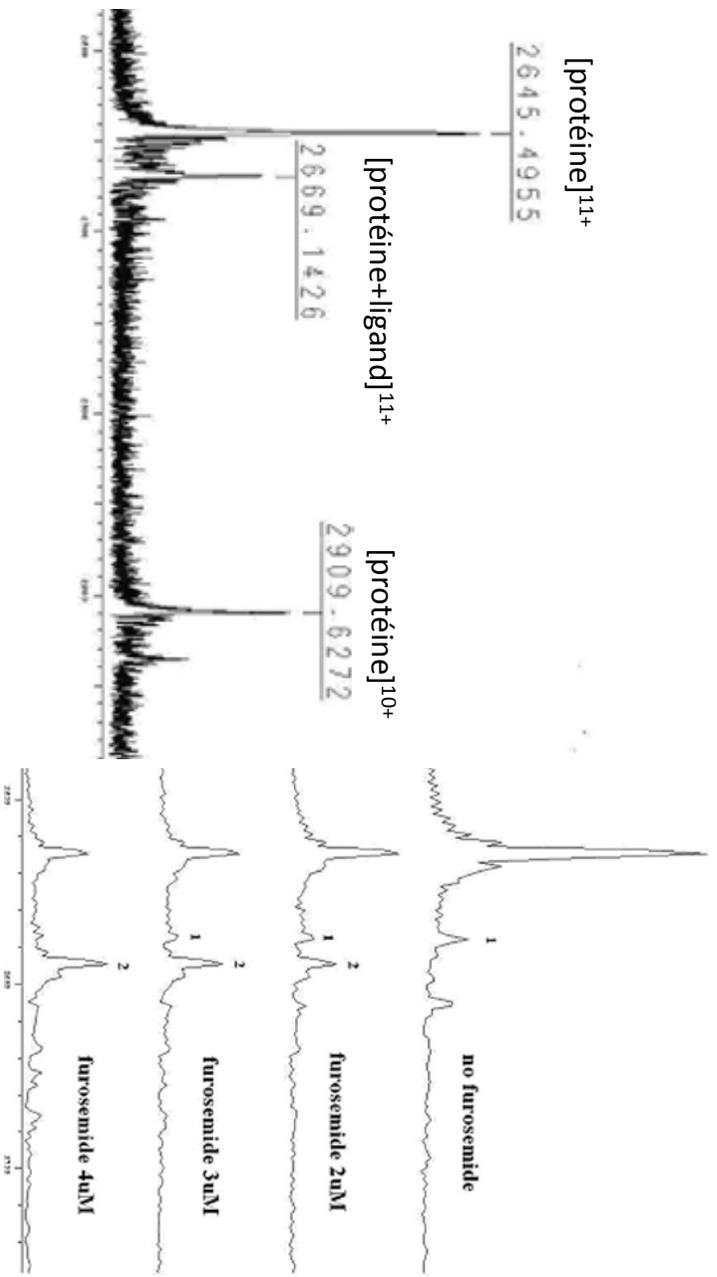
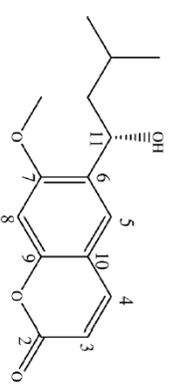
SEC :

- sert à éliminer les petites molécules avant analyse.
- Doit être courte : 4X10 mm de Sephadex G25 faite maison : préserve complexes mais ne sépare pas toutes les petites molécules.



Vu, *J Biomedec Screening* 2008

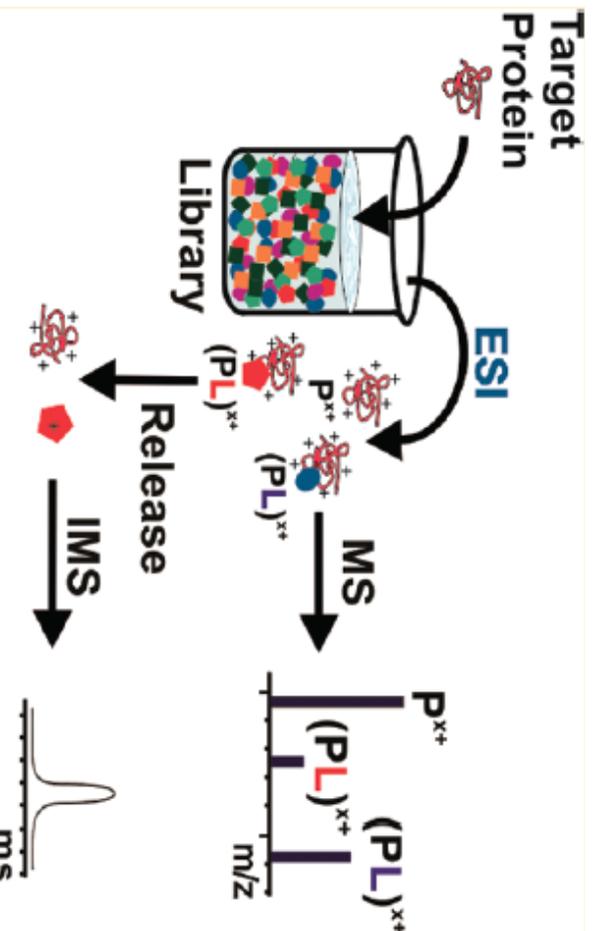
- Isolement d'une coumarine de Rutacée australienne ligand de l'AC
- Compétition avec furosemide évaluée par MS : ligand compétitif

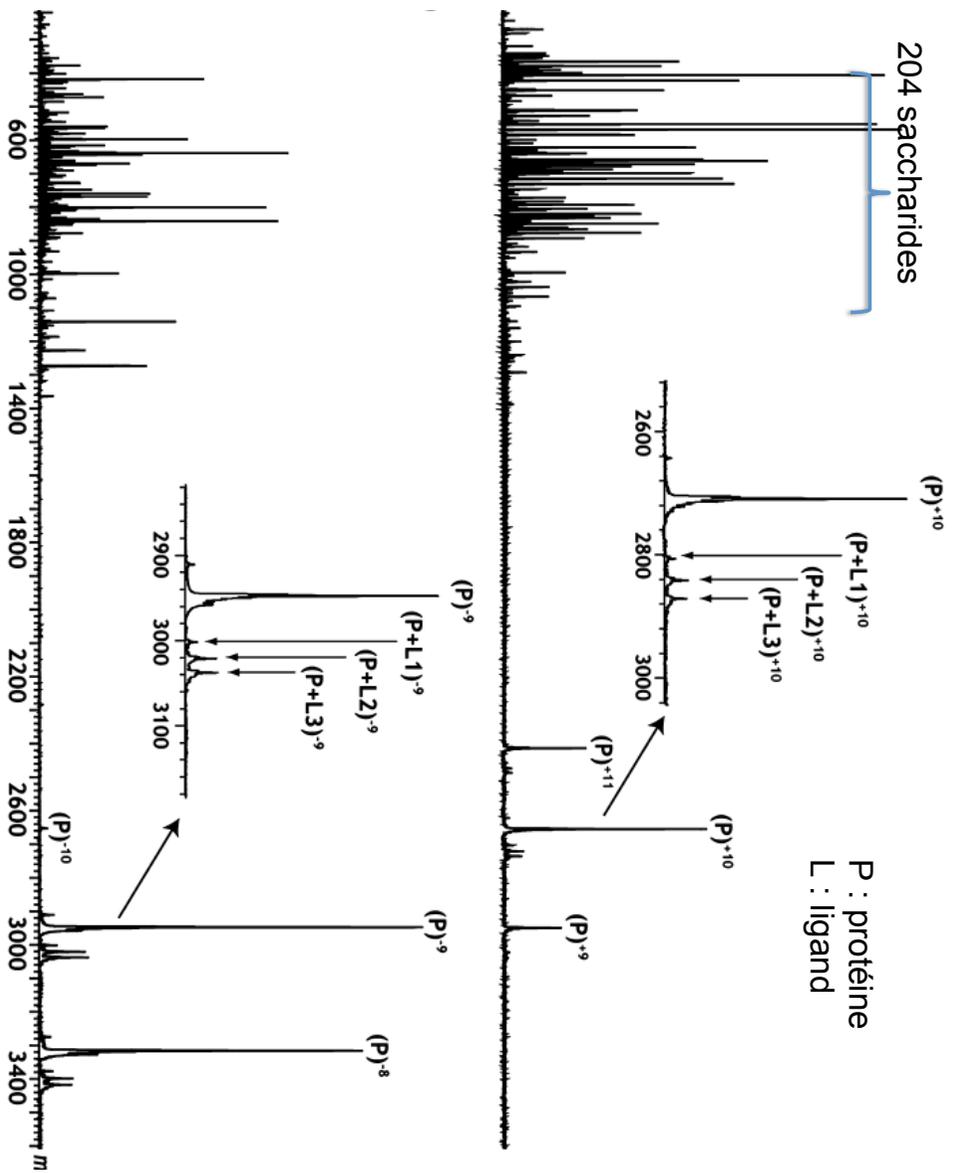


Exemple 3 :

« Catch & release » :

- Anticorps monoclonal (scFv, 5 μ M) ;
- Mélange modèle de saccharides (240 sucres de 2 à 22 oses, 1 μ M), contenant 3 ligands connus.
- Sur Q-IMS-ToF, nano-ESI.
- Ont distingué les isomères par fragmentation ;





Exemple 4 : Criblage de molécules antiplasmodiales



K. Muñoz, A. Maciuk, K. Spelman, P. Grellier, B. Figadère, *Anal Chem* 2011,12

I - Les hématophages font du tri sélectif...

1) *In vitro* : tester les composés/extraits sur parasites vivants :
Coûteux, marqueurs radioactifs, chronophage...

2) Approche ciblée : interférer avec le système de détoxification de l'hème

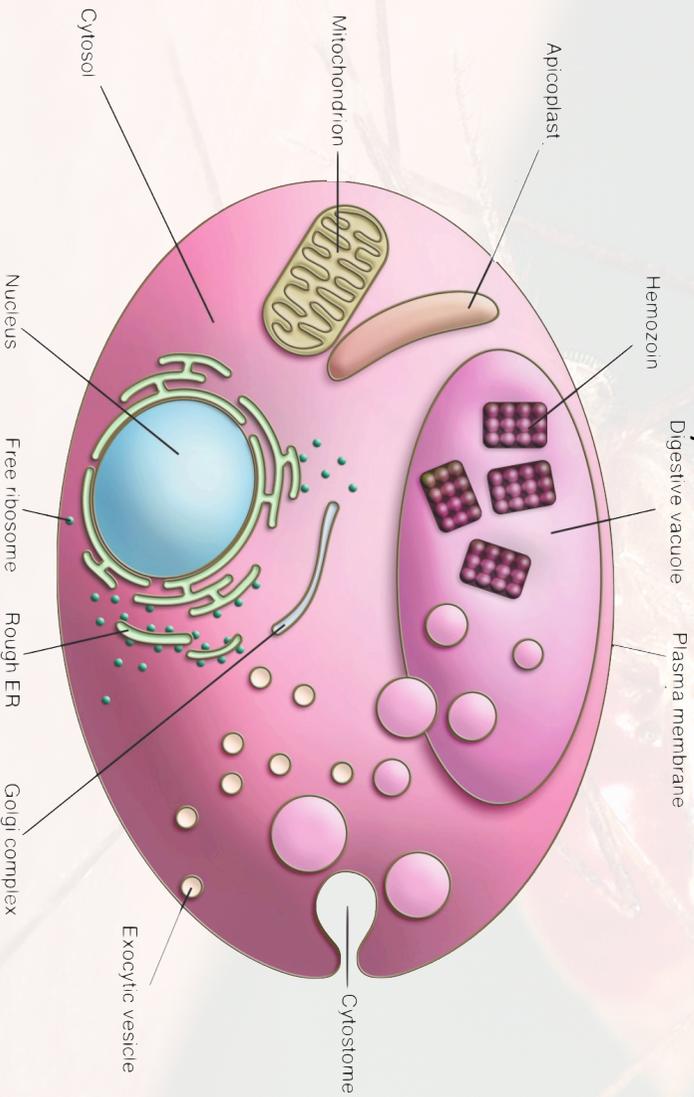
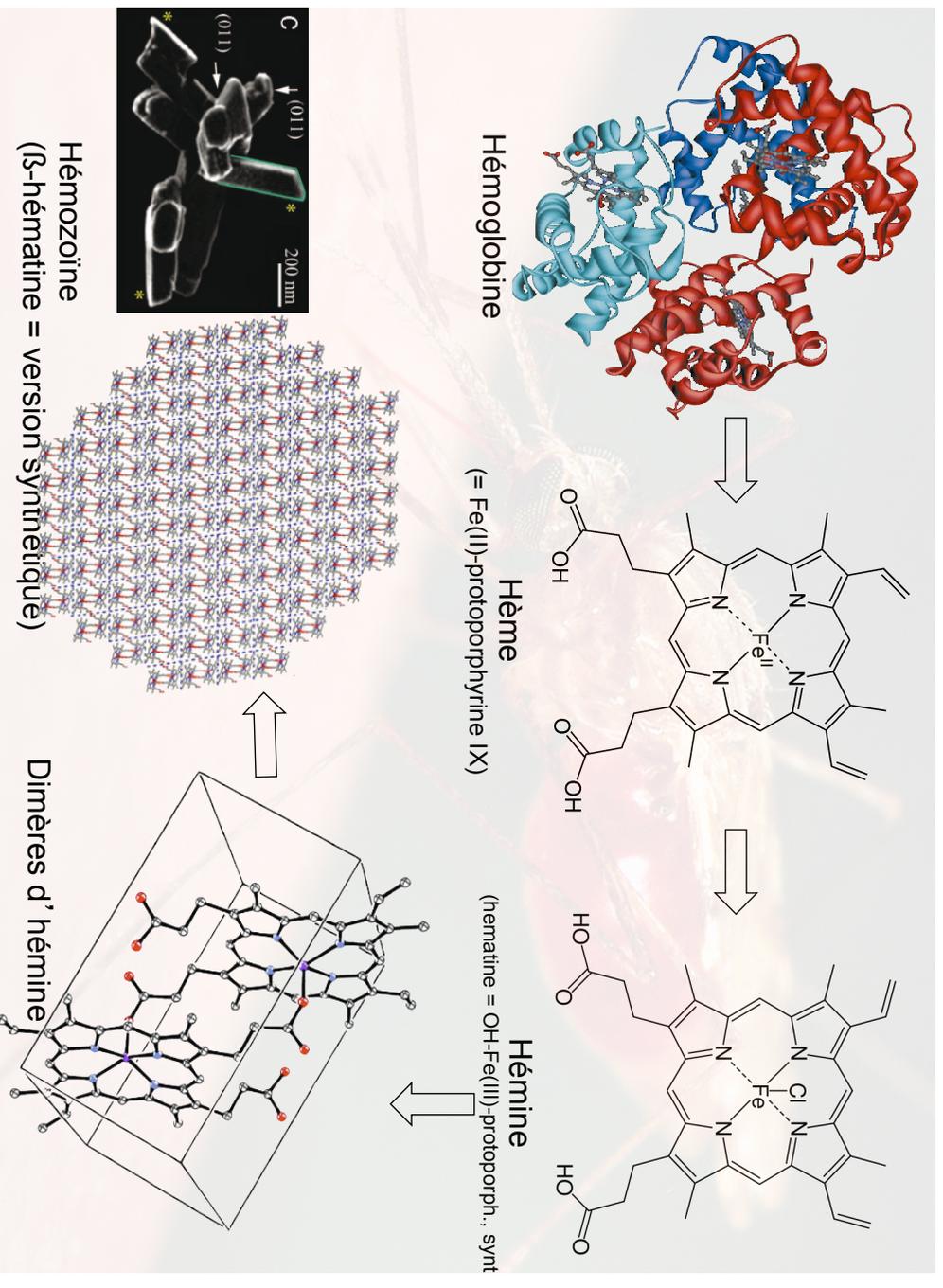


Figure d' après : Malaria: progress, perils, and prospects for eradication, Brian M. Greenwood et al. J. Clin. Invest. 118(4): 1266-1276 (2008)



III - Comment détecter des composés ciblant l'hème ?

- CLASSIQUÉMENT :

- Séparation des espèces libres ou complexées, mesure UV en milieu basique (405nm)
- Mesure UV d'un complexe hématine libre+pyridine en milieu acide 405 nm.
- calorimétrie
- polymérisation de l'hème
- inhibition de croissance de cristal
- radiomarquage...

INCUBATIONS LONGUES, PROTOCOLE COMPLEXES, VARIABILITÉ...

TECHNIQUES RÉCENTES:

- IR, RMN, RX, microscopie à balayage...

POUR ANALYSES STRUCTURALES SEULEMENT.

III - Comment détecter des composés ciblant l'hème ?

OBJECTIF :

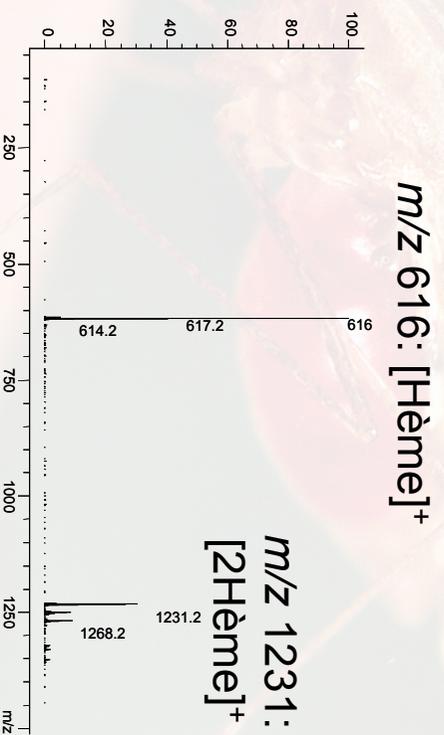
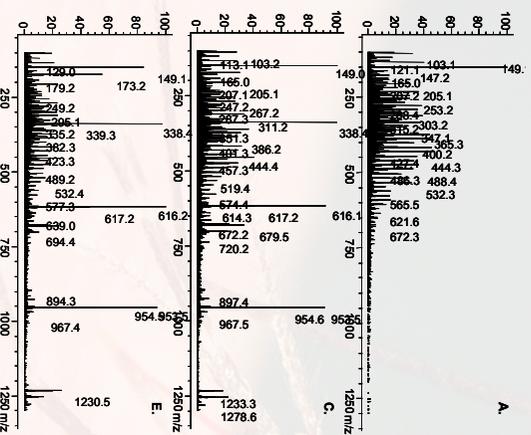
Détecter les adduits avec l'hème
par spectrométrie de masse

DÉMARCHE :

- Optimiser paramètres de détection
- Valider la méthode avec témoins positifs et négatifs
- Tester la méthode avec des extraits
- Tester la méthode avec une chimiothèque.

IV - Une méthode nouvelle à mettre au point

A - Mise au point des conditions: solubilisation, chambre de nébulisation, voltages...



m/z 616: [Hème]⁺

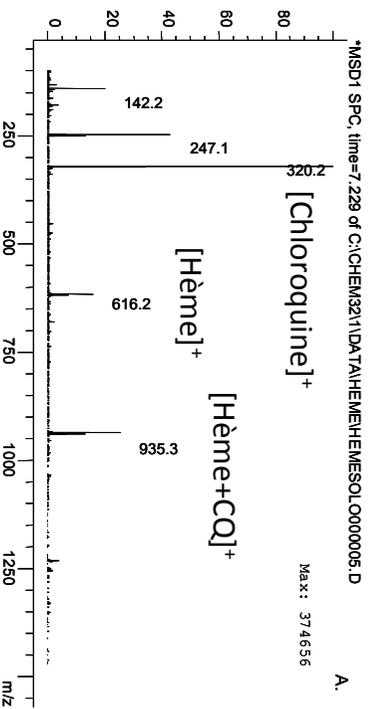
m/z 1231: [2Hème]⁺

Solubilisation:

Fe(III)-protoporphyrine: 5mM H₂O/NH₃ pH 11

Fe(II)-protoporphyrine: 5mM, GSH, DMSO puis méthanol.

B - Applications aux quinolines



Autres quinolines :

Quinine : [Hème+Q]⁺ m/z 940, [2Hème+Q-2H]⁺ m/z 1555

Quinacrine : [Hème+Qn-C-H]⁺ m/z 1015

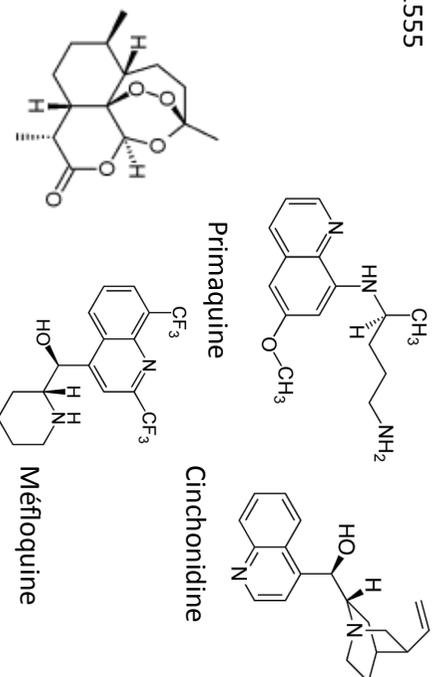
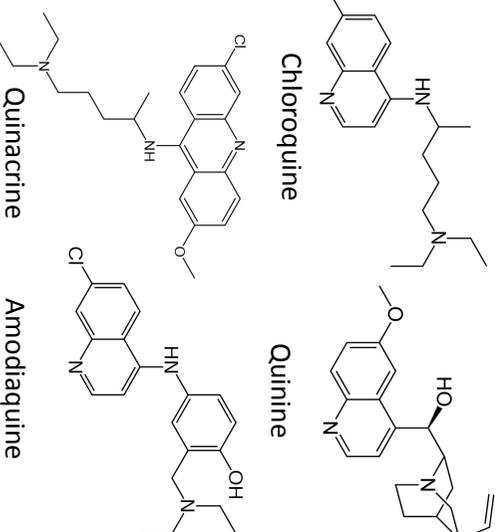
Amodiaquine : [Hème+Amd]⁺ m/z 970

Méfloquine : [Hème+Mef-H]⁺ m/z 995

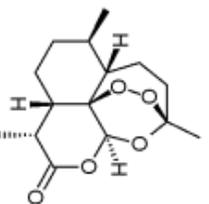
Cinchonidine : [Hème+Cin+H]⁺ m/z 912

Primaquine: [Hème+Pmq]⁺ m/z 875

Artémisinine : [Hème+Art]⁺ m/z 898



Artémisinine



C - Applications à d' autres molécules antiparasitaires

ADDUITS ?

Azoles : ketoconazole, miconazole, clotrimazole
mécanisme : chélation Ca^{2+} et inhibition hémopoïne.

Antibiotiques : doxycycline, clindamycine
mécanisme : interfèrent avec apicoplaste.

Biguanides : metformine, phenformine
mécanisme : chélateurs de Zn, Fe, Cu...

Antiseptique : triclosan
mécanisme : inhibition synthèse acides gras.

Dinitroanilines (herbicides) : trifluraline, oryzaline, chloroprotham
mécanisme : inhibiteurs de microtubules.

Antifolates : sulfadoxine, pyriméthamine
mécanisme : interfèrent avec métabolisme folate.

C - Applications à d' autres molécules antiparasitaires

ADDUITS ?

Azoles : ketoconazole, miconazole, clotrimazole
mécanisme : chélation Ca^{2+} et inhibition hémopoïne.

OUI

Antibiotiques : doxycycline, clindamycine
mécanisme : interfèrent avec apicoplaste.

OUI

Biguanides : metformine, phenformine
mécanisme : chélateurs de Zn, Fe, Cu...

OUI

Antiseptique : triclosan
mécanisme : inhibition synthèse acides gras.

NON

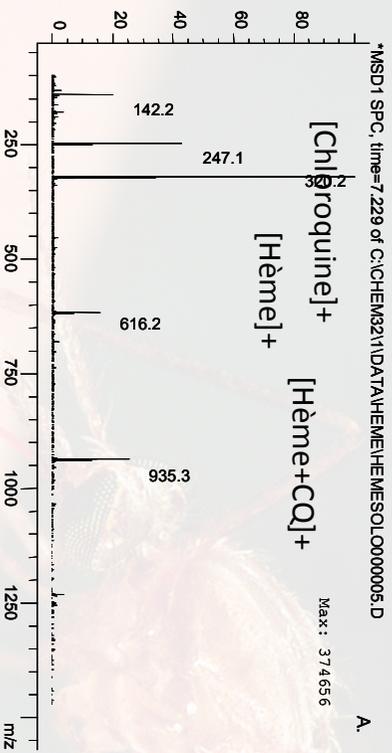
Dinitroanilines (herbicides) : trifluraline, oryzaline, chloroprotham
mécanisme : inhibiteurs de microtubules.

NON

Antifolates : sulfadoxine, pyriméthamine
mécanisme : interfèrent avec métabolisme folate.

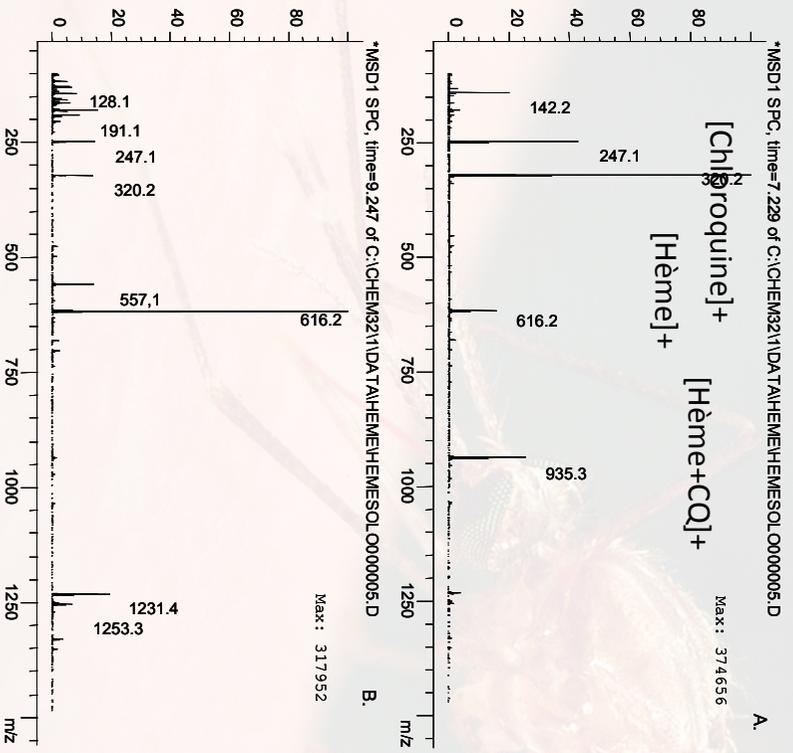
OUI/NON

D - Études de stabilité



Fragmenteur 150 V

D - Études de stabilité



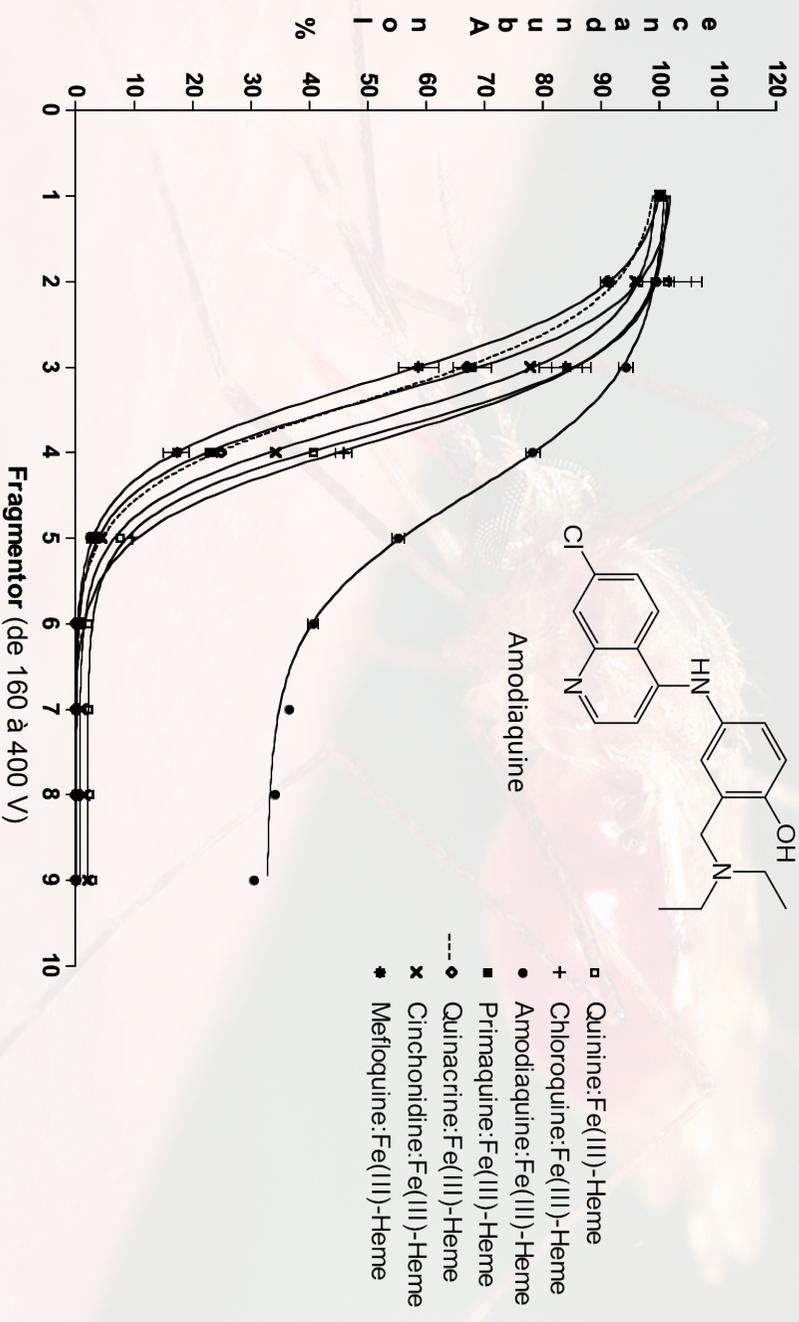
Fragmenteur 150 V



Fragmenteur 250 V

D - Études de stabilité

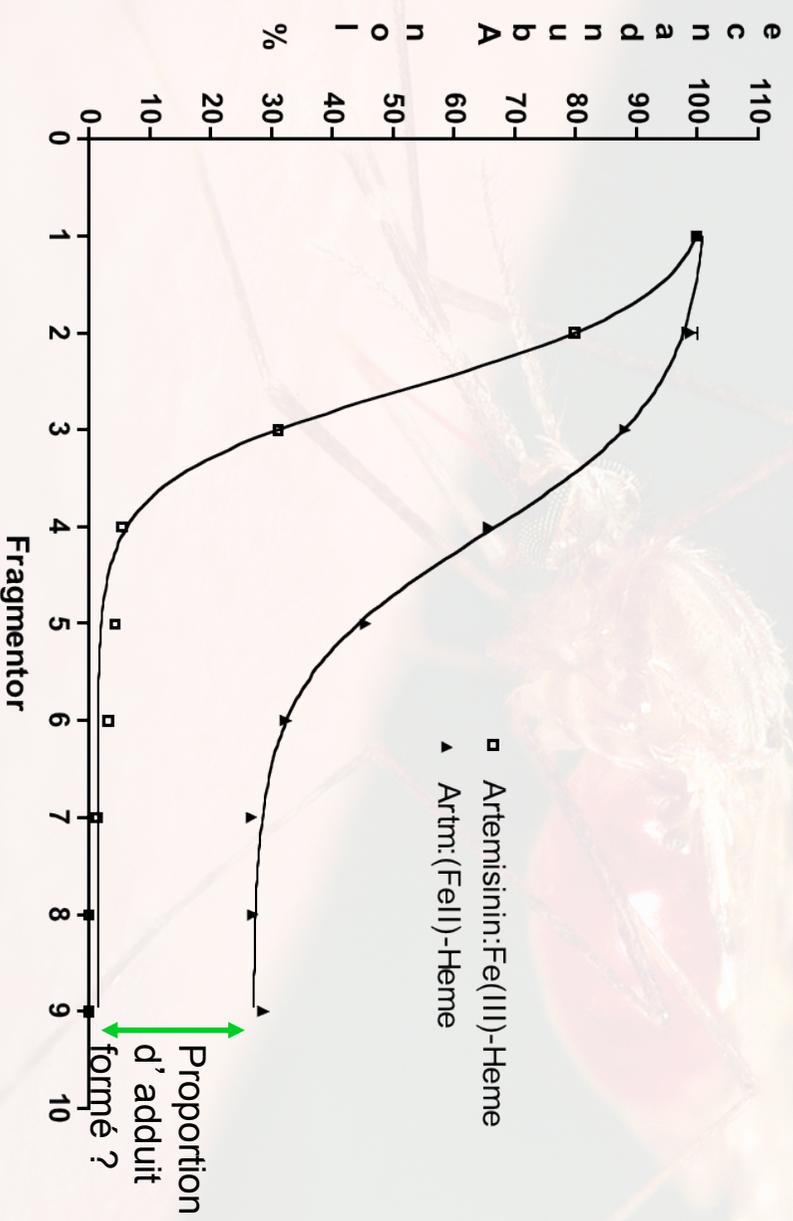
Quinoléines :



En pratique : simple quadrupole (Pharmacognosie) ou triple quadrupole (SAMM).

D - Études de stabilité

Artémisinine :



E - Application à un extrait naturel



- Extraction of alkaloids
- Incubation with heme
- Analysis
- Results:

$m/z = 940$: [Hème+quinine/quinidine]⁺

$m/z = 910$: [Hème+cinchonine/cinchonidine]⁺

Interest of such biological dereplication:

- Compounds potentially active are detected
- Directly in the extract without isolation
- With an structural indication:

Allows targeted isolation for structural elucidation and activity confirmation.

F - Application à une chimiothèque

- Two random 96-wells plates tested (160 products)
- In HTS screening (96-wells plates).
- 18 compounds forming adducts (=22%)
- These compounds tested on living parasites (*Plasmodium falciparum* F32 and K1 strain)

- Results:

- F32 (chloroquine-sensitive): 76% active
- K1 (chloroquine-resistant): 47% actives.

Conclusion :

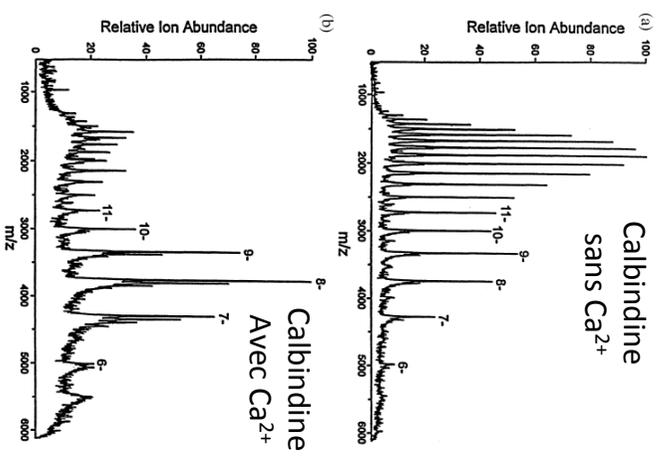
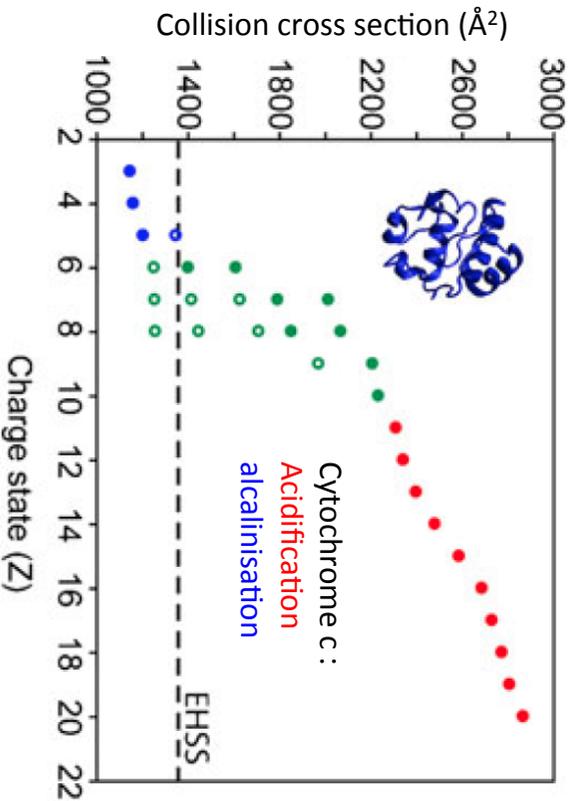
Hit-to-lead preliminary score very high (classical HPI assays : 8%).



Changement de conformation :

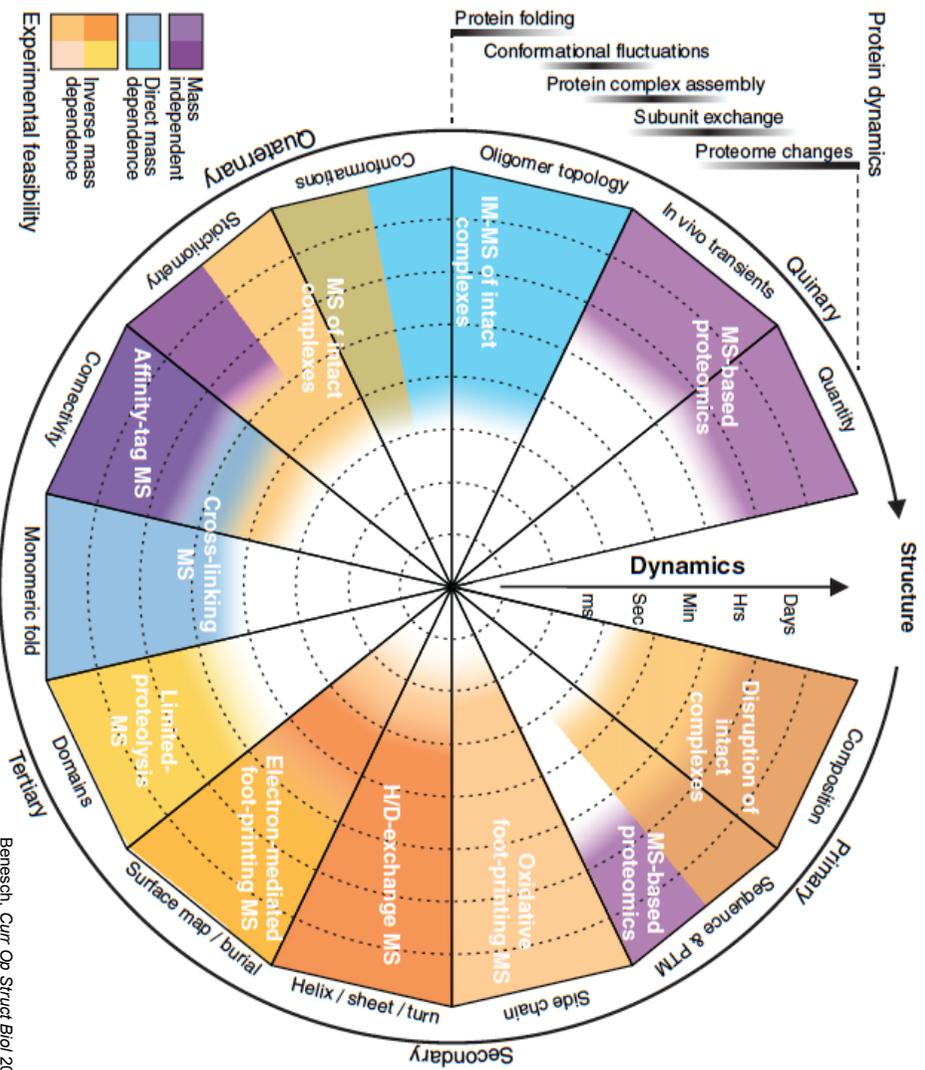
L'état de charge :

Conformation : détermine la surface/'exposition des résidus : détermine la neutralisation .



Veenstra, *Biophys Chem* 1999 ; Hopper, *Angew Chem* 2014 ; Hall, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012

Pour aller plus loin...



V – Aspects pratiques

1) Influence de la source :

But :

- Ionisation multiple mais pas trop ;
- Sans fragmenter ;
- Sans dissocier les liaisons non covalents ;
- Sans excès de contre-ions.

Pour cela, il faut que :

- Les gouttelettes produites soient fines ;
- S'évaporent rapidement ;
- Les analytes soient les seuls à absorber les charges.

Cependant :

- Les protéines requièrent un milieu aqueux, de pH contrôlé ;
- Leur chromatographie implique souvent l'usage de contre-ions pour appariement, notamment TFA :
 - affine pics (appariement avec analytes et neutralisation silanols), mais :
 - Tension de surface élevée : mauvaise formation de l'aérosol
 - Appariement annule ionisation
- Usage d'autres acides/bases organique, volatiles, ou sels neutres (acétate ou formate d'ammonium : ne sont pas des tampons)

Problème insoluble ?

- Les protéines requièrent un milieu aqueux, de pH contrôlé ;
- Leur chromatographie implique souvent l'usage de contre-ions pour appariement, notamment TFA :
 - affine pics (appariement avec analytes et neutralisation silanols), mais :
 - Tension de surface élevée : mauvaise formation de l'aérosol
 - Appariement annule ionisation
- Solution :
 - Ne pas utiliser de tampons minéraux ;
 - utiliser d'autres acides/bases organique, volatiles, ou sels neutres (acétate ou formate d'ammonium : ne sont pas des tampons) ;
 - On peut compenser l'effet de suppression de signal du TFA par ajout d'acide propionique/isopropanol 75:25 en proportion 1:2 avec l'éluat (augmente rapport S/N de 10 à 100), ou ajout de NH₄OH.
 - Dans le cas d'interactions faibles, il peut être nécessaire de diminuer l'état de charge : ajouter imidazole, solvant basique avec la protéine, solvant organique dans la source.

Table 1
Relative response (%) of three standard proteins with different mobile phase additives in ESI-MS^{a,b}

Additive	Concentration	pH	Relative response (%)		
			Myoglobin	Cytochrome c	BSA
Heptafluorobutyric acid	0.2% (v/v)	1.8	<1	<1	3
Formic acid	0.2% (v/v)	2.5	100	100	98
Trifluoroacetic acid	0.025% (v/v)	2.5	3	3	9
Acetic acid	0.3% (v/v)	3.0	46	56	100
Ammonium formate	10 mM	3.0	25	37	47
Ammonium acetate	10 mM	4.5	1	2	2
Ammonium formate	10 mM	6.0	<1	<1	<1
Ammonium acetate	10 mM	6.0	<1	<1	<1
Ammonium hydrogencarbonate	50 mM	9.0	34	11	33
Morpholine	10 mM	10.5	12	<1	<1
Ammonium hydroxide	20 mM	11.5	24	<1	8

^a FIA at 0.1 ml/min; mobile phase, water-ACN (50:50); MS conditions: capillary voltage, 46 V; spray voltage, 5.0 kV; capillary temperature, 350 °C.

^b Response related to the highest signal observed in every protein.

- TFA est le mieux pour la séparation de prot en HPLC phase inverse, mais suppression signal
- Acide formique (0,2% v/v) ou acétique (0,3% v/v) sont de bons compromis séparation/détection

MAIS : on n'a pas toujours besoin de faire une LC des protéines...

Garcia *J Chrom A*, 2002

Exemples de tampons ou "mélanges de sels pseudo-tampons" compatibles avec la LC-MS :

- pH acide : formate (pKa 3,8), acétate (pKa 4,8)
- pH neutre : acétate d'ammonium (moyenne pKa 7,0), acétate/diéthylamine (moy. pKa 7,9), éthylène diammonium diacétate (EDDA)
- pH basique : carbonate d'ammonium (moyenne pKa 9,7)

Additifs :

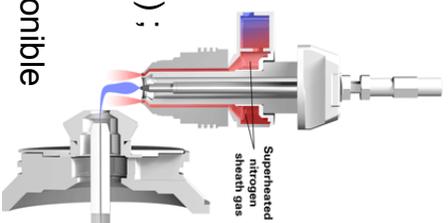
- diéthylamine (DEA) Bp 89°C, triéthylamine (TEA) Bp 55°C, ammoniacque : pKa ≈ 11, pH à 0,1% ≈ 11

Pour info : buffer database : <http://www.liv.ac.uk/buffers/buffercalc.html>

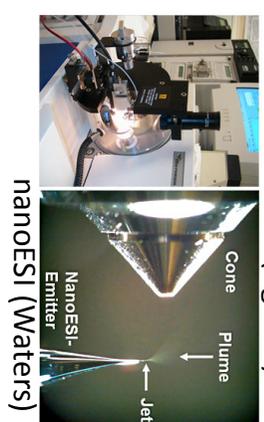
Influence de la technologie de la source :

Les différents mode d'ionisation de type ESI :

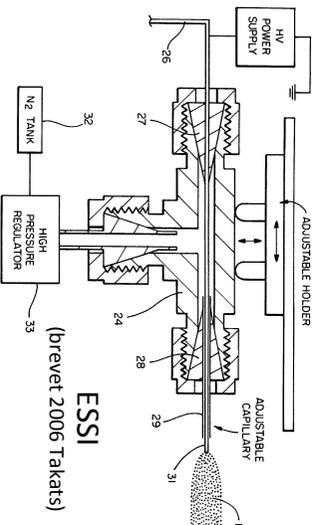
- ESI : compatible avec format standard de colonne et de fluide ;
- Jet-stream (Agilent) ;
- Nano-ESI : intérêt pour petites quantités (+ sensible, plus tolérant aux sels) ;
- ESSI : très efficace, mais pas encore disponible commercialement.



ESI (Agilent)



nanoESI (Waters)

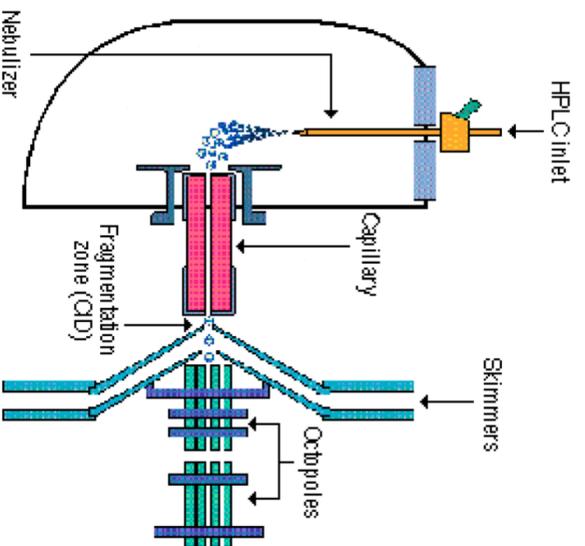


Jeckin, *J Am Soc Mass Spectrom* 2008

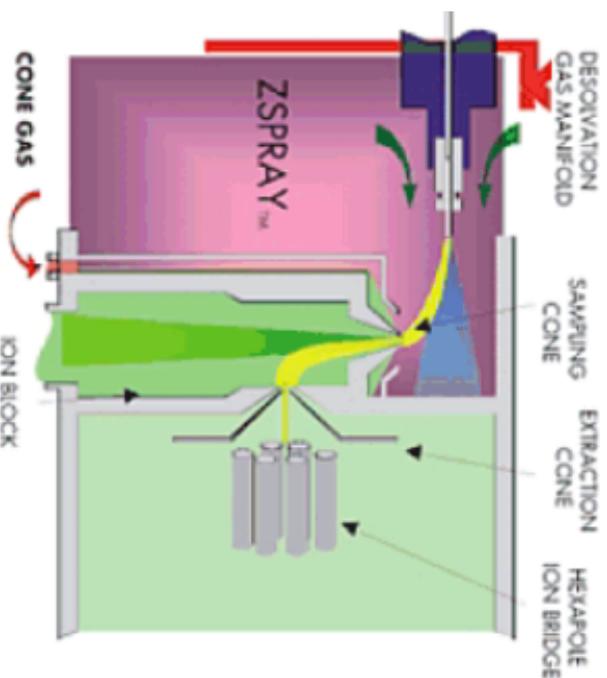
Conception des sources:

But: éviter de souiller/inonder la source.

Solution: spray orthogonal ou en Z.



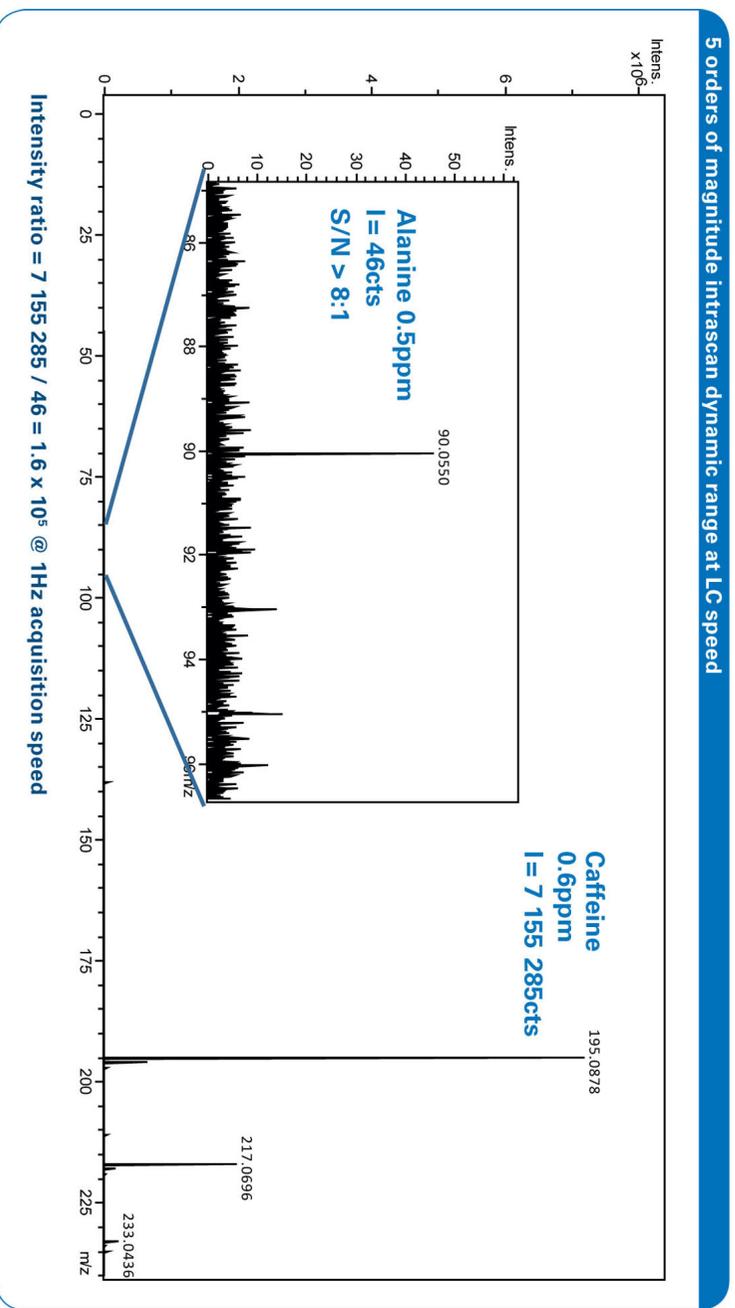
Agilent APCL



Waters ESI Z spray

Autres problèmes récurrents en MS appliquée à la biologie ou aux SN :

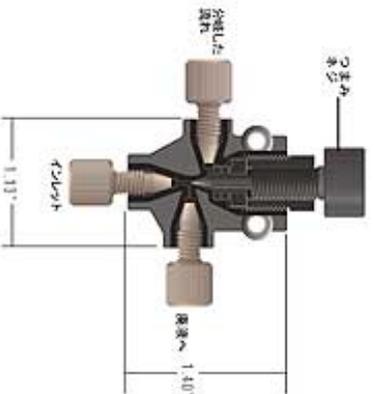
- La gamme dynamique a une limitation !



La sensibilité :

- Liée à la concentration, pas à la quantité d'analyte :
- Une quantité donnée sera détectée si elle est concentrée : intérêt des débits plus faibles, des colonnes fines...

- Mode d'introduction : infusion ou couplage
- Si couplage : - pb du débit : split, passif ou actif (mais moins d'analyte dans la MS...)
- pd le la phase mobile : make-up (LC pour ligands, make-up pour cible)



Split passif, fixe (Té) ou réglable...

Split actif :
Ex : G1968D :
split ratios can
range from
100:1 to
100,000:1.

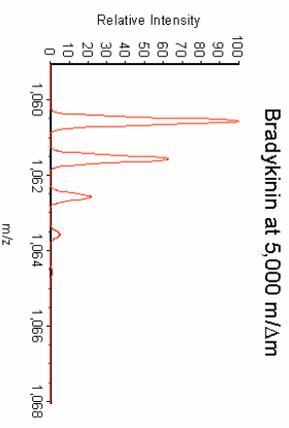
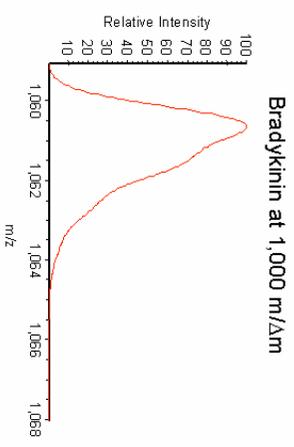


Résolution : en avoir ou pas...

On décrit les performances d'un instrument de HRMS par :

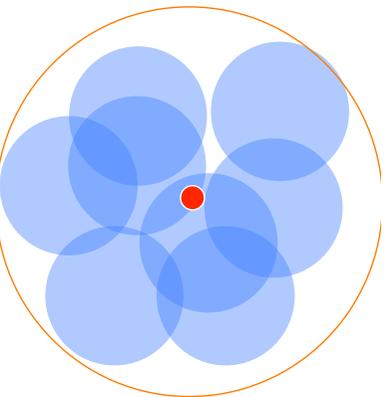
- la résolution : capacité à distinguer deux masses : la résolution nécessaire pour distinguer un ion est $2 \times m/z$. Donc pour distinguer 1000 de 1001, la résolution doit être 2000. $R = m/\Delta m$. Pas d'unités. En ToF, résolution classique = 20 000.

- La précision (variabilité entre plusieurs mesures d'une même masse), généralement en ppm (précision à 1 ppm = capacité de distinguer 1 000 000 de 1 000 001, donc sur une masse de 1 000 précision à 0,001). En ppm.

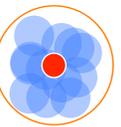


Ex :
pour une masse = 118, pour une combinaison $C_{0-100}H_{3-74}O_{-4}N_{0-4}$ les différentes combinaisons se distinguent par 0,004 unités de masse, soit $0,004/(10-6 \times 118) = 34$ ppm.
Un instrument de précision 34 ppm suffit.
Si masse = 750 et combinaisons $C_{0-100}H_{25-110}O_{0-15}N_{0-15}$, il faut une précision de 0,018 ppm pour n'obtenir qu'une formule brute.

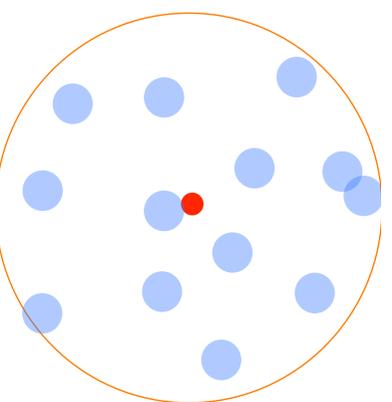
Résolution et précision



Basse résolution
Mauvaise précision



Haute résolution,
Bonne précision



Masse exacte de l'ion
Mesures successives
(plusieurs sont nécessaires
pour obtenir le signal final)

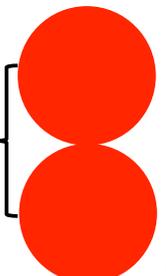


Haute résolution,
bonne précision
Instrument mal calibré

La résolution dépend de la masse des ions :
L'analyseur doit "travailler" pour séparer des ions afin de les distinguer



"Effort" nécessaire pour séparer
deux petits ions : faible



"Effort" nécessaire pour séparer deux gros ions : grand

Quelques remarques en conclusion

- La MS en biologie n'est pas LE SEUL outil à privilégier, mais il est impératif de savoir qu'il existe et ce qu'il peut donner comme information ;
- Ne pas se fier aux résultats d'une étude précise, mais tester le potentiel d'une méthode pour une application donnée, et sans *a priori* ;
- Les substances naturelles restent souvent un défi pour le chimiste et l'analyste...
- Le pharmacographe s'accommode mal du dogme « une molécule / une cible » et est à l'affût de méthodes compatibles avec une exploration de la complexité (chimique des extraits et biologique des cibles), de la synergie, etc.