

Intact cells MALDI-TOF mass spectrometry profiling of male chicken Gallus gallus semen: comparison between fresh and frozen sperm.

Marie-Christine Bourin, Karine Cahier, Isabelle Grasseau, Valérie Labas, Grégoire Harichaux, Ana-Paula Teixeira-Gomes, Jean-Didier Terlot, Nadine Gérard, Elisabeth Blesbois

▶ **To cite this version:**

Marie-Christine Bourin, Karine Cahier, Isabelle Grasseau, Valérie Labas, Grégoire Harichaux, et al.. Intact cells MALDI-TOF mass spectrometry profiling of male chicken Gallus gallus semen: comparison between fresh and frozen sperm.. 29. Journées Françaises de Spectrométrie de Masse (JFSM), Société Française de Spectrométrie de Masse (SFSM). Orléans, FRA., Sep 2012, Orléans (FRA), France. 256 p. hal-02745049

HAL Id: hal-02745049
https://hal.inrae.fr/hal-02745049

Submitted on 3 Jun 2020

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.

17-20 SEPTEMBRE

2012

ORLEANS

JFSM

29èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse

Analyse structurale, Biologie
Environnement, Espace
Imagerie
Instrumentation
Interactions non-covalentes
Mécanismes fondamentaux
Métabolomique, Glycomique, Lipidomique
Méthodes quantitatives
Petites molécules
Protéomique

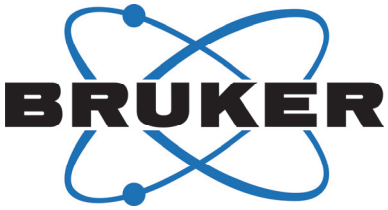
Société Française de Spectrométrie de Masse

SFSM





Agilent Technologies



Thermo
SCIENTIFIC

Waters
THE SCIENCE OF
WHAT'S POSSIBLE.™



JFSM 2012
Programme et Résumés

ORLÉANS

Centres de Conférences

17-20 Septembre 2012

29 èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse

Mot de Bienvenue

Nous avons le plaisir de vous accueillir à Orléans, aux 29èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse. Ces journées sont organisées sous l'égide de la Société Française de Spectrométrie de Masse. L'accent est mis sur la qualité du programme scientifique, de l'exposition et de l'accueil gastronomique et culturel.

Les membres du Conseil Scientifique et du Comité Local d'Organisation vous souhaitent la bienvenue au Centre de Conférences d'Orléans et s'efforceront, avec votre participation, de faire de ce congrès une réussite et un évènement mémorable pour tous les participants.

Les 29èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse rassemblent une large communauté française de scientifiques en chimie, biochimie, sciences de la vie, pharmacologie et physique. Les participants appartiennent au CNRS, au CEA, à l'INSERM, à l'INRA, aux Universités, mais aussi à de grandes sociétés industrielles ainsi qu'à des sociétés d'instrumentation.

Ces journées auront l'ambition de traiter des domaines passionnants et variés tels que instrumentation et mécanismes fondamentaux ; petites molécules (médicaments, cosmétiques...) ; analyse structurale et biologie ; interactions non-covalentes ; protéomique, métabolomique, glycomique et lipidomique ; imagerie ; méthodes quantitatives ainsi qu'environnement et espace.

Ces journées se veulent un moment d'échanges, de partage des connaissances, de réflexion, de convivialité entre chercheurs de tous horizons afin de favoriser l'émergence de nouveaux projets et collaborations scientifiques interdisciplinaires centrés sur la spectrométrie de masse.

Les organisateurs.

TABLE DES MATIÈRES

Organisation 5

Liste des Exposants 6

Plan du Centre de Conférences 7

Informations Utiles 8

Informations Générales 9

Manifestations 11

Programme Synthétique 13

Programme Détaillé 19

Conférences Inaugurales et de Clôture 29

Conférences Invitées 35

Communications Orales 53

Conférences du Club Jeunes 95

Communications par Affiches 101

- Environnement, Espace 103
- Petites molécules 117
- Méthodes quantitatives 133
- Interactions non-covalentes 147
- Analyse structurale, Biologie 157
- Protéomique 175
- Imagerie 209
- Métabolomique, Glycomique, Lipidomique 215
- Instrumentation, Mécanismes réactionnels 227

Index des Auteurs 245

Liste des Participants 253

ORGANISATION

Comité Scientifique

Gérard Bolbach - IBI, Paris
Martine Cadène - CBM, Orléans
Brian T. Chait – The Rockefeller University
Pierre Gareil - ENSCP, Paris
Benoît Maunit - ICOA, Orléans
Estelle Pujos-Guillot - INRA, Clermont-Theix
Peter Roepstorff – Univ. of Southern Denmark
Guillaume van der Rest - LCP, Orsay
Joëlle Vinh - ESPCI, Paris

Comité Local d'Organisation

Martine Cadène - CBM, Orléans
Benoît Maunit - ICOA, Orléans
Martine Beaufour - CBM, Orléans
Christelle Briois - LPC2E, Orléans
Cyril Colas - CBM-ICOA, Orléans
Patrick Emond - Université de Tours
Laëtitia Fougère - ICOA, Orléans
Guillaume Gabant - CBM, Orléans
Catherine Guette - CHR Angers
Sandrine Lefeuvre - CHR Orléans
Patricia Legland - CBM, Orléans
Xavier Poisson - Technologie Servier, Orléans

Conseil d'Administration de la SFSM

Guillaume van der Rest - LCP, Orsay
Michel Salzet - LSMBFA, Lille
Jean Armengaud - CEA, Marcoule
Joëlle Vinh - ESPCI, Paris
William Buchmann - LAMBE, Évry
Hélène Lavanant - COBRA, Rouen
Estelle Pujos-Guillot - INRA, Clermont-Theix
Sandrine Sagan - UPMC, Paris
David Touboul - ICSN, Gif-sur-Yvette

Remerciements

Le Comité d'Organisation remercie chaleureusement ses partenaires financiers publics et industriels : le Centre de Biophysique Moléculaire, l'Institut de Chimie Organique et Analytique, le Conseil Général de la Région Centre, la Mairie d'Orléans, l'Université d'Orléans, le Centre National de la Recherche Scientifique, l'Observatoire des Sciences de l'Univers du Centre, l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, l'Institut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin, le Centre Hospitalier Régional d'Orléans, l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, AB Sciex, Agilent Technologies, Bruker, Thermo Scientific et Waters.

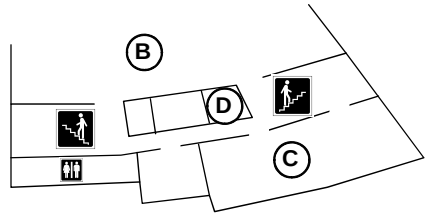
Le Comité d'Organisation tient également à remercier Isabelle Frapart et Lucie Jaquillard pour leur participation à la préparation de ce Congrès, Marielle Rogeau pour le graphisme ainsi que Dior pour les Prix de Poster.

LISTE DES EXPOSANTS

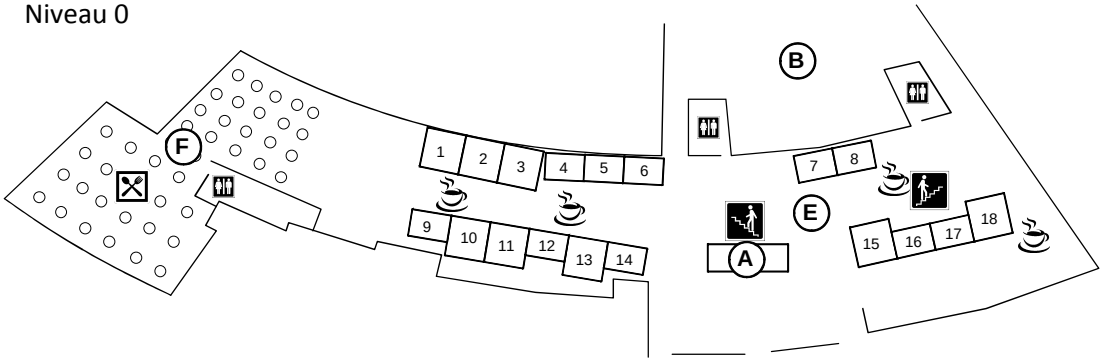
Nº du Stand	Exposant
1	LGS – Lab Gaz Systems
2	Bertin Pharma
3	Agilent Technologies
4	Perkin Elmer
5	GenGaz
6	Euriso-Top
7	Biosolve
8	KR Analytical
9	F-DGSi
10	Shimadzu
11	Thermo Scientific
12	MS Vision
13	Bruker
14	Jeol
15	Waters
16	Advion
17	Nonlinear Dynamics
18	AB Sciex

PLAN DU CENTRE DE CONFÉRENCES

Niveau 1



Niveau 0



A – Accueil

B – Auditorium Maurice Genevoix

C – Salle C

D – Salle C4

E – Espace Exposition

F – Espace Restauration

INFORMATIONS UTILES

Transports

Taxi	02 38 53 11 11
Tao	0800 01 2000
SNCF	36 35
Air France	0820 820 820

Lieu du congrès

Centre de Conférences d'Orléans
Place du 6 Juin 1944
02 38 24 12 14

Office de Tourisme et de Congrès d'Orléans

2 Place de l'Étape
BP 95632
45056 ORLÉANS cedex 1
Tél : 02 38 24 05 05
Fax : 02 38 54 49 84

Organisation

Mail : jfsm2012-coorganisateurs@sciencesconf.org

INFORMATIONS GÉNÉRALES

Badge

Il est demandé à tous les participants au Congrès de porter en permanence leur badge pour des raisons de sécurité et de régulation des personnes. Ce badge donne accès à toutes les sessions poster et orales, ainsi qu'aux pauses café et repas. Une invitation concernant le repas de Gala vous sera remise lors de votre arrivée.

Communications Orales

Les Conférences Plénières (durée de présentation : 40 min.) se dérouleront dans l'Auditorium Maurice Genevoix. Les Conférences Invitées (durée de présentation : 25 min.) et les Communications Orales (durée de présentation : 15 min. + 5 min. gérées par le modérateur en vue de questions/discussion et de l'introduction de l'orateur suivant) se dérouleront ensuite dans l'Auditorium Maurice Genevoix et la Salle C pour les sessions parallèles. Les orateurs devront être présents 15 min. avant le début de leur session dans la salle indiquée. Compte tenu de la configuration du Centre des Conférences et du déplacement entre les salles en sessions parallèles, les temps de parole seront strictement respectés.

Les PCs de projection seront sous Windows et les présentations devront être au format PowerPoint (.ppt, .pptx, .pps, .ppsx) ou Portable Document File (.pdf). Il est demandé aux intervenants de remettre le fichier de leur présentation sur clé USB en Salle C4 au moment de leur enregistrement à l'accueil du Centre de Conférences. En dernier recours : la veille si leur conférence est le matin ; le matin si leur conférence est l'après-midi.

Communications par Affiches

Les Communications par Affiches se dérouleront dans l'Espace Exposition. La présence d'un des auteurs communiquant est requise notamment lors des pauses-café. Des adhésifs de type scratch seront fournis à l'installation : seul ce système d'accrochage peut être utilisé.

Affiches ayant un numéro impair : mise en place du poster le lundi après-midi ou le mardi de 8:30 à 9:00 jusqu'au mercredi matin 8:00.

Affiches ayant un numéro pair : mise en place du poster le mercredi de 8:30 à 9:00 jusqu'au jeudi 12:00.

Déjeuners

Les déjeuners se dérouleront dans l'Espace Restauration du Centre de Conférences d'Orléans.

Pauses-café

Les pauses-café se dérouleront en même temps que les Sessions Posters dans l'Espace Exposition.

Vestiaire

Le vestiaire est ouvert en libre-service du lundi au mercredi. Un service de bagagerie sera disponible le jeudi afin de faciliter votre départ.

Accès Wi-Fi

Le Centre de Conférences d'Orléans est entièrement équipé d'un accès Wi-Fi gratuit.

MANIFESTATIONS

Soirée d'Accueil - Exposition de produits locaux

Le cocktail d'accueil débutera à 18:00 le lundi 17 septembre dans l'Espace Restauration après les Allocutions de Bienvenue des Élus et des Organisateurs.

Soirée de Gala

La Soirée de Gala aura lieu le mercredi 19 septembre de 18:35 à 23:30 au Château de Chamerolles (Chilleurs-au-Bois). Un cocktail de bienvenue avec visite du Château et du Musée des Parfums sera suivi du repas de Gala dans la Grande Halle.

Un départ collectif en car est prévu à 17:45 devant le Centre de Conférences. Le départ du Château de Chamerolles est prévu pour 23:30 en direction du Centre de Conférences et des hôtels.

Réunions Utilisateurs

Les réunions utilisateurs se déroulent en sessions parallèles, à savoir dans l'Auditorium Maurice Genevoix et dans la Salle C :

Mardi 18 septembre de 14:00 à 14:45
AB Sciex dans l'Auditorium ;
Bruker dans la Salle C

Mardi 18 septembre de 17:50 à 18:35
Thermo Scientific dans l'Auditorium ;
Waters dans la Salle C

Mercredi 19 septembre de 14:00 à 14:45
Agilent Technologies dans la Salle C

Programme Synthétique

Lundi 17 Septembre

	9:00-15:00 **Journée de Formation** **Quantification** Christine Carapito Cécile Cren-Olivé
13:00-15:45 **Club Jeunes SFSM** CJ-1 - Gilles Schnell CJ-2 - Pauline Marie CJ-3 - Claudia Bich	
14:00-16:30 **Accueil des Participants**	
16:30-17:40 **Conférences Inaugurales** CI-1 - Laure Pasquier CI-2 - Philippe Bernard	
17:40-18:00 **Allocutions de Bienvenue**	
18:00-20:00 **Cocktail d'Accueil**	

Mardi 18 Septembre

8:30-9:00 **Forum Emploi**	
9:00-9:45 **Conférence Plénière** C-01 - Peter Roepstorff	
9:45-11:00 **Pause-café - Session Posters (Nº impairs)**	
11:00-12:25 **Analyse Structurale, Biologie** C-02 - William Helbert O-01 - Christian Rolando O-02 - Jianqing Wu O-03 - Éric Forest	11:00-12:25 **Instrumentation** C-03 - Marvin L. Vestal O-04 - Michael Biacchi O-05 - Francis Canon O-06 - Marie Méjean
12:25-14:00 **Déjeuner**	
14:00-14:45 **Réunion Utilisateurs** AB Sciex	14:00-14:45 **Réunion Utilisateurs** Bruker
14:45-16:10 **Protéomique** C-04 - Brian T. Chait O-07 - Thibaut Léger O-08 - David Cornu O-09 - Alain Dedieu	14:45-16:10 **Mécanismes Fondamentaux** C-05 - Guillaume van der Rest O-10 - Héloïse Dossmann O-11 - Hubert Latappy O-12 - Latifa Latrous El Atrache
16:10-16:50 **Pause café - Session Posters (Nº impairs)**	
16:50-17:50 **Protéomique** O-13 - Sarah Lennon O-14 - Maxence Wisztorski O-15 - Valérie Labas	16:50-17:50 **Mécanismes Fondamentaux** O-16 - Yannis Major O-17 - Caroline Barrère O-18 - Aura Tintaru
17:50-18:35 **Réunion Utilisateurs** Thermo Scientific	17:50-18:35 **Réunion Utilisateurs** Waters

Mercredi 19 Septembre

8:30-9:00 **Forum Emploi**	
9:00-9:45 **Conférence Plénière** C-06 - Christof Janssen	
9:45-11:00 **Pause-café - Session Posters (Nº pairs)**	
11:00-12:25 **Protéomique** C-07 - Philippe Bulet O-19 - Vincent Delatour O-20 - Yann Verdier O-21 - Amandine Boeuf	11:00-12:25 **Petites molécules** C-08 - François Couderc O-22 - Virginie Domalain O-23 - Aleksander Salwiński O-24 - Audrey Buleté
12:25-14:00 **Déjeuner**	
	14:00-14:45 **Réunion Utilisateurs** Agilent Technologies
14:45-15:50 **Métabolomique** C-09 - Natali Stojiljkovic O-25 - Estelle Pujos-Guillot O-26 - Thierry Berton	14:45-15:50 **Environnement, Espace** C-10 - Cyril Szopa O-27 - Christelle Briois O-28 - Vincent Carré
15:50-16:30 **Pause café - Session Posters (Nº pairs)**	
16:30-17:45 **Assemblée Générale**	
17:45-23:30 **Dîner de Gala**	

Jeudi 20 Septembre

8:50-10:15 **Métabolomique** C-11 - Bruno Le Bizec O-29 - Mathieu Gaudin O-30 - Laëtitia Fougère O-31 - Corinne Buré	8:50-10:15 **Environnement, Espace** C-12 - Frédéric Aubriet O-32 - Emmanuelle Bichon O-33 - Yasmine Souissi O-34 - Emie Durighello
10:15-10:55 **Pause-café - Forum Emploi**	
10:55-12:20 **Interactions non-covalentes** C-13 - Sarah Sanglier-Cianférani O-35 - Julien Marcoux O-36 - Elisabetta Boeri Erba O-37 - Séverine Clavier	10:55-12:20 **Imagerie** C-14 - Andreas Römpp O-38 - Hanane Kadar O-39 - Julien Franck O-40 - Tiffany Porta
12:20-13:40 **Déjeuner**	
13:40-14:00 **Prix Poster**	
14:00-14:20 **Prix de la SFSM** C-15 - Céline Meriaux	
14:20-14:30 **Annonce des prochains Congrès**	
14:30-15:15 **Conférence de Clôture** CC - Richard B. Cole	
15:15-15:30 **Clôture du Congrès**	

Programme Détaillé

Lundi 17 Septembre 2012

9:00-15:00 Journée de Formation SFSM

13:00-15:45 Club Jeunes SFSM

13:15	**CJ-1 - Gilles Schnell** *Analyses protéomique et peptidomique des molécules impliquées dans la transmission de la borréliose de Lyme*
13:35	**CJ-2 - Pauline Marie** *Utilization of label free spectral counting to quantify the proteins involved in the various phases of chicken eggshell mineralization*
13:55	**CJ-3 - Claudia Bich** *Massive argon clusters to increase the increase the sensitivity of biological TOF-SIMS imaging*

14:00-16:30 Accueil des Participants

16:30-17:40 Conférences Inaugurales *(Auditorium)*

16:30	**CI-1 - Laure Pasquier** *La spectrométrie de masse : un outil de recherche industriel chez LVMH Recherche*
17:05	**CI-2 - Philippe Bernard** *La pharmacognosie inverse, une approche originale pour la découverte de nouveaux actifs naturels*

17:40-18:00 Allocutions de Bienvenue

18:00-20:00 Cocktail d'Accueil

Mardi 18 Septembre 2012

8:30-9:00 Forum Emploi

9:00-9:45 Conférence Plénière *(Auditorium)*

C-01 - Peter Roepstorff

Proteomics, state of art and future perspectives. Are we going in the right direction?

9:45-11:00 Pause-café - Session Posters (Nº impairs)

11:00-12:25 *Analyse Structurale, Biologie* *(Auditorium)*

11:00	**C-02 - William Helbert** *CRAZY polysaccharides : CRiblage d'Activité enZYmatique contre une collection de polysaccharides*
11:25	**O-01 - Christian Rolando** *Étude des modifications de l'apolipoprotéine A1 après traitement de photo-inactivation virale : analyse en protéine intacte par FT-ICR MS*
11:45	**O-02 - Jianqing Wu** *Amide hydrogen deuterium exchange of translation initiation factors followed by ultra-high resolution FT-ICR mass spectrometry*
12:05	**O-03 - Éric Forest** *Dynamics of a bacterial multidrug ABC transporter using hydrogen/deuterium exchange*

11:00-12:25 *Instrumentation* *(Salle C)*

11:00	**C-03 - Marvin L. Vestal** *SimulTOF™ mass spectrometry for high performance MS-MS*
11:25	**O-04 - Michael Biacchi** *Enrichment by fraction collection developed for CE/MALDI-MS to analyze proteins by top-down strategy*
11:45	**O-05 - Francis Canon** *Localization of non-covalent protein-ligand binding sites by top-down mass spectrometry based on vacuum ultra-violet (VUV) activation*
12:05	**O-06 - Marie Méjean** *Vers la mise au point d'un couplage de chromatographie en phase supercritique / photoionisation à pression atmosphérique pour l'analyse de substances naturelles*

12:25-14:00 *Déjeuner*

14:00-14:45 *Réunions Utilisateurs*

AB Sciex *(Auditorium)*

Bruker *(Salle C)*

14:45-16:10 *Protéomique* *(Auditorium)*

14:45	**C-04 - Brian T. Chait** *Finding antibodies that neutralize HIV*
15:10	**O-07 - Thibaut Léger** *OMSS@IJM: a web-based proteomics database search engine with extended capabilities to address the identification of disease-related protein degradation products*
15:30	**O-08 - David Cornu** *Étude qualitative et quantitative par spectrométrie de masse des acides aminés incorporés lors de la translecture*

15:50	**O-09 - Alain Dedieu** *N-terminal protein acetylation is frequent in Deinococcus deserti and exclusive of serine and threonine residues*

14:45-16:10 Mécanismes Fondamentaux (Salle C)

14:45	**C-05 - Guillaume van der Rest** *Peptide fragmentation: sequence and size effects on peptide fragmentation*
15:10	**O-10 - Héloïse Dossmann (Soldi-Lose)** *Formation, characterization and reactivity of gaseous adduct of carbon dioxide to magnesium*
15:30	**O-11 - Hubert Latappy** *Étude par spectrométrie de masse FT-ICR en temps réel de la thermodégradation de matériaux polymères : constantes thermocinétiques et schémas mécanistiques*
15:50	**O-12 - Latifa Latrous El Atrache** *Gas-phase interactions of organotins with glycine*

16:10-16:50 Pause-café - Session Posters (Nº impairs)

16:50-17:50 Protéomique (Auditorium)

16:50	**O-13 - Sarah Lennon** *Développement d'une approche protéomique pour la recherche de biomarqueurs de lymphopathies B à partir de microparticules*
17:10	**O-14 - Maxence Wisztorski** *Analyse microprotéomique par imagerie MALDI et micro-extraction liquide de surface : application aux tissus FFPE pour l'analyse de cancer tubo-ovarien*
17:30	**O-15 - Valérie Labas** *Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry and top-down proteomic to identify biomarkers*

16:50-17:50 Mécanismes Fondamentaux (Salle C)

16:50	**O-16 - Yannis Major** *Exploration de l'organisation des dépôts MALDI par RMN du solide*
17:10	**O-17 - Caroline Barrère** *Atmospheric solid analysis probe ion mobility mass spectrometry of polypropylene*
17:30	**O-18 - Aura Tintaru** *Location of the adducted cations in PEG-grafted dendrimer by ESI-MS/MS*

17:50-18:35 Réunions Utilisateurs

Thermo Scientific *(Auditorium)*

Waters *(Salle C)*

Mercredi 19 Septembre 2012

8:30-9:00 Forum Emploi

9:00-9:45 Conférence Plénière *(Auditorium)*

C-06 - Christof Janssen

L'effet isotopique de l'ozone : observations, études, son rôle et ses applications

9:45-11:00 Pause-café - Session Posters (Nº pairs)

11:00-12:25 Protéomique *(Auditorium)*

11:00	**C-07 - Philippe Bulet** *Contributions of mass spectrometry in the understanding of the Drosophila immune response*
11:25	**O-19 - Vincent Delatour** *Apport de la spectrométrie de masse et des méthodes de référence pour le contrôle qualité en biologie clinique*
11:45	**O-20 - Yann Verdier** *Analyse par LC-MS/MS haute résolution du complexe de la caspase 8 lors de la réponse immunitaire antibactérienne chez la drosophile*
12:05	**O-21 - Amandine Boeuf** *Détection de Borrelia burgdorferi dans des extraits cutanés par LC-SRM*

11:00-12:25 Petites Molécules *(Salle C)*

11:00	**C-08 - François Couderc** *Petites molécules et spectrométrie de masse : le reflux et le flux*
11:25	**O-22 - Virginie Domalain** *La différenciation de diastéréoisomères par couplage spectrométrie de masse - mobilité ionique : le rôle de la cationisation*
11:45	**O-23 - Aleksander Salwiński** *Application of 'intensity ion fading' approach for searching inhibitors of tyrosinase in complex mixtures*
12:05	**O-24 - Audrey Buleté** *Développement d'outils analytiques basés sur la nano-chromatographie pour l'étude de l'accumulation et du métabolisme de contaminants organiques chez des invertébrés aquatiques d'eau douce*

12:25-14:00 Déjeuner

14:00-14:45 Réunion Utilisateurs

Agilent Technologies *(Salle C)*

14:45-15:50 *Métabolomique* (Auditorium)

14:45	**C-09 - Natali Stojiljkovic** *LC-HRMS based metabolomic approach as a screening tool in horse racing doping control*
15:10	**O-25 - Estelle Pujos-Guillot** *Approche métabolomique en nutrition : développement d'outils pour l'identification des biomarqueurs*
15:30	**O-26 - Thierry Berton** *Caractérisation de l'imprégnation du fœtus aux pesticides : analyse du méconium et des cheveux maternels par spectrométrie de masse*

14:45-15:50 *Environnement, Espace* (Salle C)

14:45	**C-10 - Cyril Szopa** *La spectrométrie de masse dans l'histoire de l'exploration du système solaire*
15:10	**O-27 - Christelle Briois** *A high mass-resolution Orbitrap mass spectrometer for in situ analysis in planetary science*
15:30	**O-28 - Vincent Carré** *La spectrométrie de masse à très haute résolution : un outil de caractérisation des bio-huiles issues de la pyrolyse de la biomasse*

15:50-16:30 *Pause-café - Session Posters (Nº pairs)*

16:30-17:45 *Assemblée Générale*

17:45-23:30 *Dîner de Gala*

Jeudi 20 Septembre 2012

8:50-10:15 *Métabolomique* (Auditorium)

08:50	**C-11 - Bruno Le Bizec** *Métabolomique : principes et applications au contrôle large échelle de facteurs de croissance interdits en élevage*
09:15	**O-29 - Mathieu Gaudin** *Targeted profiling of inflammation related lipid mediators in biofluids by ultra-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry*
09:35	**O-30 - Laëtitia Fougère** *Développements méthodologiques : stratégie et caractérisation de métabolites secondaires dans les résidus de pommes*
09:55	**O-31 - Corinne Buré** *Biodiversity of highly-glycosylated plant phosphosphingolipids: fast screening and structure determination by tandem mass spectrometry*

8:50-10:15 Environnement, Espace (Salle C)

08:50	**C-12 - Frédéric Aubriet** *Spectrométrie de masse et contaminants environnementaux : la pollution gazeuse et particulaire*
09:15	**O-32 - Emmanuelle Bichon** *La mesure du BDE-209 à l'état d'ultra-trace dans les matrices biologiques : challenge analytique et nouvelles stratégies envisageables*
09:35	**O-33 - Yasmine Souissi** *Stratégie couplant spectrométrie de masse et essais biologiques pour évaluer le danger associé à la présence de polluants émergeants : le cas de l'estrone*
09:55	**O-34 - Emie Durighello** *Apports de la spectrométrie à haute résolution pour l'identification des composants de l'exoprotéome de bactéries marines*

10:15-10:55 Pause-café - Forum Emploi

10:55-12:20 Interactions Non-Covalentes (Auditorium)

10:55	**C-13 - Sarah Sanglier-Cianférani** *Native mass spectrometry to decipher interactions between biomolecules: past, present and future*
14:20	**O-35 - Julien Marcoux** *Mass spectrometry of a transmembrane pump reveals its specific drug and lipid binding properties*
11:40	**O-36 - Elisabetta Boeri Erba** *Investigating a large human protein assembly by native mass spectrometry: the SAGA complex*
12:00	**O-37 - Séverine Clavier** *Optimization of a crosslinking and mass spectrometry workflow (MALDI-TOF/TOF, ESI-MS/MS) for the identification and characterization of the (R/W)9 cell penetrating peptide interaction partners*

10:55-12:20 Imagerie (Salle C)

10:55	**C-14 - Andreas Römpp** *Recent developments and trends in mass spectrometry imaging*
14:20	**O-38 - Hanane Kadar** *Imagerie par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/TOF) d'un composé potentiellement neuroprotecteur dans un modèle de la maladie de Parkinson*
11:40	**O-39 - Julien Franck** *New strategies for proteins identification from tissue sections*
12:00	**O-40 - Tiffany Porta** *Assessing the relevance of surface sampling based on liquid extraction coupled to differential ion mobility for quantitative mass spectrometry imaging*

12:20-13:40	***Déjeuner***	
13:40-14:30	***Prix et Annonces*** *(Auditorium)*	
	13:40	**Prix Poster**
	14:00	**C-15 - Prix de la SFSM - Céline Meriaux** *Imagerie du système nerveux central par spectrométrie de masse MALDI*
	14:20	**Annonces des prochains congrès**
14:30-15:15	***Conférence de Clôture*** *(Auditorium)*	
		CC - Richard B. Cole *Le développement de l'attachement des anions en spectrométrie de masse*
15:15-15:30	***Clôture du Congrès***	

Conférences Inaugurales et de Clôture

LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE : UN OUTIL DE RECHERCHE INDUSTRIEL CHEZ LVMH RECHERCHE

Laure Pasquier[1]

1 - LVMH Recherche, 185 avenue de Verdun, 45800 Saint-Jean-de-Braye

La Cosmetic Valley est le premier centre de ressources mondial de la parfumerie-cosmétique. Ce pôle de compétitivité a pour mission, avec le soutien des collectivités territoriales, d'animer un réseau d'entreprises, de centres de recherche et d'établissements de formation engagés dans une démarche partenariale autour d'une dynamique d'innovation et de conquête des marchés internationaux.

Le terme de produit cosmétique répond à une définition réglementaire bien précise et pour LVMH regroupe aujourd'hui les produits de soin, de maquillage et les parfums. Le produit cosmétique est un produit soumis à des réglementations au niveau international qui permettent d'assurer efficacité et plaisir tout en assurant son innocuité. LVMH Recherche, au sein de la Cosmetic Valley et du Loiret étend son activité R&D de la connaissance de la peau et des utilisateurs de cosmétiques, à la création de formulations innovantes pour les différentes marques de parfums et cosmétiques du groupe LVMH. Ses travaux se déclinent autour de la philosophie de « la recherche au service de l'émotion ».

L'un des axes de recherche avancée de nos biologistes, associé à ceux des phytochimistes de nos réseaux d'ethnobotanique, vise notamment à identifier des cibles biologiques et à trouver des ingrédients actifs que nous nous devons de connaitre intimement. Nous possédons, en effet, un Département d'Ethnobotanique qui a pour mission de découvrir de nouveaux ingrédients d'origine naturelle et de les utiliser dans le respect de l'éthique et de la conservation de la biodiversité.

L'équipe de phytochimie, en charge de la caractérisation chimique de nos ingrédients végétaux, se doit d'acquérir une connaissance approfondie des extrais réalisés. Ceci nous permet de les maitriser, d'optimiser leurs activités biologiques et s'affranchir des molécules potentiellement toxiques. Lors de ces investigations de recherche et développement, la spectrométrie de masse est un outil indispensable pour nos exigences industrielles. Que son utilisation soit collaborative (avec des universitaires ou des PME) ou interne, chaque projet de recherche phytochimique franchit « l'étape masse ». Nous disposons au sein du centre de recherche de plusieurs spectromètres de masse. Ils vont répondre à nos besoins de dosages systématiques d'allergènes, de phtalates, … dans des matières premières à visée industrielle, mais aussi, nous aider dans la définition structurale des composants de nos nouveaux ingrédients. Au cours de notre exposé, nous donnerons des exemples d'actifs issus de la chimie verte pour lesquels nous utilisons les corps gras comme support d'extraction. Afin d'accroître notre connaissance sur le pouvoir d'extraction de ces différents corps gras, selon leur composition chimique, nous analysons les extraits obtenus (corps gras + végétal) par GC/MS et nous retraitons ces résultats par des études statistiques.

CI-2

LA PHARMACOGNOSIE INVERSE, UNE APPROCHE ORIGINALE POUR LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX ACTIFS NATURELS

Philippe Bernard[1]

1 - GreenPharma SAS, 3 allée du titane, 45100 Orléans

La pharmacognosie est une science pluridisciplinaire alliant botanique, ethnobotanique, pharmacologie et phytochimie. L'objectif de cette science consiste à identifier de nouveaux composés bioactifs à partir de plantes ou plus généralement de matières premières naturelles utilisées ou non par les médecines traditionnelles. Près d'un siècle de pharmacognosie a permis d'identifier plusieurs milliers de composés naturels maintenant décrits dans la littérature scientifique. Malgré tout, très peu de propriétés biologiques ont été identifiées pour toutes ces molécules naturelles. La pharmacognosie inverse développée à GreenPharma est une approche informatique qui combine une base de données ethnopharmacologiques avec un outil de criblage virtuel, nommé SELNERGY. Cette approche permet l'identification de nouvelles propriétés biologiques aux molécules existantes déjà décrites dans la littérature ; l'objectif étant de breveter de nouvelles applications à des matières premières naturelles plus ou moins originales en passant par l'identification rationnelle des composés chimiques qu'elles contiennent. L'application à la méranzine, un dérivé coumarique extrait de *Limnocitrus littoralis* (Miq.), a permis de conforter la puissance d'un tel outil alliant hautes technologies et médecines traditionnelles.

LE DÉVELOPPEMENT DE L'ATTACHEMENT DES ANIONS EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Richard B. Cole[1]

1 - Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique - Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) - 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

Depuis le premier couplage de l'électrospray avec un vrai spectromètre de masse pendant les années 1980, l'attachement des anions a été observé dans les spectres obtenus par l'ionisation électrospray. Mais plus de deux décennies ont passé entre cette première observation et le véritable développement de l'Attachement des Anions visant à élargir le domaine des produits susceptibles d'ionisation par électrospray en spectrométrie de masse (ESI-MS). Cet exposé détaillera l'évolution de l'Attachement des Anions en tant que mode d'ionisation alternatif pour la caractérisation des composés peu basiques et peu acides. Ces derniers produits ont tendance à rendre les signaux assez faibles en ESI-MS conventionnel. Les aspects fondamentaux aussi bien que les côtés pratiques de l'Attachement des Anions seront abordés.

Conférences Invitées

PROTEOMICS, STATE OF ART AND FUTURE PERSPECTIVES. ARE WE GOING IN THE RIGHT DIRECTION?

Peter Roepstorff[1]

1 - Department of Biochemistry and Molecular Biology - University of Southern Denmark

Proteomics has now been around for almost two decades. During this period it has undergone a dramatic development. The number of genomes sequenced, which is the basis for proteomics, has expanded exponentially. New generations of mass spectrometers and LC-equipments dedicated to the use in proteomics have been developed. New bioinformatics tools to handle the huge amount of data produced are constantly emerging. Presently several thousands of proteins are routinely identified and quantified in a high throughput proteomics experiment and the information stored in databases. Elegant techniques for enrichment of modified peptides have been developed and many modifications can be routinely site specifically assigned and quantified *e.g.* phosphosites. There has been a strong focus on the search for mechanisms behind diseases and for reliable diagnostic biomarkers. However, there are still limitations. The dynamic range of the proteins in the cells is 107-108 and in serum around 1011 and no analytical technique can handle such a dynamic range. In spite of the huge investments in search for reliable biomarkers only a few if any have been identified using proteomics. Better understanding of the basic biology and new concepts for identification of the relevant markers or combinations of markers are needed. Improved methods for enrichment of specific low abundant proteins must be developed. The present state of art of proteomics will be described and the need for rethinking the perspectives of the present trends in proteomics discussed.

C-02

CRAZY POLYSACCHARIDES : CRIBLAGE D'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE CONTRE UNE COLLECTION DE POLYSACCHARIDES

William Helbert[1]

1 - CERMAV-CNRS, Rue de la chimie, BP 53, F-38041 Grenoble cedex 9

Les polysaccharides sont les macromolécules les plus abondantes sur terre et dans les océans. À l'exception des polysaccharides utilisés traditionnellement en industries alimentaires et non-alimentaires, la structure et les fonctionnalités de la majorité des polysaccharides sont inexplorées. L'analyse structurale des polysaccharides est facilitée par la caractérisation d'oligosaccharides obtenus grâce aux enzymes de dépolymérisation : les glycosides hydrolases (GH) et polysaccharides lyases (PL).

Afin de croiser la diversité structurale des polysaccharides d'origine terrestre et marine avec la diversité biologique des bactéries sources de GH et PL, nous avons développé un crible moyen débit sur une collection de polysaccharides de structures connues et inconnues. La détection des enzymes est réalisée par colorimétrie et par spectrométrie de masse. Une procédure de criblage par spectrométrie de masse a été optimisée permettant de détecter les oligosaccharides neutres, cationiques et anioniques. En parallèle, nous avons réunis une collection d'environ 200 substrats oligo- et polysaccharides extraits de plantes, d'algues marines et de microorganismes (*i.e.* bactéries, microalgues).

Le criblage réalisé sur des extraits bactériens a permis, par exemple, de mettre en évidence l'influence des milieux de culture sur les profils de sécrétion de GH et PL par *P. carrageenovora*. La comparaison des fonctions GH et PL prédites dans le génome de *P. atlantica* avec les activités enzymatiques observées est un autre exemple d'application du criblage. L'apport de la spectrométrie de masse s'est avéré essentiel pour détecter des enzymes possédant des modalités de dégradation originales ou de nouvelles fonctions enzymatiques.

La mise en place du criblage a été réalisée dans le cadre d'un projet ANR-CP2D « CRAZY-polysaccharides » avec des équipes intéressées dans la compréhension des interactions enzymes/polysaccharides et dans l'analyse structurale (BIA-Nantes : Marc Lahaye, David Ropartz, Hélène Rogniaux, IFREMER-Brest : Claire Boisset, LAMBE : Régis Daniel, CEVA : Jean-François Sassi, AFMB : Pedro Coutinho, Bernard Henrissat)

[1] *M. Fer, A. Préchoux, J.-F. Sassi, M. Lahaye, C. Boisset, P. Nyvall-Collén, W. Helbert. J. Microbiol. Meth. 2012, 89, 22-229.*

[2] *D. Ropartz, P.-E. Bodet, C. Przybylski, M. Fer, F. Gonnet, R. Daniel, D. Bertrand, W. Helbert, H. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2011, 25, 2059-2070.*

SIMULTOF™ MASS SPECTROMETRY FOR HIGH PERFORMANCE MS-MS

Marvin L. Vestal[1]

1 - SimulTOF Systems from Virgin Instruments Corp., 60 Union Ave., Sudbury, MA 01776

A new principle for time-of-flight (TOF) mass spectrometry is described together with applications to analysis of small molecules, peptides, and intact proteins by MALDI. This advance allows simultaneous space and velocity focusing and provides both high resolving power and high sensitivity using a relatively simple analyzer. Existing TOF instruments employ “space focusing” and “delayed extraction” to reduce effects of initial position and initial velocity, but it is impossible to simultaneously achieve both space focusing and velocity focusing in these instruments. In recent work we have developed an alternative approach to focusing in TOF that overcomes this limitation. A new tandem TOF instrument has been developed that provides high resolution precursor selection, efficient fragmentation without a collision cell, and sensitive detection of fragments with high resolving power and mass accuracy. Applications to tissue imaging, MSIA, and LC-MS-MS are presented.

FINDING ANTIBODIES THAT NEUTRALIZE HIV

Beatrix M. Ueberheide[1], David Fenyö[1], Johannes F. Scheid[1], Michel C. Nussenzweig[1], **Brian T. Chait**[1]

1 - Rockefeller University, NY

Passive transfer of broadly neutralizing HIV antibodies can prevent infection, which suggests that vaccines that elicit such antibodies would be protective. Thus far, however, few broadly neutralizing HIV antibodies that occur naturally have been characterized. Here, we describe an investigation of the broadly neutralizing response against the CD4 binding site of HIV on a monoclonal level. To determine whether these antibodies are part of a larger group of related molecules, we cloned 576 new HIV antibodies from four unrelated individuals. All four individuals produced expanded clones of potent broadly neutralizing CD4-binding site antibodies that mimic binding to CD4. The new antibodies share a consensus of 68 IgH chain amino acids and arise independently from two related IgH genes. This led to the identification and characterization of several "highly active anti-CD4 binding site antibodies" and their expanded B cell families[1]. This presentation will highlight aspects of our mass spectrometric investigation that allowed us to compare for the first time the memory B cell and plasma cell compartments for these highly neutralizing protective antibodies.

[1] *J.F. Scheid et al, Science 333 (2011) 1633-7.*

PEPTIDE FRAGMENTATION:
SEQUENCE AND SIZE EFFECTS ON PEPTIDE FRAGMENTATION

Guillaume van der Rest[1], Renjie Hui[2], Gilles Frison[2], Julia Chamot-Rooke[2]

1 - Laboratoire de Chimie Physique, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex
2 - Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, École Polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex

Fragmentation of peptides is widely used in proteomics to gain sequence information on native or post-translationnaly modified peptides. Further information is related to protein database in order to achieve identification of either a protein or of the nature and position of post-translational modifications (PTMs). Up to now, most of these studies have only relied on the measurement of fragment masses and the intensities of the fragments are often left aside.

In this lecture, after a brief introduction on the currently accepted mechanism for thermal-like activation methods (CID, IRMPD, BIRD, …) and on the various models devised for electron transfer based activation methods (ECD, ETD), we will focus on the elements available in the literature showing key parameters identified for both type of activation methods. For thermal type activations, the mobile proton model[1,2] serves as a good basis in the interpretation of fragmentation pathways. Recent literature has shown that the cyclisation pathways play a major role in defining fragment abundances, but also in the formation of a number of minor fragments which, although minor, can account for a large fraction of the fragment ions. In this vein, we will introduce how the analysis of database fragmentation data proved an important source for understanding fragmentation behavior.

In a third part, we will focus on the analysis of electron induced fragmentation, and mostly ECD fragmentation which have been a major focus of our group in the past years. In ECD fragmentation, focus has been usually put on the formation of *c* and *z*-type fragments. Our work focused on the more global picture, taking also into account other fragment types. Based on both the analysis of a large fragment database[3,4] and detailed analysis of specific synthetic peptides, it can be shown : 1) that fragments other than *c* and *z* ions are major contributors in some ECD fragmentation spectra ; 2) that the relation between these pathways is strongly dependent on the peptide size and on the nature of amino-acids present in the sequence ; 3) that preferred positions for backbone cleavage can be identified for all fragment type and 4) that this position differs for each fragment-type. Based on these results, a model in which three independent pathways are in competition for the ECD fragmentation of peptides is proposed.

[1] *V.H. Wysocki, G. Tsaprailis, L.L. Smith, L.A. Breci, J. Mass Spectrom. 35, 1399–1406 (2000).*
[2] *K.A. Cox , S. J. Gaskell, M. Morris, A. Whiting, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7, 522-531 (1996).*
[3] *M.M. Savitski, F. kJeldsen, M.L. Nielsen, R.A. Zubarev, Angew. Chem. Int. Ed. 45, 5301 –5303 (2006).*
[4] *G. van der Rest, R. Hui, G. Frison, J. Chamot-Rooke J. Am. Soc. Mass Spectrom. 22, 1631-1644 (2011).*

L'EFFET ISOTOPIQUE DE L'OZONE : OBSERVATIONS, ÉTUDES, SON RÔLE ET SES APPLICATIONS

Christof Janssen[1]

1 - Laboratoire de Physique Moléculaire pour l'Atmosphère et l'Astrophysique (LPMAA) - UMR 7092, Université Pierre et Marie Curie / CNRS, 4 place Jussieu, Tour 32-33, 2ème étage 75005 Paris FRANCE

L'ozone est une molécule très importante dans l'atmosphère terrestre. Il y a 30 ans, les mesures atmosphériques ont révélé une composition isotopique anormalement élevée de cette molécule. Par rapport à l'air, les isotopes lourds de l'oxygène sont enrichis par une dizaine de pour cent environ. Cette composition isotopique est largement expliquée par le processus chimique de la formation de l'ozone. Jusqu'à maintenant, ce fractionnement isotopique qui présente par ailleurs un effet similaire pour les deux isotopes rares de l'oxygène, n'a pas de pareil dans les autres systèmes chimiques. Malgré les avancées théoriques et expérimentales, l'origine de cet effet n'est pas encore complètement comprise. Nous allons passer en revue les observations atmosphériques, les expériences et leurs applications, ainsi que les implications pour les sciences de l'atmosphère et le diagnostic des plasmas d'oxygène.

CONTRIBUTIONS OF MASS SPECTROMETRY IN THE UNDERSTANDING OF THE DROSOPHILA IMMUNE RESPONSE

Philippe Bulet[1,2]

1 - AGIM Laboratory (Ageing, Imaging Modeling, FRE 3405, UJF-CNRS) - Bâtiment Jean Roget, Faculté de Médecine, F-38700 La Tronche, France
2 - Platform Biopark Archamps, Bat. Le Forum, F-74160 Archamps, France

Research on the innate immune response of invertebrates has revealed several similarities with vertebrates. Insects have developed an acute response resembling that observed in humans, implicating effectors, receptors, and regulation of gene expression. Innate immunity is an ancient metazoan feature that allows animals to recognize typical chemical structures presented by invading microorganisms, and to activate a sophisticated set of humoral and cellular responses to control infection. The fruit fly *Drosophila melanogaster* has emerged in recent years as an original and powerful genetic model to study the evolutionary conserved genetic and molecular mechanisms operating in innate immunity. Higher insects such as *Drosophila* control infection by an array of innate immune reactions that include (i) phagocytosis and encapsulation by blood cells, (ii) proteolytic cascades leading to coagulation and melanisation, and (iii) secretion of a cocktail of potent AMPs. *Drosophila* is a well-recognized favorable genetic model system for the analysis of the first line defense against microorganisms. In 1991, when we started researching the immune response of this model, it was quite challenging to investigate, using conventional biochemistry and mass spectrometry (MS) approaches, the molecular mechanisms of the defense reactions in this genetic model for which the genome was not solved and annotated until 2000. Faced with this challenge, we developed refined sample preparations and methodologies – protocols taking advantage of ongoing improvements in MS, two-dimensional gel electrophoresis and bioinformatics - to perform differential analyses of blood (hemolymph) content from immune-challenged *versus* control *Drosophila*. Two strategies were developed virtually in parallel: (1) peptidomic analyses through matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS and high performance liquid chromatography for molecules below 15 kDa, and (2) proteomic studies based on gel electrophoresis, MALDI-TOF fingerprinting and database searches, for compounds of higher molecular mass. The peptidomic strategies led to the detection of an important number of peptides induced in the hemolymph of challenged flies as compared to controls. Of these, almost 30 molecules were characterized, amongst which were antimicrobial peptides. The gel electrophoresis strategy yielded the identity of a series of proteins that were potentially involved in the *Drosophila* immune response, including, to mention but a few of them, proteases, protease inhibitors, and serpins. Together, peptidomic and proteomic analyses serve the understanding of the molecular mechanisms involved in the innate immune reactions of *Drosophila*.

Keywords: Fruit fly, *Drosophila melanogaster*, hemolymph, innate immunity, mass spectrometry, 2D electrophoresis, peptidomics, proteomics

C-08

PETITES MOLÉCULES ET SPECTROMÉTRIE DE MASSE : LE REFLUX ET LE FLUX

François Couderc[1]

1 - Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Si la spectrométrie de masse a été initialement développée pour l'analyse des petites molécules du chimiste, elle a connu dans les dernières années une expansion vertigineuse dans l'analyse des grosses molécules en particulier les protéines et dans une moindre mesure les polysaccharides et les acides nucléiques.

Aujourd'hui, en particulier à cause de la métabolomique, de la lipidomique, des analyses de biochimie clinique ou pharmaceutique, ou encore des molécules de l'environnement, les couplages LC/MS, CE/MS, chips/MS, GC/MS deviennent de plus en plus importants pour étudier ces milieux où les petites molécules sont en concentrations très variables et dont la diversité est très importante.

Au cours de cette présentation, nous présenterons diverses applications de la spectrométrie de masse sur les petites molécules et leur mode d'étude en utilisant la haute résolution et/ou la MS-MS.

LC-HRMS BASED METABOLOMIC APPROACH AS A SCREENING TOOL IN HORSE RACING DOPING CONTROL

Natali Stojiljkovic[1], Patrice Garcia[1], Fanny Boyard[1], Ludovic Bailly-Chouriberry[1], Marie-Agnès Popot[1], Yves Bonnaire[1], Alain Paris[2], Christophe Junot[3], Jean-Claude Tabet[4]

1 - LCH, Laboratoire des Courses Hippiques, 15 rue de Paradis, 91370 Verrières-le-Buisson
2 - Met@risk INRA, 16, rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05
3 - CEA, Commissariat à l'Energie Atomique, Laboratoire d'analyse du Métabolisme du Médicament, Centre de Saclay, Bat 136, 91191 Gif sur Yvette Cedex
4 - LCSOB-IPCM, Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique, UMR 7201 CNRS, UPMC, Bat. F72, 4 places Jussieu, 75252 Paris Cedex 05

Implementation of mass spectrometry in doping control improved considerably sensitivity and selectivity/specificity of existing screening methods. Most of qualitative and/or quantitative measures and identifications of prohibited compounds are achieved with chromatographic/mass spectrometric means. However, most of these methods are based on target analysis of known compounds and approved therapeutics, and even small modification in chemical structure of substances (*e.g.* designer drugs), results with void analysis. Furthermore, direct detection of the administration of ''endogenous-like'' substances, such as some androgenic anabolic steroids or a full set of peptide hormones (*e.g.* GH, IGF-1, EPO) is still difficult. In this context, OMICS methods promise a pertinent alternative to direct detection of the doping substance abuse, with emphasis on the metabolomic approach, the final "omic" level in a biological system. Metabolomics is a comprehensive analytical approach that is nonselective and ubiquitous, with an aim to identify and quantify all metabolites of a biological system usually below 1000 Da (''small molecules''). With recent significant advances in liquid-chromatography/high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) instrumentation, the simultaneous monitoring of all metabolites capable to be ionized under atmospheric pressure ionization (API) conditions, can be performed.

In this context, LCH, the French horse doping control laboratory conducts several metabolomic projects in order to advance screening tools. Some of them are already applied in longitudinal profiling of fifty best French trotters (metabolomic profiling for reGH / rpGH / IGF-1 abuse) and others are at development stage. Principals and method development of metabolomic approach dedicated to horse doping control will be presented through the case of anabolic steroids administration with special attention to some critical steps such as sample preparation, confounding factors, statistical analysis and biomarker structural elucidation.

The potential of non-targeted metabolomics, as powerful screening tool, is encouraging and gives large-scale opportunities in discovering novel and/or emerging drugs.

LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE DANS L'HISTOIRE DE L'EXPLORATION DU SYSTÈME SOLAIRE

Cyril Szopa[1]

1 - Laboratoire Atmosphère Milieux Observations Spatiales, Université Pierre et Marie Curie, Université Versailles Saint Quentin, CNRS

La caractérisation de la composition chimique des objets du système et de leur environnement est un passage obligé pour déterminer l'origine et l'évolution de ces objets, celles de notre système solaire, ainsi que les processus qui ont permis l'émergence de la vie. Dans ce cadre, la spectrométrie de masse est utilisée depuis les années 1970, comme l'outil principal d'analyse chimique embarqué dans des sondes spatiales d'exploration du système solaire. La spectrométrie de masse est alors essentiellement utilisée pour la caractérisation de la matière volatile présente naturellement dans les environnements explorés, comme les gaz atmosphériques, ou issue du traitement d'échantillons (sol, aérosols…) prélevés et traités sur place par différents procédés (pyrolyse, impact…). Cette présentation vise à faire un état des lieux de cette instrumentation depuis la mission martienne Viking des années 1970, jusqu'aux missions actuelles aux destinations variées comme une comète ou la Lune.

MÉTABOLOMIQUE : PRINCIPES ET APPLICATIONS AU CONTRÔLE LARGE ÉCHELLE DE FACTEURS DE CROISSANCE INTERDITS EN ÉLEVAGE

Bruno Le Bizec[1], Jean-Philippe Antignac[1], Emmanuelle Bichon[1], Sylvain Chéreau[1], Frédérique Courant[1], Fabrice Monteau[1], Gaud Dervilly-Pinel[1]

1 - LABERCA, Oniris, École Nationale Vétérinaire, Agro-alimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, Atlanpôle la Chantrerie, F-44307 Nantes Cedex 3

L'utilisation de facteurs de croissance en élevage est interdite en Europe depuis une vingtaine d'années (directives 88/146/EC et 96/23/EC). Le dépistage de pratiques illégales repose classiquement sur le suivi de métabolites de substances connues caractérisés par approches analytiques ciblées. Ces dernières s'appuient quasi exclusivement sur des couplages associant chromatographie (en phase gazeuse ou liquide) et spectrométrie de masse. Efficaces pour des composés déjà décrits, ces stratégies analytiques sont en difficulté lorsque de nouvelles substances apparaissent sur le marché noir (designer drugs) ou que de nouveaux procédés d'administration sont pratiqués (cocktails bases doses, hormones gonadiques naturelles). Pour faire face à ces nouvelles pratiques potentielles, des alternatives de mesure doivent être pensées. Les approches analytiques non ciblées, *i.e.* non pas basées sur les résidus de composés connus mais sur l'action physiologique des substances anabolisantes, sont en ce sens prometteuses. Ces approches sans *a priori* s'intéressent à des segments plus ou moins larges de la biologie de l'animal avec pour ambition la mise en évidence de biomarqueurs d'une exposition à ces substances prohibées ; le métabolome est un vivier pour ces indicateurs. Le profilage métabolique peut ainsi couvrir une famille de composés subodorée impactée par l'usage d'une classe d'anabolisants (*e.g.* le stéroïdome), mais peut être aussi beaucoup moins focalisé en s'intéressant à une fraction plus large du métabolome (par prise d'empreinte) au moins celle que la stratégie analytique retenue permet d'investiguer. Il est évident que les étapes de préparation d'échantillons (dilute & shoot, LLE, filtration, SPE), la chromatographie séparative choisie (SFC, *vs* GC, *vs* LC) ou non (DART, DESI, ASAP), l'interface d'ionisation retenue (ESI, APCI, EI…) tout comme les caractéristiques de l'analyseur (haute résolution, multidimensionnelle) détermineront le type de sub-metabolome investigué et *in fine* la nature des biomarqueurs révélés. Nous disposons aujourd'hui d'un workflow complet depuis le design de l'expérimentation animale jusqu'à la validation des biomarqueurs. Son application à différentes familles de substances anabolisantes sera présentée dans cette plénière.

[1] *Mooney et al., TrAC Trends in Analytical Chemistry 2009, 28(6), 665-675*
[2] *Courant et al., The Analyst, 2009, 134, 1637–1646*
[3] *Kieken et al., Anal. Bioanal. Chem. 2009, 394, 2119-2128*
[4] *Pinel et al., TrAC Trends in Analytical Chemistry 2010, 29, 1269-1280*
[5] *Kieken et al., Metabolomics 2011, 7, 84–93*
[6] *Dervilly-Pinel et al., Anal. Chim. Acta 2011, 700, 144-154*
[7] *Antignac et al., TrAC Trends in Analytical Chemistry 2011, 30, 292-301*
[8] *Boyard-Kieken et al., J. Sep. Science 2011, 34(24), 3493-3501*
[9] *Dervilly-Pinel et al., Drug testing and Analysis 2012, 4(1):59-69*

SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX : LA POLLUTION GAZEUSE ET PARTICULAIRE

Frédéric Aubriet[1], Olivier Delhomme[1], Vincent Carré[1]

1 - Laboratoire de Chimie et de Physique – Approches Multi-Échelles des Milieux Complexes (LCP–A2MC) - Université de Lorraine, Institut Jean Barriol - 1 boulevard Arago F–57078 Metz Cedex 03

La plupart des activités humaines conduit à l'émission dans notre environnement de composés exogènes appelés classiquement contaminants qui au-delà d'un certain seuil peuvent être qualifiés de polluants. La diversité chimique de ces espèces (organique, inorganique, organométallique) et des sources auxquelles elles sont associées, conduit généralement à des matrices complexes dans lesquelles des composés présentant des risques significatifs pour l'environnement et/ou pour la santé sont souvent présents à l'état de traces voire, d'ultra-traces. La dynamique de concentration de ces contaminants concoure également à faire de l'étude de ces milieux, de véritables challenges analytiques.

Différentes approches peuvent être envisagées pour aboutir à une caractérisation aussi fine que cela puisse être possible de ces matrices complexes. L'analyse peut être menée de manière ciblée ou non ciblée. Dans le premier cas, on recherche spécifiquement à quantifier un composé ou une famille de composés à l'aide de méthodologies intégrant les étapes de prélèvement, d'extraction, de concentration, de dérivation éventuelle avant d'en effectuer l'examen par les techniques séparatives couplées de manière de plus en plus fréquente, à la spectrométrie de masse et à la spectrométrie de masse en tandem. Dans le second cas, l'analyse est réalisée sans *a priori*, et classiquement de manière *in situ*. Elle permet d'obtenir typiquement, une description exhaustive de la matrice à l'étude mais, elle est souvent limitée à une analyse purement qualitative. Ces deux premières approches sont menées de manière *off-line*. En effet, les étapes de prélèvement et d'analyse sont découplées dans le temps et dans l'espace. Outre les difficultés liées à la conservation, à la préservation et au transport des échantillons collectés, ces méthodes présentent le désavantage de conduire à des informations moyennées sur des périodes de temps plus ou moins longues et de ne permettre qu'une réaction *a posteriori* à des épisodes de pollution atmosphérique. Les développements instrumentaux récents assurent la réalisation sur site d'analyses en temps réel permettant de réagir promptement à des épisodes de crise. Jusqu'à présent limité à l'obtention d'informations purement qualitatives, des méthodologies innovantes sont maintenant disponibles pour certains contaminants afin d'en assurer sur site, la quantification et le suivi.

Les développements de la spectrométrie de masse appliquée à l'étude de milieux environnementaux ont largement concouru à la mise en place de ces nouvelles méthodes. Nous nous attacherons à tracer le large panel de techniques et méthodologies disponibles en spectrométrie de masse pour l'analyse et le contrôle dans les atmosphères ouverte et confinée (résidentielle ou de travail) des fractions gazeuses et particulaires. Nous illustrerons notre propos, pour certaines d'entre elles, d'exemples issus de travaux du laboratoire.

NATIVE MASS SPECTROMETRY TO DECIPHER INTERACTIONS BETWEEN BIOMOLECULES: PAST, PRESENT AND FUTURE

Sarah Sanglier-Cianférani[1,2]

1 - Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Université de Strasbourg, IPHC, 25 rue Becquerel 67087 Strasbourg, France.
2 - CNRS, UMR7178, 67037 Strasbourg, France

Mass spectrometry is generally understood as "molecular mass spectrometry" with multiple applications in biology (protein identification using proteomic approaches, recombinant protein and monoclonal antibody characterization). An original and unexpected application of mass spectrometry emerged some twenty years ago: the detection and the characterization of intact biological noncovalent complexes. With recent instrumental improvements, this approach, called native MS, is now fully integrated in structural biology programs as a complementary technique to more classical biophysical approaches (NMR, crystallography, calorimetry, SPR, fluorescence, *etc.*).

Native MS provides high content information for multiprotein complexes characterization, including the determination of the binding stoichiometries or oligomerization states, site-specificities and relative affinities. Recent developments of ion mobility / mass spectrometry instruments (IM-MS) provide a new additional level for MS-based structural characterization of biomolecular assemblies allowing size and shape information to be obtained through collisional cross section measurements.

A short history of native MS will be presented in combination with different examples of native MS for structural characterization of biomolecular assemblies, ranging from small protein/ligand systems to multiprotein-complexes and megaDaltons assemblies. Perspectives of native MS and IM-MS will finally be exposed.

RECENT DEVELOPMENTS AND TRENDS IN MASS SPECTROMETRY IMAGING

Andreas Römpp[1], Sabine Guenther[1], Nicolas Desbenoit[1], Yvonne Schober[1], Dhaka Bhandari[1], Bernhard Spengler[1]

1 - Justus Liebig University, Giessen, Germany

Mass spectrometry imaging is a versatile and powerful analytical technique. Our work is focused on further increasing the biologically relevant information that can be obtained by mass spectrometry imaging. Here we present a number of improvements in instrumentation, sample preparation, measurement parameters and data processing. The discussion will be based on phospholipids in mammalian samples, but the method was also successfully used for other applications including insect and plant specimen. Even though experiments are partially based on home-built instrumentation, a large part of the presented concepts and approaches is generally applicable.

MS imaging experiments were performed with a high resolution atmospheric-pressure imaging source[1] attached to 'LTQ Orbitrap', 'Exactive Orbitrap' or 'Q Exactive' mass spectrometers (Thermo Scientific GmbH, Bremen). Pixel size was between 3 and 10 µm. Mass accuracy was better than 2 ppm (root mean square) under imaging conditions. Tentative identification based on accurate mass was confirmed by on-tissue MS/MS experiments. MS images were generated with a bin size of m/z = 0.01, which largely eliminates interferences from neighboring peaks in complex samples.

A dedicated sample preparation protocol was established for the analysis of cell cultures. Phospholipids and smaller metabolites such as nucleic acids and cholesterol were imaged in single cells. A full metabolic profile was obtained from a single 7 µm pixel. Phospholipids were investigated in detail in mouse brain and human tumor samples. 'All ion fragmentation' experiments were used to image intact phospholipids simultaneously with their acyl chain and headgroup fragments. This allowed the (tentative) differentiation of isomeric lipid structures throughout the whole section within one experiment. A complete set of positive and negative ion images was obtained simultaneously by periodically switching the polarity of the ion optics throughout the imaging experiment. This significantly increased the number of lipids that could be identified in one experiment and thus improves the differentiation of tissue types.

Data processing and MS image analysis was based on home-built software. Additional data analysis tools were made accessible by conversion to the common data format for MS imaging - imzML (www.imzml.org). This enables a flexible choice of the software best suited for a given application. Measurements from different instruments (data formats) were converted to imzML and displayed in one software tool with identical settings in order to allow easy comparison.

[1] *Römpp et al. (2010) Angewandte Chemie International Edition 49 (22):3834-3838.*

IMAGERIE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI

Céline Meriaux[1,2], Julien Franck[1], Maxence Wisztorski[1], Isabelle Fournier[1], Michel Salzet[1]

1 - Equipe Imagerie MALDI – Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée (FABMS) EA 4550, IFR 147 Cité Scientifique Université Lille Nord de France – 59650 Villeneuve d'Ascq – France
2 – Adresse actuelle : Department of Neuro-Urology – School for Mental Health and Neuroscience Maastricht University Universiteitssingel 40, Room 2.558 P.O. Box 616 – 6200 MD Maastricht – Netherlands

Ces dernières années, l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI s'est révélée être un outil puissant pour la recherche de biomarqueurs puisqu'elle permet d'effectuer l'analyse d'un large panel de composés endogènes et exogènes dans des coupes de tissu. Des développements restent néanmoins à faire pour l'amélioration de la détection des molécules. La préparation de l'échantillon, incluant les traitements chimiques et le dépôt de la matrice, est dépendante de la nature du tissu et des molécules d'intérêt. Celle-ci influence la qualité des spectres et des images. D'autre part, les outils bioinformatiques tels que les analyses multi variées apportent des informations sur la répartition des marqueurs au sein du tissu en fonction des phénotypes cellulaires. Ces étapes sont donc cruciales pour les applications de l'imagerie dans le domaine de la biologie. Dans ce contexte, au cours de ma thèse, je me suis tout d'abord axée sur les développements méthodologiques tels que la création de nouvelles matrices adaptées à l'imagerie MALDI, *i.e.* les matrices ioniques liquides. Forte de ces développements, grâce à cette technologie, j'ai étudié, dans une optique de dynamique, les acteurs moléculaires de la régénération neuronale chez un modèle invertébré, la sangsue médicinale, après une lésion de la chaine nerveuse. Ensuite, mes études ont porté sur la recherche de biomolécules à partir de biopsies d'hippocampe de patients épileptiques. Mes travaux ont révélés l'existence de protéines associées à une distribution particulière correspondant à des couches de neurones anormalement présents dans l'hippocampe des patients épileptiques. L'ensemble de mes travaux a mis en évidence que cette nouvelles technologie d'imagerie moléculaire a atteint un niveau de maturité suffisant pour réaliser des études biologiques et cliniques en complément des techniques d'imagerie *in vivo* ou cytologique.

Communications Orales

ÉTUDE DES MODIFICATIONS DE L'APOLIPOPROTÉINE A1 APRÈS TRAITEMENT DE PHOTO-INACTIVATION VIRALE : ANALYSE EN PROTÉINE INTACTE PAR FT-ICR MS

Jérôme Choquel[1], Fabrice Bray[1], Alexia Ortiz[1], Christine Defer[2], Dominique Dernis[2], Jean-Jacques Huart[2], Caroline Tokarski[1], **Christian Rolando**[1]

1 - Miniaturisation pour la Synthèse, l'Analyse & la Protéomique (MSAP), USR CNRS 3290, Université Lille 1 Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France
2 - Etablissement Français du Sang Nord-de-France, 59000 Lille, France

L'apolipoprotéine A1 (ApoA1) est la protéine majoritaire des HDL (High Density Lipoprotein), édifices lipidiques assurant le transport et l'efflux du cholestérol. Préserver la qualité transfusionnelle du plasma est un objectif majeur pour l'Établissement Français du Sang. Plusieurs traitements d'inactivation virale sont actuellement utilisés en France. L'objectif ici est de caractériser l'ApoA1, après exposition inactivation photochimique, en identifiant des modifications chimiques susceptibles d'altérer ses fonctionnalités. Après purification de l'ApoA1, la stratégie analytique comprend une analyse par nanoLC-nanoESI-FT-ICR MS/MS ainsi qu'une analyse en protéine intacte en infusion directe par FT-ICR MS.

L'association phosphotungstate/$MgCl_2$/dextran permet une précipitation sélective des VLDL et des LDL. Après délipidation des surnageants, l'ApoA1 est isolée par double précipitation éthanolique. Enfin, l'ApoA1 est obtenue avec une pureté de 95% après séparation par chromatographie échangeuse d'anions.

L'ApoA1 a ensuite été purifiée à partir d'échantillons de trois plasmas après traitement d'inactivation photochimique, et les profils AEX de l'ApoA1 sont différents d'un plasma non-traité. Après digestion liquide, les peptides ont été analysés en triplicat par nanoLC-nanoESI-FT-ICR MS/MS (C18, 75 µm, 100 Å). De nombreuses oxydations ont été identifiées sur des résidus Met, Trp et Pro. Les peptides modifiés ont été quantifiés par approche label-free à partir de l'intensité de leur XIC dans les échantillons non-traités et traités. Les peptides oxydés contenant les Met86, Met112 et Met148 sont significativement surexprimés dans les échantillons photo-traités (p>95%). L'oxydation de ces Met est impliquée dans le dysfonctionnement de l'ApoA1 pour l'efflux de cholestérol.

Des analyses en protéine intacte par nanoESI-FT-ICR MS (9,4 T) en infusion directe ont été effectuées sur les ApoA1 purifiées. Un solvant 50/50 MeOH/eau 2% Isopropanol 0,1% acide formique a été utilisé pour augmenter la solubilité protéique. Plusieurs états de charges ont pu être détectés (z = 21 à 30). Après déconvolution, le massif de l'ApoA1 est obtenu avec une résolution unitaire, avec une masse moléculaire de 28 080 Da. Nous avons par ailleurs observé la présence de 4 autres formes d'ApoA1 suggérant diverses modifications dans l'échantillon non-traité. Une approche Top-Down utilisant la fragmentation ECD a été utilisée pour localiser et identifier ces modifications.

O-02

AMIDE HYDROGEN DEUTERIUM EXCHANGE OF TRANSLATION INITIATION FACTORS FOLLOWED BY ULTRA-HIGH RESOLUTION FT-ICR MASS SPECTROMETRY

Jianqing Wu[1], Pierre-Damien Coureux[2], Yves Méchulam[2], Emmanuelle Schmitt[2], Guillaume van der Rest[3]

1 - Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, École Polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex
2 - Laboratoire de Biochimie, École Polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex
3 - Laboratoire de Chimie Physique, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex

Amide hydrogen deuterium exchange (HDX) of proteins and protein complexes followed by mass spectrometry (MS) has reached a mature state. Nevertheless, the standard protocol relies on protein digestion using pepsin, the specificity of which is not well established. Therefore, systematic MS/MS of individual peptide is a prerequisite for the complete peptic peptide identification, which limits the further analysis as only MS/MS-identifiable peptides can be included in the exchange analysis step. Ultra-high resolution mass spectrometry enables highly accurate mass measurements that could, in principle, simplify the identification procedure. Nevertheless, our first attempts showed that mass accuracy alone was not sufficient for unambiguous identification, due to the common case of more than one peptide with the same or very close mass. This can arise even for small proteins of around 10 kDa. A statistical analysis of peptide cleavage sites by pepsin[1] was published and used in our approach as a basis for the development of a statistical tool predicting the probability of a given peptide to be present in a pepsin proteolytic digest. Using this calculated probability as a filter, a peptide reference list can be established without any MS/MS identification. The method has been verified by analysis of a series of peptide ions from five proteins of different sizes (11 kDa to 91 kDa) with standard q-TOF MS/MS fragmentation method. Out of more than 50 peptide ions examined by MS/MS, all have proven to be correctly identified with our new method.

Once validated, this method has been applied to data on the yeast eIF3 subunits. The yeast eIF3 complex involved in translation initiation in eukaryotes is composed of five subunits, three of which have been shown to interact with each other, whereas the precise binding regions remain to be elucidated. We aim on resolving the interactions of these 3 subunits: eIF3i (37 kDa), a C-terminal domain of eIF3b (11.3 kDa) and a domain of eIF3g (16 kDa). At present, two heterodimers formed by eIF3i with either eIF3g domain or eIF3b domain have been already characterized by liquid chromatography, and are investigated using HDX-MS. The current results regarding the interaction and dynamics of these two protein complexes will be presented.

[1] *Hamuro Y, Coales SJ, Molnar KS, Tuske SJ, Morrow JA. Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. Rapid. Commun. Mass spectrum. 2008, 22, 1041.*

DYNAMICS OF A BACTERIAL MULTIDRUG ABC TRANSPORTER USING HYDROGEN/DEUTERIUM EXCHANGE

Shahid Mehmood[1], Jean-Michel Jault[1], **Éric Forest**[1]

1 - Institut de Biologie Structurale - CEA, CNRS : UMR5075, UJF - Grenoble - France

The study of membrane proteins remains a challenging task and approaches to unravel their dynamics are scarce. Here, we applied H/D exchange coupled to mass spectrometry to probe the motions of a bacterial multidrug ATP-Binding Cassette transporter, BmrA, in the inward (resting state) and outward (ATP-bound) facing conformations. Trypsin digestion and global or local H/D exchange support the transition between inward and outward facing conformations during the catalytic cycle of BmrA. However, in the resting state, peptides from the two intracellular domains, especially ICD2, show a much faster H/D exchange than in the closed state. This shows that these two sub-domains are very flexible in this conformation. Also, molecular dynamics simulations suggest a large fluctuation of the Ca positions from ICD2 residues in the inward facing conformation of a related transporter, MsbA. These results highlight the unexpected flexibility of ABC exporters in the resting state and underline the power of H/D exchange coupled to mass spectrometry to explore conformational changes and dynamics of large membrane proteins.

[1] *Mehmood et al.Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press.*

ENRICHMENT BY FRACTION COLLECTION DEVELOPED FOR CE/MALDI-MS TO ANALYZE PROTEINS BY TOP-DOWN STRATEGY

Michael Biacchi[1], Ricky Bhajun[1], Yannis-Nicolas François[1], Emmanuelle Leize-Wagner[1]

1 - Laboratoire de Dynamique et Structure Moléculaire par Spectrométrie de Masse (LDSM2), CNRS – UMR7177, University of Strasbourg, Strasbourg

Protein identification and characterization seem to be one of the most important challenges posed to analytical sciences these last years. Capillary electrophoresis (CE) coupled with matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) is a technique highly suitable for the separation and detection of intact proteins. Since 1995, several approaches for coupling CE to MALDI-MS have been described[1,2]. However, due to its miniaturized format, CE suffers from a lower loading capacity which is a major drawback for trace analysis of proteins.

In this study, new instrumental developments allowed to improve CE-MALDI/MS coupling for the analysis of intact proteins. CE fractions were collected directly on a MALDI target, using a sheath-flow interface. A homemade delivery matrix system was developed in the laboratory to allow dry droplet deposit with matrix addition just after sample deposition. Moreover, a modification of the CE system allows obtaining a CE-UV-MALDI/MS coupling.

In a first step, a reproducible separation of protein mixture has been realized in CE/UV. Different background electrolytes and capillary coatings have been tested to allow an optimized separation compatible with CE/MALDI-MS. 1% Formic acid aqueous solution was selected and protein adsorption during CE separations was prevented by coating the capillaries with Polybrene. In a second step, we have evaluated the robustness of the homemade CE-MALDI interface. For this reason, all proteins were analyzed by MALDI-TOF-MS directly after fraction collection. In a third step, fraction enrichment has been realized by the repetition on the same MALDI target of several CE separations performed on the same proteins mixture.

The ultimate aim of this project is to obtain a suitable CE/MALDI-MS methodology for the analysis of complex proteins mixture by a Top-Down approach.

[1] *Foret F., Müller O., Thorne J., Götzinger W., Karger B.L., Journal of Chromatography A 1995, 716, 157-166.*
[2] *Walker K.L., Chiu R.W., Monnig C.A., Wilkins C.L., Analytical Chemistry 1995, 67: 4197-4202.*

LOCALIZATION OF NON-COVALENT PROTEIN-LIGAND BINDING SITES BY TOP-DOWN MASS SPECTROMETRY BASED ON VACUUM ULTRA-VIOLET (VUV) ACTIVATION

Francis Canon[1,2], Aleksandar Milosavljevic[3], Guillaume van der Rest[4], Matthieu Réfrégier[1], Christophe Nicolas[1], Pascale Sarni-Manchado[5], Véronique Cheynier[5], Laurent Nahon[1], Alexandre Giuliani[1,6]

1 - SOLEIL, l'Orme des Merisiers, St Aubin, BP48, 91192 Gif sur Yvette Cedex, France
2 - INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France
3 - Institute of Physics Belgrade, University of Belgrade, Pregrevica118, 11080 Belgrade, Serbia
4 - Laboratoire DCMR UMR91128 PALAISEAU cedex, France
5 - INRA, UMR 1083 Sciences pour l'Œnologie, 2 place Viala, F-34060 Montpellier, France
6 - Cepia, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France

Since the last decade, numerous researches have shown that many proteins are completely or partially disordered in their functional state. These observations question the usual paradigm in biology establishing that a well-defined three-dimensional structure is a prerequisite for the function of a protein. The high flexibility of these proteins, called Intrinsically Disordered Proteins (IDPs), gives them advantages to carry out their function and in particular to interact with their partners. Therefore, these proteins are able to interact with different and/or several partners leading to complex mixture. The structural study of such mixtures and flexible objects with classical bio-structural techniques is still challenging and time consuming. Therefore, the study of these proteins requires additional techniques. Top-down approaches using electron capture dissociation have demonstrated their ability to provide information on the primary structure of the full protein. They are also able to identify the protein binding site with its ligand. However, the sequences of IDP are particularly rich in proline residues whose cyclic ring precludes the formation of *c*- and *z*-type ions. Here, we present a method based on the coupling of VUV-synchrotron radiation and mass spectrometry in order to localize the noncovalent binding site of B2 3'O-gallate, a ligand tannin, on IB5, a human basic salivary proline-rich proteins (PRPs). PRPs belong to IDPs and their main function is to scavenge tannins. Tannins are harmful substances with anti-nutritional effects, which are widespread in plant-based foods.

Firstly, we have compared the effect of four wavelengths 193 (6.4 eV), 157 (7.8 eV), 94 (13.2 eV) and 77.5 nm (16 eV) with classical MS/MS techniques such as CID and ECD on the fragmentation of IB5. Secondly, we have studied the noncovalent binding site of B2 3'O-gallate on IB5 using VUV-radiation at 77.5 nm.

Regarding the fragmentation of IB5, our results show two different regimes of fragmentation as a function of the wavelengths. Below the threshold of the IB5 photoionization, we observed only *a*- and *x*-type fragment, while above, all types of fragments are generated. The best sequence coverage from all experiments has been obtained with VUV-excitation at 77.5 nm. Regarding the localization of the binding site on IB5, we have identified almost fifty fragments still linked to the ligand. Finally, our results allow to localize the noncovalent binding site of B2 3'OG on IB5.

O-06

VERS LA MISE AU POINT D'UN COUPLAGE DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE SUPERCRITIQUE / PHOTOIONISATION À PRESSION ATMOSPHÉRIQUE POUR L'ANALYSE DE SUBSTANCES NATURELLES

Marie Méjean[1], Didier Stien[1], Alexandre Giuliani[2,3], David Touboul[1], Alain Brunelle[1]

1 - Centre de recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France
2 - DISCO beamline, Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Saint-Aubin, 91192 Gif-sur-Yvette, France
3 - UAR1008 CEPIA, INRA , Rue de la Géraudière, 44316 Nantes, France

De nos jours, il devient nécessaire d'utiliser des techniques d'analyse ayant un faible impact environnemental et humain. Contrairement à la chromatographie en phase normale (HPLC) très consommatrice de solvants néfastes pour l'environnement, la chromatographie de phase supercritique (SFC)[1,2] est une technique « verte » et prometteuse puisque la phase mobile est principalement constituée de CO_2, produit de recyclage de l'industrie pétrolière.

La SFC est mise en œuvre avec une chaine HPLC modifiée (Agilent 1200) équipée d'un module Aurora Fusion permettant le passage du CO_2 à l'état supercritique. Deux détecteurs sont installés en série dont un détecteur UV (Diode Array Detector DAD) et un détecteur à diffusion de lumière (Evaporative Light Scattering Detector ELSD). À terme, l'instrument sera couplé à un spectromètre de masse équipé d'une source de photoionisation à pression atmosphérique (APPI)[3]. Les substances analysées sont des lipides de différentes familles chimiques comprenant des composés de la vitamine A et E, des esters de cholestérol, des sels biliaires, mais aussi des mélanges plus complexes comme les huiles essentielles. Après une phase d'optimisation afin de séparer correctement par famille les composés mis en mélange et l'obtention d'une résolution et d'une sélectivité optimale, les méthodes d'analyse de ces composés seront validées afin d'obtenir des approches fiables et robustes.

Un deuxième projet est basé sur l'analyse de composants d'huiles essentielles (composés aromatiques volatils) par APPI dont les photons sont émis par le Synchrotron SOLEIL (ligne DISCO). L'APPI se révèle être une technique intéressante pour l'analyse de molécules volatiles de faible poids moléculaire. Ce projet a premièrement pour but de mieux comprendre les mécanismes d'ionisation par APPI[3] et d'enrichir les bases de données sur les seuils d'ionisation de différentes classes de molécules présentes dans les huiles essentielles. Le système APPI-Q-TOF nous a permis par une variation de l'énergie des photons entre 7 et 9 eV de déterminer les seuils d'ionisation[4] de 9 monoterpènes ainsi que de composés volatils issus d'autres familles chimiques comme des aldéhydes, monoterpénols, cétones, esters terpéniques, sesquiterpènes, furocoumarines.

Le but final est de coupler la chromatographie en phase supercritique avec le système APPI-Q-TOF afin de combiner les performances des deux instruments pour l'analyse de substances naturelles variées.

[1] *T. Berger. Chromatography: Supercritical Fluid, Theory of Supercritical Fluid Chromatography. Encyclopedia of Separation Science, 2007, 1-9.*
[2] *L. T. Taylor. Supercritical Fluid Chromatography for the 21st century. J. of Supercritical Fluids, 2009, 47/3, 566-573.*
[3] *D. B. Robb, M. W. Blades. State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. Analytica Chimica Acta, 2008, 627, 34-49.*
[4] *D. Nanduri, A. Greenberg. Calculated ionization energies for a series of sesquiterpenes: comparisons with experimental vertical ionization energies and comments on related structure-activity relationships (SARs). Struct Chem, 2009, 20, 417-421.*

OMSS@IJM: A WEB-BASED PROTEOMICS DATABASE SEARCH ENGINE WITH EXTENDED CAPABILITIES TO ADDRESS THE IDENTIFICATION OF DISEASE-RELATED PROTEIN DEGRADATION PRODUCTS

Denis Mestivier[1], **Thibaut Léger**[2], Manuel Chapelle[2], Julie Le Faouder[2,3], Samira Laouirem[3], Valérie Paradis[3], Pierre Bedossa[3], Jean-Michel Camadro[2,4]

1 - "Modeling in Integrative Biology" Group, IJM
2 - Proteomics@IJM, Mass Spectrometry Core Facility
3 - Anatomo-pathology Lab, Beaujon Hospital, Clichy
4 - "Mitochondria, Metals and Oxidative Stress" Group, IJM"
IJM: Jacques Monod Institute, CNRS 7592 - University Paris Diderot, 15 street Hélène Brion, 75013 Paris Cedex 13, FRANCE

A major issue in clinical proteomics is the characterization of biomarkers, often resulting from the proteolytic cleavage of cellular proteins in organ and/or disease specific processes[1,2,3]. Actually no web-based search engine address the search and identification of biomarkers from MS/MS. We therefore developed a web service that focused on this important emerging domain of biomarker identification, OMSS@IJM, taking advantage of the attractive features of the open-source algorithm OMSSA[4]. Our web server allows the user to search a fragmentation spectrum for identification when non-specific cleavage is suspected. To reach this goal, we developed a set of software packages that produced and compiled databases corresponding to a given mass (expressed as MH^+) entered by the user, together with the MSMS fragmentation spectrum, but without specifying any protein cleavage chemistry.

We also implemented tools allowing the user to 1) analyze large datafiles by extending the size limitation (or number of spectra) restriction, 2) upload and search a private database in Fasta format, and 3) edit and search any non-standard modification of the amino-acids residues.

As a demonstrative example of the OMSS@IJM functionalities, we identified from LC-MS/MS data the monomeric form of ubiquitin as a molecular marker of hepatocellular carcinoma. Our web server has been tested and used since 10 months by the « Mass Spectrometry Core Facility » group of Jacques Monod Institute, and by the Anatomo-pathology Lab from Beaujon Hospital. It has also been used during a one-week master 2 course on proteomics.

Key words: Proteomics, Biomarker identification, Mass Spectrometry, OMSSA

URL: http://ytat2.ijm.univ-paris-diderot.fr/omssa/index.html
This website is free and open to all users and there is no login requirement.

[1] *Cottrell J.S. J Proteomics. (2011) 74:10, 1842-51.*
[2] *Le Faouder J. et al. J Proteome Res. (2011) 10:8, 3755-65.*
[3] *Villanueva J. et al. J Clin Invest, (2006). 116:1, 271-84.*
[4] *Geer L.Y. et al. J Proteome Res, (2004). 3:5, 958-64.*

O-08

ÉTUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE DES ACIDES AMINÉS INCORPORÉS LORS DE LA TRANSLECTURE

David Cornu[1], Sandra Blanchet[2], Manuela Argentini[3], Jean-Pierre Rousset[2], Olivier Namy[2]

1 - FRC 3115, ICSN, avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette
2 - Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud 11, 15 Rue Georges Clemenceau, 91405 Orsay
3 - IFR 115, ICSN, avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette

La terminaison de la traduction des protéines est un processus fidèle mais qui est systématiquement en compétition avec l'incorporation d'ARNt «proche cognat » au niveau du codon stop, on parle alors de translecture des codons stop. L'efficacité d'incorporation de chaque ARNt dépend non seulement de la complémentarité codon stop/anticodon mais aussi du contexte nucléotidique entourant le codon stop. De nombreuses maladies génétiques sont provoquées par l'apparition de codons stop prématurés (PTC) qui sont depuis une dizaine d'années devenus une cible thérapeutique. En effet le franchissement de ces codons par translecture peut restaurer la synthèse complète de la protéine mais avec une activité qui peut être fortement influencée par la nature de l'acide aminé incorporé au niveau du PTC. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la translecture, nous avons identifié et quantifié de façon relative par spectrométrie de masse les acides aminés incorporés lors de la translecture chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Après protéolyse des protéines purifiées, les analyses LC-MS/MS ont permis de montrer que pour l'ensemble des contextes nucléotidiques testés, les acides aminés majoritairement insérés sont la glutamine, la tyrosine et la lysine pour les codons stop UAA et UAG, la cystéine, le tryptophane et l'arginine pour le codon UGA. Ainsi la nature du codon stop détermine le choix des acides aminés majoritairement insérés dans le site de translecture.

Dans les cas des codons stop UAA et UAG une quantification relative des peptides qui chevauchent les sites de translecture a été effectuée par nanoLC-MS. Après correction des données de quantification par un facteur de réponse à l'ionisation déterminé à partir de standards, les résultats montrent que l'efficacité relative d'incorporation des acides aminés Q et Y varie selon le codon stop. L'ensemble de ces résultats en accord avec les prédictions du modèle génétique ont permis de valider la pertinence de la levure *S. cerevisiae* comme modèle de choix pour l'étude de la translecture. L'approche de quantification relative des peptides issus de la translecture sera étendue aux différents contextes afin d'évaluer l'effet de l'environnement nucléotidique sur l'efficacité d'incorporation des acides aminés déjà identifiés. À long terme nous espérons que cette étude contribuera à améliorer les traitements thérapeutiques de maladies liées à l'apparition de codons stop prématurés.

N-TERMINAL PROTEIN ACETYLATION IS FREQUENT IN *DEINOCOCCUS DESERTI* AND EXCLUSIVE OF SERINE AND THREONINE RESIDUES

Alain Dedieu[1], Jimmy Mewaere[1], Jean-Charles Gaillard[1], Bernard Fernandez[1], Jean Armengaud[1]

1 - CEA, DSV, IBEB, Lab Biochim System Perturb, Bagnols-sur-Cèze, F-30207, France

Maturation of newly synthesized proteins is common to all living organisms. Co-translational cleavage of the initiator methionine by the methionine aminopeptidase (MAP) is universal as seen through its occurrence in all prokaryotic and eukaryotic cells. Acetylation of the N-terminal residue of proteins by N-terminal acetyl transferases (NATs) is another well-described post-translational modification. It may occur on the initial methionine or on the penultimate residue if the methionine is removed. This modification is frequent in yeast and mammals with 40 to 90% of cytoplasmic proteins acetylated and rare in bacteria[1]. This acetylation has been described to occur frequently in some archaea[2] such as *Halobacterium salinarum* and *Natronomonas pharaonis*. This modification affects about 15% of the proteins and reveals an archeal-specific pattern of N-terminal acetylation in which serine and alanine residues are involved.

Here, we explored an ancient bacterial lineage, the *Deinococcus-Thermus* phylum, in order to trace back this modification during Life evolution. We present the first large-scale survey of N-terminal protein maturation in *Deinococcus deserti*, a gram-negative bacteria. This microorganism has been isolated from the surface sands sampled from Sahara desert. This bacterium was shown to be particularly tolerant to gamma and UV radiation, as well as desiccation[3,4]. We carried out a systematic search of this modification on cells harvested in different physiological conditions and merged the data obtained with two methods of proteome fractionation. We used first an *off-gel* approach to resolve by their isoelectric point the peptides resulting from the total proteome trypsinisation. Our high-throughput detection strategy with a LTQ-Orbitrap XL tandem mass spectrometer led to the detection of 12461 unique peptides, signing the presence of 1406 proteins. We also fractionate total peptides by means of a strong cation chromatographic exchange[5]. This led to the detection of 12446 unique peptides, corresponding to 1432 proteins. When merging both datasets, a total of 2090 proteins were identified, representing 61% of the theoretical proteome of this bacterium. We systematically listed the N-terminal peptides and found that a remarkably high percentage (54%) are acetylated. Furthermore, analysis of N-terminus acetylated peptides showed that 84% of acetylated amino acids are threonine, 10% serine, and 5% methionines which are not cleaved by the MAP. We found that some peptides are found in both forms: acetylated and unacetylated. The specific pattern of acetylation found in *D. deserti* should be conserved among all Deinococcales. A comparative genomics analysis is currently carried out to evaluate the specific traits of this ancient bacterial order in terms of protein N-terminus and acetylation.

---

[1] Jörg Soppa « Protein acetylation in Archaea, bacteria, and Eukaryotes » Archaea. 2010 Sep 16;2010.

[2] Falb M ; et al « Archeal N-terminal Protein Maturation Commonly Involves Nterminal Acetylation : A Large-scale Proteomics Survey » J Mol Biol. 2006 Oct 6;362(5):915-24. Epub 2006 Aug 3.

[3] De Groot et « Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium Deinococcus deserti. » PLoS Genet. 2009 Mar;5(3):e1000434.

[4] Baudet et al "Proteomics-based refinement of Deinococcus deserti genome annotation reveals an unwonted use of non-canonical translation initiation codons." Mol Cell Proteomics. 2010 Feb;9(2):415-26.

[5] Taouatas et al « Strong Cation Exchange-based Fractionation of Lys-N-generated Peptides Facilitates the Targeted Analysis of Post-translational Modifications» Mol Cell Proteomics. 2009 Jan;8(1):190-200.

[6] Hwang et al « N-terminal Acetylation of Cellular Proteins Creates specific Degradation Signals » Science. 2010 Feb 19;327(5968):973-7.

O-10

FORMATION, CHARACTERIZATION AND REACTIVITY OF GASEOUS ADDUCT OF CARBON DIOXIDE TO MAGNESIUM

Héloïse Dossmann (Soldi-Lose)[1], Carlos Afonso[1,2], Denis Lesage[1], Jean-Claude Tabet[1], Einar Uggerud[3]

1 - Institut Parisien de Chimie Moléculaire, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7201- FR2769, 4 Place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05
2 - Université de Rouen, UMR CNRS 6014 COBRA, 1 rue Tesnière, F-76130 Mont-Saint-Aignan
3 - Massespektrometrilaboratoriet og Senter for teoretisk og beregningsbasert kJemi (CTCC), kJemisk institutt, Universitetet i Oslo, Postboks 1033 Blindern, N-0315 Oslo

Activated forms of carbon dioxide are of great interest due to the relevance to photosynthetic CO_2 uptake and to sequestration of CO_2 from flue gases formed upon the burning of fossil fuels. One efficient fixation of carbon dioxide by covalent C-C bond formation is schematically described as $RX + CO_2 + 2\bar{e} \rightarrow RCO_2^- + X^-$. In plant cells, electrons are provided from chlorophyll via NADPH2 and formation of a bond between C-atoms of CO_2 and of another substrate occurs at the magnesium centered active site of the enzyme RuBisCO. In this context, we report here on the gas-phase characterization of a novel and fragile structural form of carbon dioxide bonded to magnesium, $HOMgCO_2^-$ showing interesting reactivity features.

Electrospray ionization was applied to mixtures of oxalic acid and magnesium salts $MgCl_2$ and $MgBr_2$ dissolved in CH_3OH/H_2O (v/v 90/10). From the recorded mass spectra, signal corresponding to the $MgC_2O_5H^-$ ion was observed. Upon collisional activation, this ion dissociates by losing CO_2, $2CO_2$ and MgC_2O_4 leading to the formation respectively of $HOMgCO_2^-$, $HOMg^-$ and HO^-. Different structures are probed theoretically for the ion of interest, $HOMgCO_2^-$ as well as its mechanism of formation from the $MgC_2O_5H^-$ ion. Results show that two structures are conceivable for this ion, $HOMg(\eta^2\text{-}O_2C)^-$ and $HOMg(\eta^2\text{-}OCO)^-$ whose energies are distinguished by a difference of by 31 kJ/mol, the other forms being higher by at least 69 kJ/mol. Furthermore, the complex shows a strong reactivity towards water which is present as a trace in the collision cell of the mass spectrometer. This reaction leads to the formation of a unique ion, $Mg(OH)_3^-$. Theoretical study of the mechanism of formation of this ion reveals a very exothermic pathway specifically from the $HOMg(\eta^2\text{-}O_2C)^-$ form. As will be discussed, this supports the hypothesis of the presence of only one structure for $HOMgCO_2^-$, *i.e.* $HOMg(\eta^2\text{-}O_2C)^-$. Finally, the reaction of the complex with CH_3Cl is investigated. Several product ions are observed, in particular Cl^- and $CH_3CO_2^-$ that are issued from a S_N2-type reaction.

ÉTUDE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE FT-ICR EN TEMPS RÉEL DE LA THERMODÉGRADATION DE MATÉRIAUX POLYMÈRES : CONSTANTES THERMOCINÉTIQUES ET SCHÉMAS MÉCANISTIQUES

Hubert Latappy[1,4], Michel Heninger[1,4], Julien Leprovost[1], Xavier Colin[2], Bertrand Roduit[3], Hélène Mestdagh[4]

1 - AlyXan, Bât 207B, Université Paris Sud, 91405 Orsay cedex ; http://www.alyxan.fr.com; hubert.latappy@alyxan.fr
2 - ARTS ET METIERS ParisTech, Laboratoire des Procédés et Ingénierie en Mécanique et Matériaux (UMR 8006), 151 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris
3 - AKTS AG Advanced Kinetics and Technology Solutions, http://www.akts.com, TECHNOArk 1, 3960 Siders, Switzerland
4 - Laboratoire de Chimie Physique (LCP), Université Paris Sud-11 / CNRS (UMR 8000), Bât. 350, F-91405 Orsay cedex, France

L'étude de la thermodégradation de matériaux organiques présente deux intérêts :
● l'identification de l'émission des composés organiques volatils (COV),
● l'obtention des paramètres cinétiques.

L'analyse de l'émission des COV se fait habituellement par GC/MS ou GC/FID après prélèvement, ce qui donne une information globale sur les différents produits émis mais aucune information sur la dynamique de dégradation. L'étude des constantes thermocinétiques est principalement effectuée par analyse thermogravimétrique (ATG) ou analyse thermique différentielle (ATD) qui permettent d'accéder aux constantes thermocinétiques globales de la thermodégradation[1] mais pas à la cinétique d'émission de chacun des composés.

Nous utilisons ici la spectrométrie de masse FT-ICR à bas champs[2] (1,5 T) associée à l'ionisation chimique permettant de suivre quantitativement et en temps réel les concentrations de COV durant l'émission. La grande résolution en masse de la technique FT-ICR permet d'identifier chaque COV par sa formule brute. Par exemple, l'ionisation chimique, par transfert de proton à partir de l'ion H_3O^+, permet d'une part d'ioniser sélectivement les COV sans ioniser l'air, d'autre part de fournir un spectre de masse en général facilement interprétable puisque correspondant aux différents COV protonés. Cependant l'utilisation du précurseur H_3O^+ comme agent protonant induit pour de nombreuses molécules des fragmentations, rendant difficile l'identification des composés réellement émis. L'utilisation d'autres précurseurs de protonation permet de simplifier l'interprétation des spectres et ainsi la compréhension des processus de thermodégradation grâce à une plus faible fragmentation.

Les données ainsi obtenues permettent d'une part de remonter à la formule chimique brute des composés émis, ainsi que de les quantifier, pour accéder aux mécanismes chimiques de dégradation[3]. D'autre part, grâce au logiciel d'analyse et de prédiction AKTS-Thermokinetics Software, ces données permettent d'obtenir les énergies d'activation et les facteurs préexponentiels des constantes de vitesse d'émission de chacun des composés[4].

L'étude du PMMA, matériau se dépolymérisant sous l'effet de la température, est présentée en vue de valider la technique, puis la thermodégradation du polypropylène sera exposée.

Ce double aspect de l'étude de la thermodégradation de matériaux organiques sera comparé aux différents modèles chimiques et cinétiques déjà proposés.

[1] *Ozawa, T. ; Thermochimica Acta , 2000, 355, 35-42.*
[2] *Mauclaire, G. ; Lemaire, J. ; Boissel, P ; Bellec, G. ; Heninger, M. Eur. J. Mass Spectrom. 2004, 10, 155-162.*
[3] *Sarrabi, S. ; Colin, X. ; Tcharkhtchi, A. ; Heninger, M.; Leprovost, J.; Mestdagh, H.; Anal. Chem., 2009, 81, 6013-6020.*
[4] *Roduit, B. ; Thermochimica Acta, 2000, 355, 1-2, 171-180.*

O-12

GAS-PHASE INTERACTIONS OF ORGANOTINS WITH GLYCINE

Latifa Latrous El Atrache[1], Jean-Yves Salpin[2,3], Violette Haldys[2,3], Catarina Correia[2,3], Jeanine Tortajada[2,3]

1 - Laboratoire de Chimie-Analytique et Électrochimie – Département de Chimie – Faculté des Sciences de Tunis – Campus Universitaire – 2092 El Manar – Tunis – TUNISIA
2 - Université d'Évry Val d'Essonne - Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement Bâtiment Maupertuis – Université d'Évry Val d'Essonne – Boulevard François Mitterrand – 91025 Évry; France
3 - CNRS – UMR 8587

Due to the wide industrial applications considerable amounts of the organotins have entered various ecosystems[1]. Depending on the nature and the number of the organic groups bound to the Sn cation, some organotins show specific effects to different organisms even at very low concentrations[2]. While organotins compounds have emerged as potentially biologically active compounds[3]. During the last few years it is noticeable that organotins compounds occupy an important place in cancer chemotherapy reports[4]. Considerable efforts have been directed to study the interaction of organotins with amino acids and peptides. To the best of our knowledge the interaction of amino acids with organotins or peptides by mass spectrometry has not been explored so far.

In this respect, the gas phase interaction of organotins with glycine was studied by means of mass spectrometry.

Interaction between di-organotins and glycine gives rise exclusively to a singly charged complexes of general formula $[(R)_2Sn(AA)-H]^+$ associated with formal deprotonation of glycine. MS/MS experiments show the loss of H_2O, CO and H_2O+CO. On the other hand losses of 57, 58 and 73 Daltons are specific of organotins and correspond to the formation of $[(R)_2SnOH]^+$, $[(R)_2SnNH_2]^+$ and $[(R)_2SnH]^+$ ions, respectively. A systematic study of the spectra obtained with labeled glycine concludes that the hydride in $[(R)_2SnH]^+$ is specifically a C(α) hydrogen. As regards tri-organotins only Trimethyltin showed interaction in gas phase. The abundant ion corresponds to $[(CH_3)_3Sn(AA)]^+$ which is dissociate by elimination of the intact ligand leading to carbocation $[(CH_3)_3Sn]^+$. In order to rationalize our experimental findings, we performed DFT calculations for the various systems. The most stable $[(R)_2Sn(Gly)-H]^+$ forms involve a bidentate interaction with the carboxylate group, while for triorganotins, the most stable coordination mode corresponds to monodentate interaction with zwitterionic amino acids. Finally the potential energy surfaces associated with the main fragmentation processes have also been explored.

[1] *J.T. Byrd, M.O. Andrae, Science 218 (1982) 565-569.*
[2] *M. Hoch, Appl. Geochem. 16 (2001) 719-743.*
[3] *L. Pellerto, L. Nagy, Coord. Chem. Rev. 224 (2002) 111-150.*
[4] *S. Tabassum, C. Pettinari, J. Organomet. Chem. 691 (2006) 1761.*

DÉVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE PROTÉOMIQUE POUR LA RECHERCHE DE BIOMARQUEURS DE LYMPHOPATHIES B À PARTIR DE MICROPARTICULES

Sarah Lennon[1], Laurent Miguet[2], Christine Carapito[1], Luc Fornecker[2], Laurent Mauvieux[2], Alain van Dorsselaer[1], Sarah Sanglier-Cianférani[1]

1 - Laboratoire de spectrométrie de masse bio-organique (LSMBO), IPHC, DSA, CNRS UMR7178, UDS, 67087 Strasbourg, France
2 - Institut d'Hématologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine, UDS, Strasbourg Cedex, France

L'utilisation de l'analyse protéomique pour la recherche de biomarqueurs reste toujours très discutée et a produit peu de résultats du fait de la complexité et de la large dynamique de concentration des échantillons (échantillons sanguins, plasmatiques…). Ajouter une étape de préfractionnement ou travailler sur un sous-protéome permet de limiter ce problème en enrichissant l'échantillon en protéines d'intérêt.

Cette étude concerne la recherche de nouveaux biomarqueurs différentiant des lymphomes B. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur un sous-protéome, le protéome membranaire, du fait de la versatilité d'utilisation des protéines membranaires de surface en routine en milieu hospitalier pour le diagnostic. Nous avons précédemment montré que les microparticules induites constituent un matériel enrichi en protéines membranaires[1]. Une stratégie protéomique optimisée tant au niveau de la préparation d'échantillon, de l'analyse nanoLC-MS/MS, de la recherche dans les banques de données que de l'interprétation des données a été mise au point. Afin d'assurer un niveau de confiance maximal, les identifications ont été validées par deux moteurs de recherche : Mascot et OMSSA. Cette stratégie protéomique optimisée nous a permis de proposer deux candidats biomarqueurs[2] qui ont été validés en routine clinique sur une large cohorte de patients (cytométrie en flux, immunohistochimie). Ces molécules permettent d'améliorer le diagnostic des hémopathies lors de l'immunophénotypage des lymphoïdes chroniques B, et plus spécifiquement de mieux distinguer les lymphomes du manteau et de la zone marginale.

Le travail présenté ici confirme l'intérêt des microparticules induites pour la recherche de biomarqueurs de lymphopathies et montre l'importance de l'optimisation de chaque étape de l'analyse protéomique dans le processus de découverte de nouveaux biomarqueurs.

[1] *Miguet L, et al. 2006. Proteomics 6: 153-71.*
[2] *Miguet L, et al. 2009. J Proteome Res 8: 3346-54.*

O-14

ANALYSE MICROPROTÉOMIQUE PAR IMAGERIE MALDI ET MICRO-EXTRACTION LIQUIDE DE SURFACE : APPLICATION AUX TISSUS FFPE POUR L'ANALYSE DE CANCER TUBO-OVARIEN

Maxence Wisztorski[1], Benoit Fatou[1], Jusal Quanico[1], Julien Franck[1], Isabelle Farre[2], Éric Leblanc[2], Isabelle Fournier[1], Michel Salzet[1]

1 - Université Lille Nord de France - Université Lille 1, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée, EA 4550, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France
2 - Centre Oscar Lambret, département de cancérologie gynécologique, 3 rue Frédéric- Combemale, 59020 Lille Cedex, France

L'imagerie par spectrométrie de masse (MSI) est une technologie innovante d'imagerie moléculaire, non ciblée, permettant d'obtenir la distribution de plusieurs centaines de biomolécules endogènes à un tissu en une seule étape d'acquisition. Nous avons récemment mis au point une technique d'identification *in situ* des biomolécules utilisant une extraction par micro-jonction liquide. Ce développement a permis l'identification de plus de 1500 protéines sur une zone de quelques centaines de micromètres[1]. Cette technologie offre un potentiel considérable pour les études dans le domaine de la clinique pour la recherche de biomarqueurs pronostics et diagnostics de pathologies.

Dans cette étude, la MSI et la microprotéomique sont appliquées au domaine de l'oncologie pour la recherche de marqueurs spécifiques de cancer sur des lésions tubaires carcinomateuses séreuses intra épithéliales. Le but est d'en préciser la nature et la localisation, sur la fimbria et en particulier au niveau des jonctions müllero-mésothéliales qui semblent être les plus exposées à ces anomalies.

En effet, la plupart des carcinomes ovariens associés aux mutations délétères BRCA1/2 semblent provenir de la trompe, en particulier de son pavillon ou fimbria. Ces cancers sont presque toujours de type haut grade séreux ovariens, tubaires ou péritonéaux.

Une étude préliminaire a été menée en imagerie moléculaire MALDI couplée à une approche microprotéomique, pour préciser les caractéristiques de ces jonctions, sur des blocs FFPE de Fimbria de patientes mutées BRCA 1 ou 2, afin d'y détecter des anomalies précoces et permettre d'expliciter le développement de ces tumeurs.

Plusieurs mises au point ont été nécessaires pour adapter la méthode initialement développée sur des tissus congelés, à l'utilisation de tissus FFPE (démasquage d'antigènes, optimisation de la digestion et de l'extraction…). L'apport de cette association entre la MSI et l'extraction par micro-jonction liquide a été confirmé, sur un premier échantillon restreint de patientes, par la mise en évidence de plusieurs molécules différentielles entre zone saine et tumeur cancéreuse. Cette étude est actuellement élargie à l'analyse d'une banque tissulaire comprenant plus de 400 patientes ce qui permettra d'affiner les résultats.

[1] *Quanico J., Franck J., Dauly C., Strupat K., Dupuy J., Day R., Salzet M., Fournier I., Wisztorski M. ; From MALDI-MSI to proteome mapping: a new strategy for proteins identification from tissues.; Mol Cell Proteomics.2012 (soumis).*

INTACT CELL MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY AND TOP-DOWN PROTEOMIC TO IDENTIFY BIOMARKERS

Valérie Labas[1,2], Elisabeth Blesbois[2], Véronique Cadoret[2,4], Xavier Druart[2], Audrey Gargaros[1,2], Nadine Gérard[2], Isabelle Grasseau[2], Anne-Christine Lalmanach[3], Lucie Spina[1,2,5], Ana-Paula Teixeira-Gomes[1,3], Svetlana Uzbekova[1,2], Jean-Louis Dacheux[1,2]

1 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours -Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France – Université de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France
4 - Unité de Biologie de la Reproduction, CHRU Bretonneau, 37044 Tours
5 - Present address, IPBS, UMR 5089, 31077 Toulouse

Over the last fifteen years, MALDI-TOF MS has been used directly on intact cells to obtain protein and peptide fingerprints, in 2-30 kDa mass range. This fast, reproducible and sensitive method known as Intact Cell MALDI-TOF-Mass Spectrometry (ICM-MS) has been widely used on microorganisms for their identification[1]. Also, on prokaryotes, several differential and quantitative applications of ICM-MS have been developed to display biomarkers. Recently, some experiments using ICM-MS were reported on mammalian cells.

In the field of reproductive physiology, our aim was to develop ICM-MS profiling on follicular and germinal cells from various species (bovine, human, equine, ovine, porcine, chicken), and to obtain new information about low molecular weight proteins' content in these cells. We demonstrated the application of differential and quantitative ICM-MS on male and female gametes and follicular cells, rising up to the scale of a single cell (oocyte)[2] in order to characterize biomarkers related to maturation stage of the gametes, their quality or oocyte competence to develop an embryo, or to evaluate the effect of sperm cryopreservation.

However, by this approach the biomarkers of interest remain to be identified. A bottom-up proteomic approach using SDS-PAGE/nanoLC-MS/MS can be performed but due to post-translational modifications no correspondence can be made between the theoretical mass of identified proteins and the experimental peak. Therefore, a Top-down proteomic approach was carried out to obtain peptide sequences and structural information. Enriched fractions were infused and analyzed by tandem high resolution mass spectrometry (LTQ Velos Orbitrap) with CID/HCD fragmentation modes. Identification and characterization were done using ProSight PC software. Several major peaks revealed by ICM-MS were formerly identified in different biological samples. Moreover, post-translational modification was displayed for some of them. We evidenced that the protease activities were, in part, at the origin of the numerous peptides constituting these peaks but not only.

In conclusion, the differential and quantitative ICM-MS on small quantities of isolated mammalian cells was successfully realized and revealed to be a sensitive and repeatable approach. ICM-MS proved to be a tool of choice for scarce and precious biological samples. Moreover, the use of complementary technology as Top-down HRMS allowed identification and further characterization of biomarkers.

---

[1] *Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, et al. (1996) Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 10: 1227-1232.*
[2] *Labas V, Spina L, Uzbekova S. Single cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis: mammalian oocyte profiling could reflect its quality. 10th World congress HUPO. 3-7 september 2011, Geneva.*

O-16

EXPLORATION DE L'ORGANISATION DES DÉPÔTS MALDI PAR RMN DU SOLIDE

Yannis Major[1], Hélène Pizzala[1], Fabio Ziarelli[2], Trang N. T. Phan[3], Giulia Mollica[1], Laurence Charles[1]

1 - Aix-Marseille Univ. – CNRS, UMR 7273: Institut de Chimie Radicalaire, Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale, F-13397 Marseille
2 - Aix-Marseille Univ. – CNRS, FR1739: Fédération des Sciences Chimiques, Spectropole, F- 13397 Marseille
3 - Aix-Marseille Univ. – CNRS, UMR 7273 : Institut de Chimie Radicalaire, Chimie Radicalaire Organique et Polymères de Spécialité, F-13397 Marseille

Les mécanismes qui régissent le processus de désorption et d'ionisation en MALDI restent encore mal compris. De nombreuses études se sont focalisées sur l'influence de la morphologie des dépôts solide sur la qualité des données MALDI. La distribution des molécules au sein de l'échantillon a été explorée en utilisant des techniques de microscopie[1,2], auxquelles ont été associées des techniques spectroscopiques telles que la spectrophotométrie de fluorescence ou la spectrométrie Raman afin d'obtenir des informations complémentaires. Des techniques d'imagerie basées sur la spectrométrie de masse ont également été utilisées[2,3]. Cependant, toutes ces approches n'ont pu fournir que des informations macroscopiques.

Cette étude propose d'utiliser la RMN du solide pour sonder la structure des échantillons à l'échelle atomique. La RMN haute résolution à l'état solide est actuellement une méthode spectroscopique incontournable pour la caractérisation fine de matériaux organiques. Le déplacement chimique des noyaux est extrêmement sensible aux variations locales de la structure, et des différences peuvent être observées dans les spectres RMN pour des échantillons qui sont identiques pour d'autres techniques à l'état solide. Un avantage supplémentaire de la RMN réside dans sa capacité à accéder à de nombreux noyaux, fournissant ainsi des données complémentaires qui permettent d'accéder à des informations structurales précises.

Afin de valider cette approche novatrice, un système modèle a été étudié : la matrice est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), l'analyte un poly(éthylène glycol) (PEG), et le chlorure de césium (CsCl) a été choisi comme agent de cationisation. Le mélange des trois composants a été effectué à l'état solide, par la méthode de broyage au vortex[4], pour éviter l'utilisation de solvant susceptible de complexifier l'organisation du dépôt. La RMN du solide a mis en évidence différentes associations moléculaires au sein du dépôt, complexes dont la formation est fortement liée au temps de broyage. Notamment, des spectres MALDI-MS de qualité optimale ont pu être obtenus à partir de dépôts contenant un complexe matrice/sel généré après des temps de broyage longs (*ca.* 16 min). L'humidité de l'atmosphère de préparation des échantillons, longtemps suspectée d'influencer les performances MALDI, joue un rôle crucial dans la formation de ce complexe 2,5-DHB/CsCl et des molécules d'eau ont pu être mises en évidence par RMN au sein de ce complexe.

[1] *S.D. Hanton, I.Z. Hyder, J.R. Stets, K.G. Owens, W.R. Blair, C.M. Guttman, A.A. Giuseppetti. J. Am. Soc. Mass Spectrom, 2004 , 15, 168–179.*
[2] *S.D. Hanton, T.M. McEvoy, J.R. Stets. J. Am. Soc. Mass Spectrom, 2008, 19, 874–881.*
[3] *R.W. Garden, J.V. Sweedler. Anal. Chem, 2000, 72, 30–36.*
[4] *S.D Hanton, D.M Parees. J. Am. Soc. Mass Spectrom, 2005, 16, 90-93.*

ATMOSPHERIC SOLID ANALYSIS PROBE ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY OF POLYPROPYLENE

Caroline Barrère[1], Florian Maire[1], Corinne Loutelier-Bourhis[1], Carlos Afonso[1]

1 - Université de Rouen, Laboratoire COBRA UMR 6014 & FR 3038, IRCOF, 1 Rue Tesnière, 76821 Mont St Aignan Cedex, France

Polyolefins, in particular Polypropylene (PP), constitute a very important class of polymer. Indeed, they have excellent material properties and interesting cost/performance ratio leading to a wide range of applications. In the recent years, the growing interest in recycling plastic wastes, as well as the understanding of their degradation mechanisms, increases the necessity of fast characterization of PP. The lack of organic function in this aliphatic polymer prevents cation attachment, making particularly difficult their analysis by mass spectrometry (MS). So, a classical way to study polyolefins by MS generally involves a pyrolysis step[1].

Recently, Atmospheric Solid Analysis Probe (ASAP) was developed as atmospheric ionization source for rapid analysis without sample preparation step[2]. This probe was applied to the identification of stabilizers in different polymer samples[3]. In the present study the combination of the ASAP probe with Ion Mobility Mass Spectrometry (IM-MS) was explored for PP characterization. The extra dimension given by Ion Mobility, based on the drift of ions in a buffer gas under the influence of an electric field, is highly complementary with MS data. While this combination (IM-MS) was widely used for biomolecules, it was also successfully applied to synthetic polymers[4].

Here we demonstrate the interest of IM-MS(/MS) in combination with the ASAP probe for fast and simultaneously characterization of both stabilizers and polymer. The intrinsic principle of ASAP allows in-source pyrolysis of PP, giving volatile and ionizable compounds, to be done. These residues were then analyzed and separated from volatile stabilizer ions in the mobility cell. Accurate mass measurements combined with IM-MS(/MS) experiments were carried on different samples, allowing a rapid identification of stabilizers. Moreover, different pyrolysis products were observed for sample with or without stabilizers, allowing the influence of stabilizers to be studied.

[1] *Lattimer, R.P, J. Anal. Appl. Pyrolysis, 1993, 26, 2, 65.*
[2] *McEwen, C.N. McKay, R.G., Larsen, B.S., Anal chem, 2005, 77, 23, 7826.*
[3] *Trimpin, S., Wijerathne, K., McEwen, C.N., Anal. Chim. Acta, 2009, 654, 1, 20.*
[4] *Song, J.K., Grun, C.H., Heeren, R.M.A., Janssen, H.G.J, Van den Brink, O.F., Angew. Chem., Int. Ed., 2010, 49, 52, 10168.*

O-18

LOCATION OF THE ADDUCTED CATIONS IN PEG-GRAFTED DENDRIMER BY ESI-MS/MS

Aura Tintaru[1], Qi Wang[2], Ling Peng[2], Laurence Charles[1]

1 - Aix-Marseille Université, Institut de Chimie Radicalaire UMR 7273, Équipe SACS – 13397 Marseille Cedex 20, France
2 - Aix-Marseille Université, Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille, Faculté des Sciences de Luminy, UMR 7325 – 13288 Marseille Cedex 9, France

Poly(ethylene oxide) functionalized with a poly(amido) amine end-group (PAMAM-POE) have been synthesized in order to be conjugated with antibody or peptide ligand for specific delivery to cancer cells or tumor tissues. In these new molecules, the POE segment acts as a linker between dendrimer and antibody. Due to the high symmetry of both polymer and dendrimer parts of these new molecules, nuclear magnetic resonance (NMR) approaches are relatively limited whereas mass spectrometry (MS) techniques associated to soft ionization processes are very powerful tools for their structural characterization.

Fragmentation rules of individual POE[1,2] and PAMAM[3,4] are well known and thoroughly described in the literature. However, presence of a PAMAM dendrimer as one chain termination could influence the polymer dissociation. Hence, the MS/MS behavior of PAMAM-POE was investigated as a function of the adducted cation.

Different generations of PAMAM-POE, solubilized in methanolic solutions containing different cationizing agents were electrosprayed and submitted to collision-induced dissociation (CID) experiments. Activation of the lithiated molecules was shown to induce specific dissociation of the dendrimer moiety. Increasing the size of the cationizing alkali gave rise to poorly informative data, consistently with previously reported data on POE fragmentation, indicating the strength of interactions within the ionic adducts decreases as the cation size grows[1]. In contrast, CID spectra of protonated molecules mainly displayed POE fragmentation pattern. These results indicate that location of the charges in the dissociating precursors highly depends on the nature of the adducted cation. NMR experiments aiming at locating cations within the investigated molecules in the liquid phase are consistent with these MS/MS findings.

[1] *C. Wesdemiotis, N. Solak, M.J. Polce, D.E. Dabney, K. Chaicharoen, B.C. Katzenmeyer, Mass Spectrometry Review 30 (2011) 523.*
[2] *M. Girod, Y. Carissan, S. Humbel, L. Charles Int J. Mass Spectrom, 272 (2008) 1.*
[3] *S.A. McLuckey, K.G. Asano, T.G. Schaaff, J.L. Stephenson, Int. J. Mass Spectrom. 196 (2000) 419.*
[4] *R. Giordanengo, M. Mazarin, J. Wu, L.Charles, Int J. Mass Spectrom, 266 (2007) 62.*

APPORT DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET DES MÉTHODES DE RÉFÉRENCE POUR LE CONTRÔLE QUALITÉ EN BIOLOGIE CLINIQUE

Vincent Delatour[1], Maud Heuillet[1], Maryline Peignaux[1], Béatrice Lalere[1], Sophie Vaslin-Reimann[1]

1 - LNE - Département « Biomédical et chimie organique »

En France, la réforme de la biologie médicale rendra obligatoire d'ici quelques années l'accréditation par le COFRAC de tous les laboratoires (publics comme privés) selon la norme ISO EN 15189. Ce référentiel implique l'utilisation de procédures validées et dont les résultats doivent être raccordés à un étalon national ou international par le biais d'une chaîne de traçabilité métrologique ininterrompue. Actuellement, on constate que les résultats des analyses de biologie médicale ne sont pas toujours traçables à des références reconnues internationalement (comme par exemple des matériaux de référence certifiés ou des méthodes de référence) et que les incertitudes de mesure ne sont pas systématiquement évaluées. Cette situation est en contradiction non seulement avec la norme ISO EN 15189 mais aussi avec d'autres référentiels internationaux comme la directive 98/79/CE de l'UE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*[2], qui exigent que les valeurs associés aux matériaux d'étalonnage ou de contrôle de la qualité soient traçables aux étalons de mesure d'ordre métrologique supérieur. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes de référence pour le dosage des principaux biomarqueurs utilisés en biologie médicale. Ce besoin étant largement insatisfait à l'échelle nationale, le LNE (Laboratoire National de métrologie et d'Essais) a déjà initié plusieurs projets en ce sens, portant sur le dosage de la créatinine, du glucose, du cholestérol total et de l'hémoglobine glyquée HbA1c. Ces méthodes de référence reposent la plupart du temps sur la dilution isotopique associée à la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, qui est une méthode de haute exactitude permettant d'obtenir de très faibles incertitudes de mesures. L'apport de la métrologie et des méthodes de référence est déterminant pour améliorer la fiabilité des analyses et permettre la comparabilité des résultats. Par exemple, les méthodes de référence permettent d'assigner des valeurs de référence aux échantillons de contrôle de la qualité, permettant ainsi d'évaluer la justesse des méthodes utilisées en routine dans les laboratoires de biologie médicale. Les méthodes de référence permettent également d'assigner des valeurs de référence aux matériaux d'étalonnage et aux matériaux de référence certifiée, une étape indispensable pour établir la traçabilité métrologique des résultats et raccorder ceux-ci aux unités du système international.

O-20

ANALYSE PAR LC-MS/MS HAUTE RÉSOLUTION DU COMPLEXE DE LA CASPASE 8 LORS DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ANTIBACTÉRIENNE CHEZ LA DROSOPHILE

Yann Verdier[1], Hidehiro Fukuyama[2], Iman Haddad[1], Jean Rossier[3], Jules Hoffmann[2], Joëlle Vinh[1]

1 - ESPCI-ParisTech, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, USR 3149 CNRS ParisTech, 10 rue Vauquelin 75231 Paris, France
2 - Centre National de La Recherche Scientifique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67084Strasbourg
3 - ESPCI-ParisTech, Neurobiologie et Diversité Cellulaire, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris, France

La drosophile est un modèle intéressant pour l'étude de la réponse immunitaire innée. Les travaux, essentiellement génétiques, menés sur ce modèle ont montrés que deux voies de signalisation intracellulaires contrôlent l'expression des gènes après une infection bactérienne : (1) la voie Toll, activée après infection par des champignons ou des bactéries Gram-négatives, et (2) la voie Imd, en réponse aux infections par des bactéries négatives à la coloration de Gram[1]. Seule une douzaine de protéines ont été décrites comme étant impliquées dans cette voie, dont la protéine Dredd, orthologue de la caspase-8. Ce travail vise tout d'abord à décrire le complexe moléculaire associé à Dredd.

La description d'un complexe moléculaire nécessite sa purification dans un état physiologique reflétant la réalité, puis l'identification de ses différents composants. Les méthodes de purification d'affinité avec des systèmes streptavidine-biotine sont fréquemment utilisées dans ce but. Cependant, en raison de l'extraordinaire stabilité de l'interaction entre la streptavidine et la biotine, l'élution de protéines marquées à la biotine reste délicat. Les critères de validation des protéines identifiées sont également importants.

Dans ce travail, nous avons transfecté des cellules de drosophile avec un vecteur d'ADN contenant la protéine Dredd marquée à la biotine. Après purification d'affinité, différentes stratégies ont été testées, et les protéines identifiées par LC-MS/MS. Un protocole de protéolyse réalisée directement sur billes a permis l'identification du plus grand nombre de protéines associées à Dredd, comparé à des protocoles d'élution standards.

Un essai fonctionnel a montré qu'une large proportion des protéines spécifiquement identifiées dans l'échantillon Dredd est impliquée dans l'activation de la voie Imd. Ces protéines ont déjà été décrites comme ayant des fonctions dans la réponse immunitaire (BG4, Q9VP57), stress (HSP7C, Q9VXQ5), fonction structurale (TBB1, CP190), biosynthèse (Q9W1B9) et fonction redox (SODC)[2].

Pour obtenir une description plus précise de la voie Imd, les dix autres acteurs canoniques de cette voie ont été clonés, et leurs protéines associées après un challenge bactérien identifiés par la même stratégie. De façon globale, l'analyse des composants de ces complexes permet une description beaucoup plus fine de cette cascade de signalisation et suggère de nouveaux mécanismes moléculaires d'activation de cette voie de signalisation.

[1] *Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of Drosophila melanogaster. Annu Rev Immunol 2007;25:697–743.*
[2] *Fukuyama H, Ndiaye S, Hoffmann J, Rossier J, Liuu S, Vinh J, Verdier Y. On-bead tryptic proteolysis: An attractive procedure for LC-MS/MS analysis of the Drosophila caspase 8 protein complex during immune response against bacteria. J Proteomics. 2012 Mar 17.*

DÉTECTION DE *BORRELIA BURGDORFERI* DANS DES EXTRAITS CUTANÉS PAR LC-SRM

Amandine Boeuf[1], Gilles Schnell[1], Aurélie Kern[2], Elody Collin[2], Véronique Delval[1], Benoît Jaulhac[2], Nathalie Boulanger[2], Laurence Sabatier[1]

1 - Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Département des Sciences Analytiques, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg
2 - Physiopathologie et médecine translationnelle : groupe Borréliose de Lyme, Facultés de Pharmacie et de Médecine, Strasbourg

La maladie de Lyme, ou borréliose de Lyme, est une maladie vectorielle causée par la bactérie *Borrelia burgdorferi sensu lato* et transmise à l'hôte (homme, animal) par piqûre de tiques du genre *Ixodes*.

Cette maladie se manifeste par des atteintes cutanées, neurologiques, articulaires ou cardiaques pouvant survenir quelques jours à quelques années après la piqûre de tique. Détectée de manière précoce, un traitement antibiotique permet une élimination rapide de l'agent infectieux. Détectée tardivement, la guérison est plus lente et certains symptômes persistent. Dans ce contexte, notre projet vise à développer, à partir de prélèvements cutanés réalisés au point de piqûre, une méthode de détection de marqueurs protéiques de la bactérie par LC-SRM.

Pour cela, nous nous intéressons à la détection de deux protéines de *Borrelia burgdorferi* dans des biopsies murines. La première étape a été de mettre au point un protocole d'extraction des protéines de la peau. La seconde étape a été d'optimiser la détection des deux protéines d'intérêt par LC-SRM. Pour cela, trois peptides protéotypiques par protéine et au moins trois transitions par peptide ont été sélectionnés. Nous avons ensuite montré un effet de matrice important, empêchant la détection de ces peptides dans des extraits trop concentrés. Enfin, nous avons déterminé la limite de détection des peptides cibles dans cette matrice complexe.

Cette approche sera étendue à des biopsies humaines et à d'autres protéines bactériennes. De plus, des analyses sont en cours pour comparer notre stratégie aux méthodes actuelles de diagnostic de la maladie de Lyme.

O-22

LA DIFFÉRENCIATION DE DIASTÉRÉOISOMÈRES PAR COUPLAGE SPECTROMÉTRIE DE MASSE - MOBILITÉ IONIQUE : LE RÔLE DE LA CATIONISATION

Virginie Domalain[1], Marie Hubert-Roux[1], Catherine Lange[1], Vincent Tognetti[1], Laurent Joubert[1], Jacques Rouden[2], Carlos Afonso[1]

1 - Université de Rouen, CNRS-UMR 6014 COBRA, CNRS FR 3038, Équipe Analyse et Modélisation
2 - ENSICAEN, CNRS-UMR 6507, Chimie Moléculaire et Thio-organique (LCMT)

La notion de chiralité joue un rôle important en biochimie, notamment dans le domaine thérapeutique. En effet, les énantiomères sont bien connus pour présenter des activités biologiques différentes. Il est donc nécessaire de les séparer. Cependant, ces molécules présentent des propriétés chimiques identiques qui rendent leur séparation difficile. La différenciation des énantiomères porte sur la formation de diastéréoisomères. C'est sur ce principe que reposent les méthodes utilisant la spectrométrie de masse pour l'analyse d'énantiomères. En effet, celles-ci sont souvent basées sur la dissociation induite par collision (CID) d'adduits diastéréoisomèriques[1,2]. Le couplage de la mobilité ionique à la spectrométrie de masse a d'ores et déjà fait ses preuves pour la séparation d'isomères de position[3] et représente une nouvelle alternative pour l'analyse de diastéréoisomères. En effet, la mobilité ionique offre une deuxième dimension à l'analyse : le temps mis par un ion pour traverser la cellule de mobilité remplie d'un gaz tampon. Ce temps de dérive varie en fonction de la section efficace de collision c'est-à-dire selon la conformation en phase gazeuse de l'ion. Ainsi, des molécules possédant le même rapport *m/z* mais ayant des sections efficaces de collision différentes peuvent être différenciées.

Nous nous sommes ici intéressés à l'analyse IM-MS de diastéréoisomères possédant différentes fonctionnalisations. Cette étude a été réalisée sur un Synapt G2 (Waters). Afin d'optimiser les conditions de séparation, plusieurs stratégies ont été développées telles que la formation de complexes non-covalents avec différents métaux, notamment des métaux alcalins, et le changement de gaz dans la cellule d'IMS. Dans un premier temps, les diastéréoisomères (M) et les métaux alcalins (X) ont été mis en solution puis ionisés par électrospray. Le temps de dérive de chaque ion a ensuite été déterminé via l'analyse en mobilité ionique. L'étude a porté sur les monomères $[M+X]^+$ mais également sur les dimères et trimères : $[2M+X]^+$, $[3M+X]^+$. Finalement, cette étude met en évidence que l'ajout de lithium permet d'augmenter de manière significative la séparation des diastéréoisomères. Il a également été montré que la formation de multimères non-covalents permet de mieux différencier les deux diastéréoisomères. Actuellement, des calculs théoriques sont réalisés afin de comprendre le rôle des différents métaux alcalins dans la séparation en mobilité ionique.

[1] *Wu, L.; Andy Tao, W.; Cooks, R.G. J. Mass Spectrom. 2003, 38, 386-393.*
[2] *Mancel, V.; Sellier, N.; Lesage,D.; Fournier, F.; Tabet, J-C. Int. J. Mass Spectrom. 2004, 237, 185-195.*
[3] *Clowers, B.; Dwivedi, J.; Herbert, H. Hill, Jr. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2005, 16, 660-669.*

APPLICATION OF 'INTENSITY ION FADING' APPROACH FOR SEARCHING INHIBITORS OF TYROSINASE IN COMPLEX MIXTURES

Aleksander Salwiński[1], Raphaël Delépée[1], Benoît Maunit[1]

1 - Institute of Organic and Analytical Chemistry (ICOA), UMR 7311, University of Orléans, BP 6759 45067 Orléans cedex 2, France

Inhibitors of tyrosinase are attractive from the point of view of the cosmetic industry for the reason of their prospective application in the treatment of the symptoms of skin hyperpigmentation. Plants and other natural products constitute an important source of biologically active substances. During our work we evaluate an application of 'intensity ion fading' mass spectrometry (IF-MS) approach to find the specific interactions between tyrosinase and the component(s) of the plants with minimal pre-treatment of the extract. IF-MS, described for the first time in 2003 by the group of Professor Francesc Aviles[1], was shown to be a useful, relatively easy and efficient method to study protein-ligand interactions in the complex mixtures. IF-MS methodology is based on the observation of the formation of specific protein-ligand complexes leading to the decrease ('fading') of the ion response of the MS-accessible ligand in the analyzed sample (comparing to the reference without the target)[2]. Our IF-MS approach is based on the application of immobilized protein as the target in studied sample. This approach seems to be more versatile comparing to the application of 'free' enzyme, since protein-ligand complex covalently connected with solid support may be easily separated from the solution and subjected to 'ligand recovery' step to confirm the initial 'ion fading' results. Both original protocol and further works in this domain utilize MALDI-MS as the leading tool[3,4] and as such is not suitable for studying small molecules. In our laboratory we synthesized core-shell type silica-coated iron oxide magnetic nanoparticles (MPs) having high protein loading capacity. MPs turned out to be very efficient support for matrix-free surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) both in a raw state and also with attached proteins. It opened the possibility of studying interactions of low-mass molecules with protein target by conducting MPs-assisted comparative analysis both in solution (by ESI-MS) and directly on MALDI plate, avoiding in the latter case the background of the matrix. During the presentation we will discuss the application and critical steps of IF-MS methodology for recognizing inhibitors of tyrosinase, on the basis of our work on standards (kojic acid, glabridin) and real samples: extract of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*).

[1] *J. Villanueva, O. Yanes, E. Querol, L. Serrano, F. X. Aviles, Anal. Chem. 2003, 75, 3385-3395.*
[2] *O. Yanes, J. Villanueva, E. Querol, F. X. Aviles, Nature protocols, 2, 2007, 119-130.*
[3] *O. Yanes, A. Nazabal, R. Wenzel, R. Zenobi, F. X. Aviles, Journal of Proteome Research 2006, 5, 2711-2719.*
[4] *O. Yanes, F. X. Aviles, P. Roepstorff, T. J. D. Jørgensen, J Am Soc Mass Spectrom 2007, 18, 359–367.*

O-24

DÉVELOPPEMENT D'OUTILS ANALYTIQUES BASÉS SUR LA NANO-CHROMATOGRAPHIE POUR L'ÉTUDE DE L'ACCUMULATION ET DU MÉTABOLISME DE CONTAMINANTS ORGANIQUES CHEZ DES INVERTÉBRÉS AQUATIQUES D'EAU DOUCE

Audrey Buleté[1], Robert Baudot[1], Laure Wiest[1], Marion Gust[2], Jeanne Garric[2], Cécile Cren-Olivé[1]

1 - Institut des Sciences Analytiques-UMR5280, Service Central d'Analyse, Chemin du canal, 69360 Solaize
2 - CEMAGREF, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3 bis quai Chauveau, 69336 Lyon

Un des enjeux majeurs des sciences environnementales est d'évaluer le risque lié à la dispersion d'un nombre croissant de produits chimiques dans les écosystèmes, et ses conséquences. Or, les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation des médicaments sont extrêmement peu travaillés au point de vue recherche fondamentale. Si quelques travaux ont tenté de mesurer des conséquences biologiques d'une exposition à différents contaminants organiques sur des invertébrés aquatiques d'eau douce (insecte, crustacé, cnidaire), peu de données, voire aucune n'est disponible quant à la contamination des invertébrés aquatiques benthiques des milieux, pourtant à la base des chaines trophiques et par conséquent de l'évaluation de l'état des écosystèmes. Ce manque d'informations s'explique notamment par l'absence de méthodologies analytiques adaptées aux matrices environnementales biotiques de très petite taille. Il s'agit, en effet, de détecter les substances recherchées à l'état de traces (ng voire pg/g) dans quelques mg de matrices complexes, rendant d'autant plus délicates les étapes d'extraction et d'analyse.

Dans ce contexte, de nouveaux outils analytiques permettant l'étude non seulement de la bioconcentration, mais aussi du métabolisme de contaminants organiques chez des invertébrés aquatiques ont été développés. Le projet s'est concentré sur l'analyse et l'étude de la bioconcentration de deux molécules retrouvées dans l'environnement au niveau des sédiments et des eaux de surface et potentiellement bioaccumulables : un antidépressif (la fluoxétine) et un médicament anti-convulsif (la carbamazépine) dans deux mollusques gastéropodes.

L'originalité de notre démarche a été d'adapter les techniques utilisées lors des étapes d'extraction et d'analyse proprement dite à la petite taille des échantillons. Cette stratégie analytique s'est donc appuyée sur la miniaturisation de l'étape d'extraction et l'utilisation de la nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Pour la carbamazépine et la fluoxétine, la limite de détection obtenue est respectivement de 4 ng/g et de 30 ng/g pour une prise initiale d'une dizaine de milligrammes de matrice, c'est-à-dire d'un individu unique. La méthode validée, développée à l'échelle d'un individu permet d'envisager une intégration des données dans une approche métabonomique permettant de caractériser et de paramétrer la diversité des réponses biologiques obtenues.

APPROCHE MÉTABOLOMIQUE EN NUTRITION : DÉVELOPPEMENT D'OUTILS POUR L'IDENTIFICATION DES BIOMARQUEURS

Bernard Lyan[1], Franck Giacomoni [1], **Estelle Pujos-Guillot**[1]

1 - INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Nutrition Humaine, F-63122, Saint Genès Champanelle, France ; Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, F-63000, Clermont-Ferrand, France

Ces dernières années, les approches métabolomiques ont ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la nutrition, notamment parce qu'elles permettent d'aborder les problèmes de biocomplexité en décrivant de façon globale les métabolites générés ou modifiés dans certaines conditions nutritionnelles. Cependant, aujourd'hui, l'identification des métabolites est certainement l'étape limitante de l'utilisation de la spectrométrie de masse en métabolomique. Malgré l'apport incontestable des technologies à très haute résolution, l'identification des biomarqueurs reste complexe, et nécessite le développement de stratégies analytiques et bio-informatiques.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés dans une première étape au développement de méthodes analytiques utilisant différents modes d'acquisitions basés sur le couplage UPLC-LTQ Orbitrap™. Un module d'électrochimie en ligne (ROXY™, Antec) a également été testé pour la génération de métabolites non disponibles. Dans une seconde étape, le développement a concerné des outils bio-informatiques dédiés. Ils concernent en particulier une base de données relationnelle implémentée par des spectres de fragmentation annotés de métabolites, ainsi que des chaînes de traitement *in silico* intégrant différents modules de prédiction et proposant une approche « top-down » dans l'interprétation des données obtenues.

L'apport des méthodologies développées seront illustrées dans le cadre de deux études. L'une sur cohorte (cohorte française SuViMax2, ANR-10-ALIA-007 PhenoMeNEp), vise à identifier des candidats biomarqueurs de consommation de produits végétaux, dans le but de caractériser le statut nutritionnel associé à consommation à long terme de fruits et légumes. L'autre concerne la détermination de biomarqueurs précoces de dysfonctions métaboliques liées à la prise de poids lors d'une étude d'intervention chez l'homme.

O-26

CARACTÉRISATION DE L'IMPRÉGNATION DU FŒTUS AUX PESTICIDES : ANALYSE DU MÉCONIUM ET DES CHEVEUX MATERNELS PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Thierry Berton[1,2], Karen Chardon[2], Véronique Bach[2], Flora Mayhoub[2], Karine Tack[1]

1 - INERIS, Direction des Risques Chroniques, Parc Technologique Alata, Verneuil-en-Halatte
2 - Péritox, UFR de médecine, Université de Picardie Jules Verne, AMIENS

La France est l'un des plus gros consommateurs de pesticides au monde. Ces composés sont désormais présents dans tous les compartiments environnementaux (eau, air, sol) ainsi que dans nos aliments. Si la toxicité de ces composés pour l'homme est aujourd'hui reconnue, il n'existe que très peu de données sur l'exposition et l'imprégnation du fœtus aux pesticides. Ce projet a pour but de caractériser l'exposition du fœtus pendant la grossesse en s'appuyant à la fois sur des analyses chimiques utilisant le méconium comme nouvelle matrice d'exposition ainsi que sur un questionnaire regroupant les habitudes et modes de vie des différentes familles incluses dans cette étude. Ces données d'exposition quantitatives (dosages chimiques) et qualitatives (questionnaire) seront ensuite recoupées avec les données cliniques relevées sur le nourrisson à la naissance afin de mettre en évidence un éventuel impact des pesticides sur le développement fœtal. Une collaboration a donc été établie avec 11 maternités picardes afin de récolter les échantillons biologiques (méconium et cheveux maternels), ainsi que les dossiers des 700 couples mère/enfant participant à cette étude sur l'ensemble de l'année 2011. La méthode analytique développée est basée sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, et cible les principales classes de pesticides utilisées en Picardie (pyréthrinoïdes, organophosphorés, carbamates, phénoxyherbicides, phénylurée) ainsi que leurs métabolites associés. Vingt-et-une substances actives ont ainsi été ciblées en s'appuyant sur les données d'utilisation, la toxicité, les propriétés physico-chimiques (facilité à se retrouver dans l'air ou l'eau), ainsi que sur la législation en vigueur. L'utilisation du méconium qui représente les premières selles du nourrisson permet d'intégrer l'exposition aux différents xénobiotiques dans le temps et est représentatif des six derniers mois de grossesse, contrairement aux autres matrices biologiques comme le sang ou l'urine. Les analyses réalisées sur les échantillons de méconium ont révélé, notamment, la présence fréquente de dialkylphosphates, métabolites issus de la famille des organophosphorés, de métabolites du mancozèbe, ainsi que des concentrations élevées en pyréthrinoïdes chez certains individus, pouvant aller jusqu'à plusieurs µg/mL. L'effet saisonnier a également été observé. Ces données sont les premières données d'occurrence de l'imprégnation du fœtus aux pesticides en France.

A HIGH MASS-RESOLUTION ORBITRAP MASS SPECTROMETER FOR *IN SITU* ANALYSIS IN PLANETARY SCIENCE

Christelle Briois[1], Anthony Lethuillier[1,2], Laurent Thirkell[1], Amirouche Boukrara[1], Jean-Pierre Lebreton[1], Nathalie Carrasco[2], Cyril Szopa[2], Claude Chapuis[2], Roland Thissen[3], Stefano Cornelli[3], Hervé Cottin[4], Noël Grand[4], Cécile Engrand[5], Alexander Makarov[6]

1 - Laboratoire de Physique et Chimie de l'Environnement et de l'Espace (LPC2E), UMR CNRS 7328, 3A Av. de la Recherche Scientifique, 45071, Orléans, France

2 - Laboratoire Atmosphères, Milieux, Observations Spatiales (LATMOS), UMR CNRS 8190, UPMC, UVSQ, 11 Bd d'Alembert 78280 Guyancourt, France

3 - Institut de Planétologie et d'Astrophysique de Grenoble (IPAG), 38000 Grenoble, France

4 - Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques (LISA), UMR CNRS 7583, université Paris Est Créteil et université Paris Diderot, Institut Pierre Simon Laplace, France

5 - CSNSM, Univ. Paris Sud/CNRS, bat. 104, 91405 Orsay, France

6 - Thermo Fisher Scientific, Hanna-Kunath Str 11, 28199 Bremen, Germany

Solar System exploration is dealing more and more with chemically complex matter, potentially associated with astrobiology or prebiotic-related science objectives. It requires the development of new space instruments with improved capability to perform the measurements that address the related science goals. Due to its ability to reveal quantitatively the composition of any chemical material, mass spectrometry has served as an invaluable scientific analytical tool. The best mass resolution currently achieved by mass spectrometers in space is about 3,000 at mass 28 (ROSINA on board ESA's comet chaser Rosetta[1]). As mass-resolving power increases, several new plateaus of chemical information become accessible. Fourier Transform Mass Spectrometry (FT MS) offers (i) the multiple advantages of yielding the entire mass spectrum at once, rather than requiring that each peak be scanned through separately and (ii) in the zero-collision limit, mass-resolving power increases directly with data acquisition period. Purely electrostatic orbital traps in laboratory are showing mass resolution above 100,000 for $m/z \leq 400$, that provides separation for each detected isobaric species[2,3].

Our French consortium of laboratories, in collaboration with ThermoFischer Scientific, is currently working on the adaptation of this type of mass spectrometer for space instrumentation. It would open exciting new opportunities for molecular characterization, isotopic abundance evaluation, and more generally environmental characterization of the atmospheres and surfaces of planetary bodies.

In this presentation, we will describe this innovative concept of mass analyzer for space that is lightweight, uses (pulsed) DC voltages, and provides ultra-high mass-resolving power capabilities. Sample preparation, ionization and ion injection is specific for each envisaged space application. Our laboratory prototype uses a UV (337 nm) laser beam for the ablation and ionization of metal and organic samples. A mass resolution of 250,000 at mass 56 has been recently achieved on stainless steel samples. Measurements of the isotopic pattern have been tested with Zirconium doped with Molybdenum samples. The results obtained so far are demonstrating that this instrument has the capability to uniquely address science objectives related to *in situ* composition measurements, in particular those related to astrobiology, for future planetary missions to airless surfaces bodies as asteroid, comets or to planetary moons.

---

[1] Balsiger, H.; Altwegg, K.; Bochsler, P.; Eberhardt, P.; Fischer, J.; Graf, S.; Jäckel, A.; Kopp, E.; Langer, U.; Mildner, M.; Müller, J.; Riesen, T.; Rubin, M.; Scherer, S.; Wurz, P.; Wüthrich, S.; Arijs, E.; Delanoye, S.; de Keyser, J.; Neefs, E.; Nevejans, D.; Rème, H.; Aoustin, C.; Mazelle, C.; Médale, J.-L.; Sauvaud, J. A.; Berthelier, J.-J.; Bertaux, J.-L.; Duvet, L.; Illiano, J.-M.; Fuselier, S. A.; Ghielmetti, A. G.; Magoncelli, T.; Shelley, E. G.; Korth, A.; Heerlein, K.; Lauche, H.; Livi, S.; Loose, A.; Mall, U.; Wilken, B.; Gliem, F.; Fiethe, B.; Gombosi, T. I.; Block, B.; Carignan, G. R.; Fisk, L. A.; Waite, J. H.; Young, D. T.; Wollnik, H. Space Science Reviews, 2007, 128 (1-4), 745.

[2] Makarov, A., "Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis", Anal. Chem., 2000, 72, 1156.

[3] Hu, Q. et al. "The Orbitrap: a new mass spectrometer", J. Mass Spectrom., 2005, 40, 430.

O-28

LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE À TRÈS HAUTE RÉSOLUTION : UN OUTIL DE CARACTÉRISATION DES BIO-HUILES ISSUES DE LA PYROLYSE DE LA BIOMASSE

Vincent Carré[1], Anthony Dufour[2], Nicolas Doassans[2], Frédéric Aubriet[1]

1 - Laboratoire de Chimie et Physique des Milieux Complexes, Institut Jean Barriol – FR 2843, Université de Lorraine , Metz, France
2 - Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Équipe GREENER, UPR CNRS 3349, Nancy, France

La biomasse ligno-cellulosique (bois, déchets agricoles, *etc.*) représente une ressource d'énergie renouvelable et de chimie verte en France et dans le monde. La pyrolyse est une des réactions clefs dans les procédés de valorisation thermochimique de la biomasse[1]. Les produits formés par la pyrolyse étant très nombreux et parfois très réactifs, leur connaissance est nécessaire pour une optimisation de leur potentiel énergétique et réduire la formation de polluants. Par conséquent, nous avons évalué la capacité de la spectrométrie de masse à très haute résolution à obtenir une « image » de la composition d'une bio-huile permettant de la comparer à celles provenant de différentes conditions opératoires.

La pyrolyse rapide du bois est réalisée dans un réacteur cyclone pilote à une température de paroi donnée[2]. Les fractions bio-huiles sont recueillies à la sortie du réacteur puis analysées en infusion directe par électrospray couplé à un spectromètre de masse par résonance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier (ESI-FTICRMS 9,4 T).

Le spectre de masse FTICR d'une bio-huile présente plus de 800 pics de masse avec une résolution en masse moyenne de 400 000. Sur une plage de 200-600 *m/z*, plusieurs centaines de composés de type $C_xH_yN_{0-1}O_z$ ont été identifiés soit sous la forme d'ions moléculaires déprotonés en mode d'analyse négatif, soit sous la forme d'ions moléculaires protonés et/ou cationisés en mode d'analyse positif avec une précision en masse moyenne de 350 ppb. Ces composés peuvent être regroupés par classes en fonction du nombre d'hétéroatomes et d'insaturations afin de mener des comparaisons entre échantillons. La majorité des espèces détectées correspondent à des composés oxygénés dont les rapports H/C et O/C sont proches de ceux de la lignine. Le positionnement de ces rapports sur un diagramme de Van Krevelen permet de représenter une signature chimique spécifique d'une bio-huile. Ainsi, deux bio-huiles ont été comparées en fonction de la température de paroi du réacteur : 650°C et 780°C. L'analyse ESI-FTICRMS de ces deux bio-huiles a permis de montrer que ce paramètre de pyrolyse influence la distribution en composants oxygénés en favorisant à haute température la formation de composés présentant des insaturations similaires mais une teneur en oxygène plus faible.

[1] *Bridgwater, A.V.; Biomass and bioenergy 2012, 38, 68-94.*
[2] *Lédée, J.; Broust , F.; Ndiaye, F.T.; Ferrer, M.; Fuel 2007, 86, 1800–1810.*

TARGETED PROFILING OF INFLAMMATION RELATED LIPID MEDIATORS IN BIOFLUIDS BY ULTRA-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TRIPLE QUADRUPOLE MASS SPECTROMETRY

Mathieu Gaudin[1], Kirill A. Veselkov[1], Perrine Masson[2], Claire Boursier-Neyret[2], Bernard Walther[2], Elaine Holmes[1], Jeremy K. Nicholson[1]

1 - Biomolecular Medicine, Department of Surgery and Cancer, Faculty of Medicine, Imperial College London, SW7 2AZ London, United Kingdom
2 - Technologie Servier, 27 rue Eugène Vignat, 45000 Orléans, France

It is increasingly recognized that dysregulated inflammatory response contributes to the pathogenesis of a diverse range of clinical disorders including obesity, atherosclerosis, type 2 diabetes and Parkinson's disease. The existing molecular assays for profiling inflammatory cascade have thus far largely relied on measurement of cytokine or chemokine levels.

The recent findings indicate the important regulatory role of lipid mediators during inflammatory processes. For example, fatty acids derived metabolites such as eicosanoids and endocannabinoids have been shown to exhibit potent pro-inflammatory and pro-resolving properties[1].

Metabonomics is now a well-established systems biology approach that brought insights – without *a priori* - on the phenotype of a population at a molecular level mainly using untargeted profiling of metabolites based on nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)[2] or high resolution mass spectrometry (HRMS)[3]. If this approach is supposed to be as comprehensive as possible, due to sensitivity and identification issues, trace level bioactive mediators are difficult to monitor without a targeted method, including dedicated sample preparation and analytical procedures.

Here, we present an analytical strategy for improved profiling of a wide range of inflammation related metabolic mediators using Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) analysis of biofluids. Analyte concentration and sample clean-up is performed by solid phase extraction using mixed mode anion exchanger to achieve selective enrichment of the analytes. Qualitative and quantitative data are obtained by UPLC-MS/MS with a last generation triple quadrupole mass spectrometer.

The proposed method has been validated for accuracy, precision, linearity, limits of detection and quantitation in order to be applied to large-scale metabolic profiling studies and *in vivo* experiments on animal models.

[1] *Serhan, C.N.; Chaing, N.; Van Dyke, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nat. Rev. Immunol. 2008, 8, 349-361.*
[2] *Beckonert, O.; Keun, H.C.; Ebbels, T.M.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for nmR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. Nat. Protoc. 2007, 5, 2692-2703.*
[3] *Want, E.J.; Wilson, I.D.; Gika, H.; Theodoridis, G.; Plumb, R.S.; Shockcor, J.; Holmes, E.; Nicholson, J.K. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. Nat. Protoc. 2010, 5, 1005-1018.*

O-30

DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES : STRATÉGIE ET CARACTÉRISATION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES DANS LES RÉSIDUS DE POMMES

Laëtitia Fougère[1], Émilie Destandau[1], Cristina Gabriela Grigoras[1], Éric Lesellier[1], Claire Elfakir[1]

1 - Institut de chimie Organique et Analytique, UMR 7311 rue de Chartres F-45067 Orléans

La transformation agro-alimentaire des pommes entraîne l'obtention de résidus non-exploités représentant environ 30% du fruit. Les familles de molécules présentent dans la pomme sont bien connues mais ce sont principalement les flavonols et leur propriété anti-oxydante qui sont étudiés et exploités. La famille des terpénoïdes est en revanche peu étudiée.

Notre objectif est de caractériser dans ces résidus les molécules bioactives potentiellement valorisables dans des secteurs cosmétique, pharmaceutique ou nutraceutique. De par la complexité des extraits, et la présence de molécules isobares, une méthode séparative s'avère indispensable avant une identification des constituants de chaque famille par spectrométrie de masse (API 3000 triple quadripôle, AB Sciex) en mode d'ionisation ESI ou APCI. Le mode d'ionisation par électrospray (ESI) est le plus adapté pour la classe des polyphénols et l'APCI pour celle des triterpènes.

Une méthode générique en chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été développée en couplage SM-ESI. Celle-ci a permis en une seule analyse de caractériser une trentaine de molécules d'un même extrait, dont une dizaine d'acides phénoliques et de flavonols, puis des terpènes avec des groupements coumaryles et des acides triterpéniques. Les molécules ont été identifiées en accord avec la littérature, grâce à leur pic moléculaire et leur fragmentation en source. Les spectres de masse des flavonoïdes obtenus sont souvent très riches car on observe de multiples fragments dus aux pertes de sucres et à la fragmentation de la génine par des réactions de rétro-Diels-Alder (RDA). Pour les composés triterpéniques, il a été spécifiquement montré qu'en mode d'ionisation positif on observe des pertes de neutres et un clivage de type RDA. Le couplage de cette méthode HPLC avec la spectrométrie de masse haute résolution (maXis, Bruker) confirme les hypothèses d'identification émises. Pour la caractérisation des acides triterpéniques l'HPLC s'étant avérée peu résolutive et l'ESI peu sensible une méthode spécifique par chromatographie en phase supercritique (SFC) a été mise au point afin de collecter les composés minoritaires qui ont été identifiés par SM-APCI.

La complémentarité des différentes méthodes séparatives couplées aux différentes sources de la spectrométrie de masse est nécessaire pour caractériser finement la composition d'un extrait végétal complexe.

BIODIVERSITY OF HIGHLY-GLYCOSYLATED PLANT PHOSPHOSPHINGOLIPIDS: FAST SCREENING AND STRUCTURE DETERMINATION BY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Corinne Buré[1], Jean-Luc Cacas[2], Sébastien Mongrand[2], Jean-Marie Schmitter[1]

1 - CNRS/CBMN, University of Bordeaux, France
2 - CNRS/LBM, University of Bordeaux, France

Glycosyl-Inositol-Phospho-Ceramides (GIPCs) are the main sphingolipids of plant tissues, but the function of this complex family of compounds remains largely unknown. Therefore, the structural characterization of GIPC represents a critical step toward the understanding of their physiological functions and their role in membrane organization. In this work, GIPCs have been purified from a wide variety of plants tissues or algae (23 species from various phylogenetic groups), yielding multiple molecular species that have been analyzed by tandem mass spectrometry, using a combination of MALDI- and ESI-MS/MS.

GIPCs were purified and extracted according to the method described by Buré *et al.*[1]. Once released from GIPCs, the quantitative distribution of fatty acid chains and long chain bases was analyzed by GC/MS[2]. GIPC extracts were analyzed by MALDI–MS (Ultraflex III, Bruker) in negative ion mode, using 2,6-dihydroxy-acetophenone (DHA) as a matrix. ESI-MS/MS analyses were performed with a 5500 QTRAP (AB Sciex) instrument.

Analyses performed by MALDI mass spectrometry provide a quick overview of the variety of GIPC structures found in a given type of plant tissue. MALDI-MS revealed that plant GIPC structures had an increasing number of saccharide units, from two (series A) to six (series E).

The 23 extracts obtained from plants belonging to various phylogenetic groups were analyzed first by MALDI-MS to attribute the different species to their corresponding series. ESI-MS/MS was carried out on these extracts to confirm or to elucidate some structures. Indeed, in algae, atypical GIPCs with several hexuronic acids were characterized by tandem mass spectrometry. In some other species, it appeared that inositol could be linked to one or two saccharides. The GIPC composition was revealed to be quite complex and different when analyzing extracts coming from primitive (algae) to more complex plants (dicot). We analyzed plant model organisms largely used by the scientific community like *Arabidopsis thaliana*, a model for reverse/forward genetic, or *Physcomitrella patens*, a moss used as a model organism for studies on plant evolution, development and physiology, but a real consensus for GIPC composition was not found. Thus, the analysis of the 23 extracts from primitive to more complex plants revealed a great diversity of GIPC structures in the plant kingdom, which is highly stimulating for further research in the plant sphingolipid field.

[1] *C. Buré, J.L. Cacas, F. Wang, K. Gaudin, F. Domergue, S. Mongrand, J.M. Schmitter. Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011, 25, 3131.*
[2] *J.L. Cacas, S. Melser, F. Domergue, J. Joubès, B. Bourdenx, J.M. Schmitter, S. Mongrand. Rapid nanoscale quantitative analysis of plant sphingolipid long chain bases by GC-MS. Anal. Bioanal. Chem, 2012, in press.*

O-32

LA MESURE DU BDE-209 À L'ÉTAT D'ULTRA-TRACE DANS LES MATRICES BIOLOGIQUES : CHALLENGE ANALYTIQUE ET NOUVELLES STRATÉGIES ENVISAGEABLES

Emmanuelle Bichon[1], Fabrice Monteau[1], Anaïs Vénisseau[1], Philippe Marchand[1], Ronan Cariou[1], Jean-Philippe Antignac[1], Bruno Le Bizec[1]

1 - LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France

Les Polybromodiphenylethers (PBDEs) une des principales familles de retardateurs de flamme bromés. Ces composés ont été largement utilisés sur les produits électriques et électroniques, les textiles ou encore dans les mousses d'extincteurs. La réglementation européenne a interdit la production et l'utilisation de certains mélanges comme les penta et octa-BDE et l'Europe élimine progressivement le déca-BDE. En effet, des études de toxicité ont démontré des effets néfastes de ces composés lipophiles sur l'animal. Afin de mieux appréhender l'occurrence de ces composés dans l'environnement, l'alimentation, et chez l'Homme, des méthodes d'analyse ont été développées, reposant le plus souvent sur une mesure par couplage GC-HRMS pour pouvoir quantifier les PBDE jusqu'à des concentrations de l'ordre du pg/g de matière grasse. Le déca-BDE présente néanmoins une relative instabilité avec ses 10 atomes de brome. Sa masse moléculaire élevée rend de plus difficile son analyse en HRMS dans le cadre d'une méthode multirésidus (*i.e.* ciblant les composés tri- à déca-BDE). Dans ce contexte, une technique d'analyse alternative a été développée, avec comme objectif d'atteindre une sensibilité équivalente à celle obtenue sur les autres PBDE (inférieure au pg injecté). Deux instruments ont alors été testés, tout d'abord le système APGC-XevoTQS (Waters) puis le système GC-MS/MS 7000 (Agilent). La première idée était d'apporter une énergie d'ionisation douce à pression atmosphérique grâce au système APCI. En condition anhydre, l'ion moléculaire *m/z* 959 est apparu formé majoritairement, ce qui a permis d'optimiser une méthode d'acquisition dans le mode SRM hautement spécifique sur l'instrument de type GC-APCI-MS/MS. Néanmoins, le gradient de température décroissant dans l'interface à pression atmosphérique est apparu fortement affecter la qualité du pic chromatographique et nous a forcé à abandonner cette technique. L'ionisation par impact électronique a alors été envisagée, sur un système GC-MS/MS Agilent 7000. C'est en optimisant l'ionisation de l'ion dichargé $[M\text{-}Br_2]^{2+}$ puis en jouant sur la résolution des quadripôles en SRM que nous avons pu obtenir des résultats probants. Enfin, en utilisant un système chromatographique couplant un insert inerte et une colonne capillaire de type Rtx-1614 (10 m x 0,25 mm, 0,1 µm), la mesure du déca-BDE à un seuil inférieur à 1 pg injecté a été atteinte. Nous avons de plus confirmé que la qualité d'introduction de l'analyte dans la source d'ionisation est une condition nécessaire à la bonne réalisation de l'analyse par spectrométrie de masse, particulièrement pour ce composé difficile au plan analytique.

STRATÉGIE COUPLANT SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET ESSAIS BIOLOGIQUES POUR ÉVALUER LE DANGER ASSOCIÉ À LA PRÉSENCE DE POLLUANTS ÉMERGEANTS : LE CAS DE L'ESTRONE

Yasmine Souissi[1], Stéphane Bouchonnet[1], Sophie Bourcier[1], Christophe Genty[1], Michel Sablier[1], Selim Aït-Aïssa[2]

1 - École Polytechnique, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, CNRS, Palaiseau, France
2 - INERIS Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques Unité, Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo Parc ALATA - BP2 60550 Verneuil en Halatte France

Des études récentes rapportent la présence accrue dans l'environnement de substances connues pour leur activité en tant que perturbateurs endocriniens[1]. Ces composés nouvellement identifiés sont susceptibles d'être formés au cours des procédés de traitement des eaux ou au cours des dégradations naturelles dans l'environnement aquatique. Qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropogénique, ces composés et leurs produits de dégradation peuvent se retrouver en quantité non négligeable dans l'environnement et porter atteinte à l'écosystème aquatique, à ses occupants ainsi qu'à ses destinataires (eaux de consommation, irrigation). Leur nocivité suspectée nous a amené à nous y intéresser ainsi qu'à leurs produits de dégradation.

Nous avons choisi de modéliser la dégradation de l'estrone comme représentant de la famille des œstrogènes ciblés comme polluants majeurs du milieu aquatique[2]. Nous avons choisi la photolyse comme procédé de dégradation en raison de son utilisation croissante en alternative à la chlorination qui s'est avéré problématique pour la formation de sous-produits toxiques.

En vue de l'identification des produits de photolyse, nous avons adopté deux techniques d'analyse complémentaires : la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-ITMS) pour la détection des composés de dégradation peu polaires et apolaires et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-QTOF) pour la détection des produits de dégradation polaires. La stratégie d'élucidation structurale des produits de dégradation, basée sur l'établissement puis la comparaison des mécanismes de fragmentation des molécules mères natives ou marquées au deutérium s'est avérée très efficace. La spectrométrie de masse démontre sa pertinence pour identifier sans équivoque les structures des composés de dégradation.

Pour évaluer l'activité biologique de ces produits de dégradation, nous avons utilisé une batterie de tests *in vivo*[3] et *in silico*. Ces essais ont démontré la capacité de plusieurs des photoproduits identifiés à se lier à activer le récepteur des œstrogènes.

L'ensemble de ces résultats sera utilisé pour évaluer le danger présenté par la formation de ces produits de dégradation de l'estrone. Nous tenterons ensuite de tirer une conclusion sur la pertinence de la stratégie adoptée pour l'évaluation des risques associés.

---

[1] Fontenele, E.G.P., et al., Environmental contaminants and endocrine disruptors. Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia, 2010. 54(1): p. 6-16.
[2] Souissi, Y., et al., Estrone direct photolysis: By-product identification using LC-Q-TOF. Chemosphere, 2012. 87(2): p. 185-193.
[3] Louiz, I., et al., Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). Science of the Total Environment, 2008. 402(2-3): p. 318-329.

APPORTS DE LA SPECTROMÉTRIE À HAUTE RÉSOLUTION POUR L'IDENTIFICATION DES COMPOSANTS DE L'EXOPROTÉOME DE BACTÉRIES MARINES

Emie Durighello[1], Joseph Christie-Oleza[1], Jean Armengaud[1]

1 - Laboratoire de Biochimie des Systèmes Perturbés, SBTN, iBEB, DSV, CEA Marcoule BP17171, 30207 Bagnols sur Cèze cedex

Les bactéries du genre *Roseobacter* sont abondantes à la surface des écosystèmes marins, représentant 10% des cellules bactériennes des océans et 20% des organismes vivant dans les eaux littorales. Dans le but de mieux comprendre comment ces bactéries marines interagissent avec leur environnement, nous avons analysé l'exoprotéome de *Phaeobacter gallaeciensis* BS107. L'exoprotéome comprends l'ensemble des protéines sécrétées et actives dans le monde extérieur ainsi que les constituants de cellules lysées. Nous avons cultivé la bactérie modèle dans du milieu marin, collecté l'exoprotéome et répertorié son contenu par une approche protéomique shotgun nanoLC-MS/MS. Le composant majeur de cet exoprotéome est une protéine de 55 kDa qui représente 60% du contenu protéique total tel qu'estimé par une approche quantitative sans marquage. Curieusement, cette protéine s'est révélée être récalcitrante à une analyse protéomique classique. Pour son identification, nous avons adopté une stratégie de séquençage *de novo* à l'aide de spectres acquis en spectrométrie de masse en tandem avec une haute résolution. Cette protéine abondante se révèle être une toxine de type RTX (Christie-Oleza *et al.* 2012)[1], la protéine ZP_02147451. Cette protéine contient un domaine similaire à la peptidase M10 serralysine C-terminale. Nous avons décelé un nombre inhabituellement faible de résidus basiques dans cette protéine, une particularité conservée chez les toxines de type RTX chez cette souche (Durighello *et al.* 2012)[2]. Ceci expliquerait sa récalcitrance à une protéolyse trypsique et permettrait à ces protéines d'augmenter leur durée de vie dans un environnement non-cellulaire. À partir de ces résultats, nous proposons d'analyser systématiquement les exoprotéomes des bactéries environnementales avec des stratégies incluant des protéolyses avec plusieurs protéases et des requêtes avec semi-spécificité. Cette étude a permis de mettre en évidence des traits spécifiques des constituants de l'exoprotéome des bactéries marines.

Mots-clés : Exoprotéome, RTX toxine, Récalcitrance proteolytique, Séquençage *de novo*, Spectrométrie tandem à haute résolution.

[1] *Christie-Oleza et al. (2012) Mol Cell Proteomics, 11(2):M111.013110.*
[2] *Durighello et al. (2012) Mar Drugs (soumis).*

MASS SPECTROMETRY OF A TRANSMEMBRANE PUMP REVEALS ITS SPECIFIC DRUG AND LIPID BINDING PROPERTIES

Julien Marcoux[1], Sheila Wang[1], Argyris Politis[1], Nina Morgner[1], Carol Robinson[1]

1 - Department of Chemistry, University of Oxford

Introduction

Multidrug resistance is a serious barrier to successful treatment of many human cancers. P-glycoprotein is over-expressed in cancer tissues, which then export the chemotherapeutic agents and profoundly affect drug therapies. Understanding these molecular mechanisms is therefore of paramount importance. While structures of inward facing conformations have been solved[1], the drug binding mechanism is still poorly understood. Furthermore P-gp, is known to bind lipids with a broad specificity[2]. However, the role of lipid binding and the competition between lipid and drug binding is poorly understood. We show here that it is possible to observe both lipid and drug binding to P-gp using electrospray MS of the protein complex from detergent micelle. We propose structural models based on these MS results.

Results

Drug binding:

Following incubation of P-gp with cyclosporine A (CsA), up to three additional charge state series were observed, corresponding to binding of up to three CsA adducts. The binding of more than one molecule of CsA per transporter is not surprising, given the existence of up to four different binding sites within the binding pocket.

ATP/ATPγS binding and concomitant binding:

Whether or not P-gp can bind concomitantly two molecules of ATP is still subject to great debate. Our data confirms that P-gp can bind two ATP/ATPγS at the same time. The concomitant binding of lipids and ATP, CsA and ATP and CsA and cardiolipin is clearly visible using this technique.

Lipid binding:

Upon addition of 7 different phospholipids to P-gp, we could observe the sequential binding of up to 8 molecules of lipid per transporter. We also investigated the binding of cardiolipins of different size. The time scale observed for the binding of lipids to P-gp is in good accordance with previous fluorescence quenching experiments. Further analysis of the data enabled us to get Kd for each one of these lipids and each one of the binding sites. We could relate the specificity of binding to the net charge and the molecular volume of the lipids.

Modeling:

Using a shape based approached we docked the drugs/lipids onto the structure of P-gp available and minimized the energy with Firedock. Our data confirms the fact that P-gp can bind up to 3 CsA or 2 cardiolipins in the binding pockets. Molecular dynamics simulations are under progress.

Novel aspect

First study of drug and lipid binding to a membrane complex introduced into the gas phase in a detergent micelle.

---

[1] *Aller, S. G. et al. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. Science 323, 1718-1722, doi:10.1126/science.1168750 (2009).*

[2] *Van Helvoort, A. et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. Cell 87, 507-517, doi:S0092-8674(00)81370-7 [pii] (1996).*

O-36

INVESTIGATING A LARGE HUMAN PROTEIN ASSEMBLY BY NATIVE MASS SPECTROMETRY: THE SAGA COMPLEX

Elisabetta Boeri Erba[1], Simon Trowitzsch[2], Luca Signor[1], Christophe Masselon[3], Renato Zenobi[4], Imre Berger[2]

1 - Institute of Structural Biology "J.P. Ebel", Native mass spectrometry team, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France
2 - EMBL Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz BP 181, 38042 Grenoble Cedex 9, France
3 - iRTSV/BGE/EDyP. CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France
4 - Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zurich, HCI E 329, CH-8093 Zurich, Switzerland

Introduction

In recent years native MS has emerged as a remarkable tool for investigating non-covalent protein complexes. By native MS the mass of intact protein assemblies, their stoichiometry, interactions between subunits, the position of subunits within subcomplexes (core and peripheral subunits) and the pathway of assembly can be determined[1]. Native MS can be coupled with ion mobility (IM-MS), whereby the topology and shape of complexes and subcomplexes can also be studied. Overall, native MS and IM-MS are gaining more relevance as methods for studying the structure of protein complexes[2].

Spt–Ada–Gcn5–acetyltransferase (SAGA) is a protein assembly formed by 18 distinct subunits, whose total mass is of 1284.1 kDa[3]. It acetylates and deubiquitinates histone residues, thereby introducing modifications that are essential for a regulated gene expression. The SAGA complex plays crucial roles not only in the control of histone function, but also in transcriptional activation, transcriptional elongation, and mRNA export. Despite the importance of this multifunctional nanomachine, its structure and function are only poorly understood. Using native MS, IM-MS, and analytical ultracentrifugation we investigate the human SAGA complex to obtain a complete two-dimensional map of its inter-subunit interactions. We also aim to determine the shape and topology of human SAGA subcomplexes in solution and in the gas phase.

Preliminary data

We started our investigation of human SAGA complex by analyzing its histone acetyl transferase (HAT) submodule. This is a tetrameric subcomplex composed of the proteins GCN5 (93.9 kDa), ADA2b (48.5 kDa), ADA3 (48.9 kDa) and SGF29 (33.2 kDa). It was expressed in insect cells[4], purified by affinity and gel filtration chromatography and analyzed by native MS. Signals with masses corresponding to the intact tetramer (224.5 kDa), the ADA2b/ADA3/SGF29 trimer (130.6 kDa), the GCN5/ADA2b dimer (142.3 kDa) and the ADA3/SGF29 dimer (81.7 kDa) were detected. These findings confirmed not only the stoichiometry but also the interaction network. For instance, the data indicate that GCN5 interacts with ADA2b, and rule out a significant interaction with SGF29. To further verify the position of ADA2b and ADA3 which are isobaric, we carried out experiments using a truncated form of ADA3 (39.3 kDa). This preliminary study demonstrates that the analysis of SAGA subcomplexes by native MS is both feasible and highly informative.

[1] *M. Sharon, How far can we go with structural mass spectrometry of protein complexes? J Am Soc Mass Spectrom, 2010, 21, 487-500.*
[2] *Boeri Erba E, Ruotolo B, Barsky D, Robinson C V. Ion Mobility-Mass Spectrometry Reveals the Influence of Subunit Packing and Charge on the Dissociation of Multi-protein Complexes. Anal Chem. 2010; 82(23):9702-10.*
[3] *Rodríguez-Navarro S. Insights into SAGA function during gene expression. EMBO Rep. 2009 Aug;10(8):843-50.*
[4] *Trowitzsch S, Bieniossek C, Nie Y, Garzoni F, Berger I.New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. J Struct Biol. 2010 Oct;172(1):45-54.*

OPTIMIZATION OF A CROSSLINKING AND MASS SPECTROMETRY WORKFLOW (MALDI-TOF/TOF, ESI-MS/MS) FOR THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE (R/W)9 CELL PENETRATING PEPTIDE INTERACTION PARTNERS

Séverine Clavier[1,2], Sandrine Sagan[1], Rodrigue Marquant[1], Xiuxia Du[3], Gérard Chassaing[1], Gérard Bolbach[1,2], Emmanuelle Sachon[1,2]

1 - Université P. et M. Curie Paris 6, UMR 7203 CNRS-UPMC-ENS , 4, place Jussieu, 75005 Paris, École Normale Supérieure, Département de Chimie, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France

2 - Plateforme de Spectrométrie de Masse et Protéomique, Université P. et M. Curie, IFR 83, 7-9 Quai St Bernard, 75005 Paris, France

3 - Department of Bioinformatics and Genomics, University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, North Carolina 28023, United States

We aim at studying the intracellular partners of a Cell-Penetrating Peptide (R/W)9 RRWWRRWRR using Chemical Crosslinking and Mass Spectrometry. It was found that this amphipathic and polycationic peptide has an actin-remodeling activity in malignant fibroblasts leading to a reversion of the tumoral phenotype[1]. Identifying the interacting partners of this peptide could allow a better understanding of its mode of action.

However before performing *in vivo* chemical crosslinking and especially before being able to interpret the mass spectrometry data for these complex systems, we needed to set up, evaluate and optimize a Crosslinking/Mass Spectrometry/Data analysis workflow based on *in vitro* experiments. The influence of several parameters was tested : nature of the crosslinker reactive group, arm length, concentrations and *ratio* between the two interacting biomolecules.

The first model system used was the Glutathione-S-Transferase protein that is well known for its ability to form homodimers. Then we studied a peptide/protein interaction between (R/W)9 and bovine serum albumin or actin. This basic peptide was expected to electrostatically interact with these proteins with an acidic pI and known to have a submicromolar affinity with actin (ITC measurements).

For the crosslinking reactions we tested four different crosslinkers with a reactivity towards K or C residues (SBAT, GBAT, BS3 and EMCA), different concentrations and peptide: protein ratios (1:1 10 µM:10 µM, 10:1 40 µM:4 µM, 1:10 4 µM:40 µM). In order to selectively enrich the crosslinked species involving the CPP, we used (R/W)9 labeled with a biotin tag (Biot(O2)G4KRRWWRRWRR or Biot(O2)G4CRRWWRRWRR) and performed affinity purification on streptavidin beads. We used both a MALDI-TOF/TOF and a NanoLC-LTQ-Orbitrap systems for the identification and characterization of the interaction sites. In collaboration with the Department of Bioinformatics and Genomics of North Carolina (Dr. X. Du *et al.*) we are currently working to adapt the Xlink-Identifier software[2] for the determination of the biotinylated CPP (R/W)9 interacting partners in a complex mixture such as a cell lysate. In parallel we started the study of (R/W)9-protein interactions by photocrosslinking using a photoactivable version of the CPP.

Thus we wished to evaluate the relevance of crosslinking techniques for interaction networks studies and to develop a robust workflow for the understanding of CPPs intracellular action mechanisms.

[1] *Delaroche, D. Cell penetrating Peptides with Intracellular Actin-Remodeling Activity in Malignant Fibroblasts. J. Biol. Chem. 2010, pp. 7712-7721.*

[2] *Du, X. Xlink-Identifier : An Automated Data Analysis Platform for Confident Identifications of Chemically Cross-linked Peptides Using Tandem Mass Spectrometry. J. Proteome Res. 2011, pp. 923-931.*

O-38

IMAGERIE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE (MALDI-TOF/TOF) D'UN COMPOSÉ POTENTIELLEMENT NEUROPROTECTEUR DANS UN MODÈLE DE LA MALADIE DE PARKINSON

Hanane Kadar[1], Gael Le Douaron[2,3], Majid Amar[3], Bruno Figadère[2], Laurent Ferrié[2], Rita Raisman-Vozari[3], David Touboul[1], Alain Brunelle[1]

1 - Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 1 Avenue de la terrasse, 91198, Gif-Sur-Yvette, France
2 - UMR-8076 (BioCIS) Laboratoire de Pharmacognosie, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France
3 - INSERM UMR-S 975, UPMC, CRICM, Experimental Therapeutics of Neurodegeneration, 75013 Paris, France

Les patients affectés par la maladie de Parkinson souffrent de différents symptômes moteurs tels que la lenteur de mouvement ou le tremblement au repos. Bien que l'étiologie de la maladie soit encore peu connue, la disparition des neurones dopaminergiques dans la substance noire (*substancia nigra pars compacta* : SNpc) est l'une des principales caractéristiques de cette maladie. Des traitements corrigeant la chute du taux de dopamine permettent uniquement de réduire les symptômes de la maladie, sans pour autant arrêter le processus de neurodégénérescence. La limite de ces traitements a conduit à la recherche de nouvelles thérapies ayant un effet neuroprotecteur et neuritogénique. C'est dans ce cadre, qu'un nouveau composé (SF41) a été synthétisé et dont la propriété neuroprotectrice a été démontrée *in vitro*. L'effet *in vivo* a ensuite été étudié notamment en vérifiant le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) à l'aide de l'imagerie par spectrométrie par MALDI-TOF/TOF (AB-Sciex 4800 and 5800). Cette technique possède l'avantage de pouvoir déterminer la localisation précise du médicament dans le cerveau après le passage de la BHE. Elle permet de localiser simultanément une large gamme de composés en une acquisition unique et plus particulièrement les lipides. Un spray homogène de matrice a été déposé sur les coupes de cerveau de souris à l'aide d'un robot TM-Sprayer. Les matrices utilisées sont la 9-aminoacridine pour le mode négatif et l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique pour le mode positif. Les images de 5 coupes de cerveau à différentes profondeurs ont ensuite été acquises. Les résultats ont montré que le SF41 passe bien la BHE. Les images issues de l'immunohistochimie TH+ de coupes adjacentes ont été superposées aux images ioniques, permettant une localisation précise du composé et démontrant ainsi sa présence dans des zones touchées dans la maladie de Parkinson, à savoir le striatum et la SNpc. Le composé atteignant les cibles touchées dans cette maladie pourrait donc avoir un effet neuroprotecteur sur la perte des neurones dopaminergiques. Dans un second temps, les compositions lipidiques des cerveaux d'une souris contrôle et d'une souris lésée au MPTP ont été comparées à l'aide d'images acquises en modes positif et négatif afin de rechercher des biomarqueurs potentiels. La procédure a consisté à comparer des spectres extraits des régions d'intérêt et une étude statistique plus approfondie a été réalisée avec le logiciel EasyMSI.

NEW STRATEGIES FOR PROTEINS IDENTIFICATION FROM TISSUE SECTIONS

Julien Franck[1], Jusal Quanico[1], Maxence Wisztorski[1], Morgane Lippens[1], Michel Salzet[1], Isabelle Fournier[1]

1 - Université Lille Nord de France - Université Lille 1, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée, EA 4550, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

MALDI Mass Spectrometry Imaging (MALDI MSI) has shown important potential to study the spatial distribution of endogenous and exogenous compounds including, drugs, metabolites, lipids, peptides and proteins from both vegetal and animal models.

Since several years few groups have given many efforts to develop strategies for on tissue identification of proteins including bottom-up or top-down approaches. Recently it was shown that intact proteins could be extracted from a tissue section *prior* to their identification by nanoLC-MS/MS[1,2]. However in one hand, only the most abundant proteins are identified and in another, interesting proteins could be diluted among the complexity of the extract which contains a large amount of abundant proteins. Therefore, the extraction of biomolecules from tissue sections while maintaining their localization is of utmost importance.

Here are presented news strategies involving the extraction of proteins from specific localization of tissue sections, allowing their identification using *in gel* or *off gel* proteomics approaches. The first strategy consists of digesting proteins directly on a tissue section after the microspotting of trypsin in order to cover a specific region of interest (ROI) of around 600 µm. Resulting peptides are then extracted by liquid microjunction and then analyzed by nanoLC-MS/MS leading to the identification of approximately 1500 proteins from specific locations of a rat brain tissue section[3].

The second strategy is based on the mounting of tissue section on a glass slide covered by parafilm. By a simple excision, a region of interest can be extracted and placed on a tube, allowing the solubilization of intact proteins or their enzymatic digestion. Both *in gel* or *off gel* proteomic approaches can be considered and the first shotgun experiment performed from three different ROIs of a rat brain tissue section has allowed the identification of approximately 3000 proteins. The *in gel* proteomic approach was also investigated and the first results obtained from SDS-PAGE showed intense bands that can be subjected to enzymatic digestion.

[1] *Schober, Y.; Schramm, T.; Spengler, B.; Rompp, A. Rapid Commun Mass Spectrom 2011, 25, 2475-2483.*

[2] *Elsner, M.; Rauser, S.; Maier, S.; Schone, C.; Balluff, B.; Meding, S.; Jung, G.; Nipp, M.; Sarioglu, H.; Maccarrone, G.; Aichler, M.; Feuchtinger, A.; Langer, R.; Jutting, U.; Feith, M.; Kuster, B.; Ueffing, M.; Zitzelsberger, H.; Hofler, H.; Walch, A. J Proteomics 2012.*

[3] *Quanico J., Franck J., Dauly C., Strupat K., Dupuy J., Day R., Salzet M., Fournier I., Wisztorski M. ; From MALDI-MSI to proteome mapping: a new strategy for proteins identification from tissues.; Mol Cell Proteomics.2012 (soumis).*

ASSESSING THE RELEVANCE OF SURFACE SAMPLING BASED ON LIQUID EXTRACTION COUPLED TO DIFFERENTIAL ION MOBILITY FOR QUANTITATIVE MASS SPECTROMETRY IMAGING

Tiffany Porta[1], Emmanuel Varesio[1], Gérard Hopfgartner[1]

1 - University of Geneva, University of Lausanne, School of Pharmaceutical Sciences, Life Sciences Mass Spectrometry, Geneva, Switzerland

Over the last decade, mass spectrometry imaging has become a popular technique to study the distribution of molecules on the surface of biological samples. However, the correlation between the localization and the absolute amount of the analytes in tissue remains challenging. Despite the advantages of maintaining spatial information of the sample and sensitivity, the identification and quantitation of isomeric or isobaric species is hampered by the lack of chromatographic separation.

To deal with both direct quantitation and analysis of isomers, a new analytical workflow was developed to generate simultaneous qualitative and quantitative data. This workflow consists in liquid extraction surface analysis (LESA) followed by a differential ion mobility separation (DMS), hyphenated to tandem mass spectrometry detection (performed in selected reaction monitoring and enhanced product ion scan modes). LESA[1] is a feature implemented on a chip-based infusion nanoelectrospray ionization robot for surface sampling and applied to study the distribution of drugs and their metabolites in postmortem tissue sections[2,3]. Hyphenated to LESA, DMS has the potential to resolve isomers in the gas phase at atmospheric pressure, based on their difference in ionic mobility when a varying separation field waveform is applied. In DMS mode, specific compensation voltages, required to allow transmission of each ion toward the mass analyzer, give an additional level of selectivity. The addition of organic modifiers in the gas transporting the ions has been proven to significantly enhance its separation power by the dynamic formation of clusters between the modifier and the ions[3,4].

The relevance of the LESA-DMS-MS platform for performing quantitation of a set of 30 drugs of abuse has been investigated for forensic purpose as well as the different experimental parameters that have to be considered. The data collected after the extraction of analytes from adjacent kidney sections display intra- and inter- sections reproducibility within the range of 0-25%. Calibration curves, built by spiking calibration standards and quality control samples onto blank kidney sections and spotting internal standards onto target, display linearity over three orders of magnitude, with good precision (< 15%) and accuracy (90-110%). The last step to classify LESA-DMS-MS/MS as a reliable platform for absolute quantitation from tissue sections will consist in analyzing reference samples.

[1] *Kertesz, V and Van Berkel, G.J. J. Mass Spectrom. 2010, 45, 252-260.*
[2] *Eikel, D. et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011, 25, 3587-3596.*
[3] *Porta, T. et al. ASMS Proceedings. 2012.*
[4] *Schneider, B.B. et al., Anal. Chem. 2010, 82(5): 1867-1880.*



Conférences du Club Jeunes

ANALYSES PROTÉOMIQUE ET PEPTIDOMIQUE DES MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS LA TRANSMISSION DE LA BORRÉLIOSE DE LYME.

Gilles Schnell[1], Amandine Boeuf[1], Véronique Delval[1], Aurélie Kern[2], Frédéric Schramm[2], Elody Collin[2], Benoit Jaulhac[2], Nathalie Boulanger[2], Laurence Sabatier[1]

1 - Département des Sciences Analytiques, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, ECPM, Strasbourg
2 - Physiopathologie et médecine translationnelle : groupe Borréliose de Lyme, Facultés de Pharmacie et de Médecine, Strasbourg

La Borréliose de Lyme, due à la transmission de la bactérie *Borrelia burgdorferi sensu lato*, est la maladie vectorielle la plus répandue dans l'hémisphère nord.

Après inoculation par piqûre de tique, une inflammation cutanée apparaît au niveau du site de piqûre, suivie de diverses manifestations cliniques (cutanées, neurologiques ou articulaires…). Ces différentes manifestations pourraient être liées à des facteurs de virulence spécifiques de certaines souches de *Borrelia*. L'infection par l'intermédiaire d'une tique est plus pathogène que l'infection par inoculation des bactéries à l'aide d'une seringue. Ceci peut être dû à l'effet immunomodulateur d'extraits de glandes salivaires. Notre objectif est d'identifier à la fois des facteurs de virulence bactériens et des molécules de tique qui favorisent l'infection bactérienne.

D'une part, nous avons réalisé une analyse différentielle protéomique de 3 souches de *Borrelia* de différentes virulences. Après extraction, séparation sur gel SDS PAGE, découpe systématique et digestion, le contenu protéique est analysé par nano-LC-MS/MS. Cette stratégie a permis l'identification de plus de 700 protéines par souche, dont 80 protéines spécifiques à la souche la plus virulente. L'utilisation combinée de deux moteurs de recherche (Mascot et OMSSA) a augmenté sensiblement le nombre d'identifications. Des analyses par RT-PCR sont en cours afin d'étudier l'expression de protéines d'intérêt au niveau cutané.

D'autre part, nous avons mis au point une méthode d'analyse par RP-HPLC d'extraits de glandes salivaires de tiques. Des tests ont été réalisés sur les fractions collectées et ont révélé des activités intéressantes sur des cellules de la peau. L'identification des molécules contenues dans ces fractions est en cours par MS et MS/MS.

UTILIZATION OF LABEL FREE SPECTRAL COUNTING TO QUANTIFY THE PROTEINS INVOLVED IN THE VARIOUS PHASES OF CHICKEN EGGSHELL MINERALISATION

Pauline Marie[1], Valérie Labas[2,3], Grégoire Harichaux[2,3], Aurélien Brionne[1], Yves Nys[1], Joël Gautron[1]

1 - INRA, UR83 Recherches avicoles, 37380 Nouzilly
2 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours -Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France

Avian eggshell is a natural bioceramic and a physical barrier against microbial contamination. It's formed in the uterus which secretes the mineral and organic precursors (components of uterine fluid). This calcium carbonate biomineral is well ordered. It's considered that its micro-structure and texture is determined by the organic matrix proteins which control the mineralization process and consequently its mechanical properties. Recent advances using high-throughput methods (transcriptomics and proteomics) have led to the identification of more than 500 proteins in the shell[1] and 600 uterine transcripts[2]. In this study, we report our tentative to further characterize the proteins controlling the process by quantification of proteins associated to the different phases of shell calcification, and more particularly those involved in initiation of the mineralization that is crucial to determine the texture and shell quality.

A quantitative proteomic study was performed on uterine fluid proteins collected at the three stages of eggshell mineralization. After *in gel* digestion, peptides were analyzed by nanoLC MS/MS using a LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer. Identifications, validations and spectral counting quantifications were performed with Mascot and Scaffold 3 Q+ softwares. We have identified and quantified about 100 different proteins (NCBI). Amongst them, 54 were found to be statistically abundant depending on the mineralization stages (ANOVA with $p < 0.05$). Analyses are in progress to establish their role in the calcification process by studying their functional domains, their described role in other milieu and their interaction with other molecules. Moreover, a peptidomic analysis using MALDI-TOF profiling and top-down approaches is currently developed to obtain the most comprehensive inventory of molecular species on uterine fluid.

In the present study, we characterize and quantify for the first time proteins present in each stage of mineralization, such as sulfhydryl oxidase 1 or gelsolin. The same determination will be carried out on eggshell proteins extracted at various stages of mineralization and on their corresponding transcripts using RNA sequencing. This strategy using recent advances in high-throughput technologies, and more particularly in quantitative mass spectrometry, should contribute to elucidate the eggshell calcification process to provide new tools to improve egg quality, and ensure an egg free of pathogens for consumer.

[1] *Mann, K. et al, 2006, Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer, Proteomics, 6 (13): 3801-3810.*
[2] *Jonchere, V. et al, 2010, Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg, Bmc Genomics, 11.*

MASSIVE ARGON CLUSTERS TO INCREASE THE SENSITIVITY OF BIOLOGICAL TOF-SIMS IMAGING

Claudia Bich[1], Rasmus Havelund[2], Rudolf Moellers[3], Ian Gilmore[2], Felix Kollmer[3], David Touboul[1], Ewald Niehuis[3], Alain Brunelle[1]

1 - Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France
2 - National Physical Laboratory, Hampton Road, Teddington, Middlesex, TW11 0LW, United Kingdom
3 - ION-TOF GmbH, Heisenbergstrasse 15, 48149 Münster, Germany

TOF-SIMS using bismuth clusters is an efficient method to acquire mass spectrometric images of lipids and small molecules at the surface of tissue sections with a spatial resolution of one micron or less[1]. This method still suffers from a lack of sensitivity for intact lipid. In fact, the limited analyzed thickness (about 10 nm) and the high fragmentation rate tend to limit the number of intact molecules detected. Increasing the analyzed depth or integrating the signal from several layers over the whole sample thickness could overcome these limitations. The process of dual beam depth profiling, using a first beam to analyze the surface and then a second one to sputter the previously analyzed layer appears as an interesting solution. Until recently, the sputter ion beams, as fullerene $C60^+$ were responsible of a severe and/or contamination of the layer. The integration of the signal over the different layers was thus not allowed with these beams[2].

Massive argon cluster ion sources (Ar_n^+, n = 500-2000) have recently been used for TOF-SIMS experiments[3]. These ion beams are able to sputter surfaces without damaging the underlying layers, and thus hold the promise for organic depth profiling or large increases of sensitivity. It was already successfully applied to depth profiling of a polymer sample[4].

The possibility of depth profiling in organic samples using massive argon clusters (Ar_{1500}^+, 10 keV) and bismuth (Bi_3^+, 25 keV) with a TOF-SIMS IV (ION-TOF, GmbH) spectrometer was studied for dual beam depth profiling. Rat brain sections (14 µm) were analyzed in negative and positive ion modes. We demonstrated that the in-depth analysis of a biological sample is possible without damaging the deeper layers. More important, we showed that the sensitivity can be increased by a factor of 10 or more, for some lipids, when integrating the ion signal over the thickness of the sample. We could also highlight the typical behavior of cholesterol, mainly located at or beneath the surface of the brain section.

[1] *D. Touboul, O. Laprévote, A. Brunelle, Curr Opin Chem Biol 15 (2011) 725-732*
[2] *D. Debois, A. Brunelle, O. Laprévote, Int J Mass Spectrom 260 (2007) 115-120*
[3] *J. Matsuo, C. Okubo, T. Seki, T. Aoki, N. Toyoda, I. Yamada, Nucl Instrum Methods Phys Res B 219 (2004) 463-467*
[4] *S. Ninomiya, K. Ichiki, H. Yamada, Y. Nakata, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo, Rapid Commun Mass Spectrom 23 (2009) 1601-1606*



Communications par Affiches



Environnement, Espace

MULTI-COMPONENT QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHARMACEUTICALS AND PERSONAL CARE PRODUCTS IN THE ENVIRONMENT BY LC-MS/MS WITH FAST POLARITY SWITCHING

Natsuyo Asano[1], Kiyomi Arakawa[1], Shinjiro Fujita[1], Kazuo Mukaibatake[1], Ichiro Hirano[1], **Stéphane Moreau**[2], Mikaël Levi[2]

1 - Shimadzu Corporation, Kyoto, JAPAN
2 - Shimadzu France, Paris, FRANCE

Novel Aspect: Fast polarity switching results have been equivalent to dedicated single polarity experiments for the analysis of PPCPs in environmental samples.

Introduction: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) constitute a group of emerging contaminants which have received considerable attention in recent years. Monitoring of PPCPs in the environment is vital as many of these compounds are ubiquitous, persistent and biologically active with recognized endocrine-disruption functions. Given the hazardous nature of these compounds, there is a need to provide fast and sensitive multi-residue methods that are able to analysis multiple classes of compound within one analytical procedure. Here we report a new multi-residue UHPLC-ESI-QqQ method that utilizes fast polarity switching with an optimized chromatographic gradient that removes matrix effects and results in excellent ng/L detection levels. Furthermore, we evaluate the performance of polarity switching in comparison to dedicated single polarity experiments.

Methods: Natural river and lake water were collected from the Shiga region (Japan) and spiked, without any sample pretreatment, at a range of concentration levels (1 – 10,000 ng/L) with 20 PPCPs (*e.g.* Carbamazepine, Dehydronifedipine, Gemfibrozil, Triclocarban). Separation was achieved using a Shim-pack XR-ODS III column (150 x 2.0 mm, 1.6 µm) maintained at 40°C on a UHPLC system (Nexera, Shimadzu, Japan). The method was maintained at a flow rate of 0.4 mL/min with mobile phase A: Water/0.1% formic acid and B: acetonitrile. The gradient (detailed in preliminary data) was optimized to minimize matrix effects. A higher sensitivity triple quadruple mass spectrometer (Shimadzu, Japan) operating in SRM mode with fast polarity switching (20 msec) was used for the detection of positively and negatively charged analytes.

Preliminary Data: As a result of the complex matrix PPCPs are present; the occurrence of ion suppression/enhancement is commonly described in literature and results in reduced MS/MS detection limits and inferior precision. For this reason, a gradient was optimized that focused target analytes at the head of the chromatographic column while allowing the interfering environmental matrix to be eluted; this resulted in excellent recoveries of around 100% for all studied compounds. This was achieved using a gradient which held the aqueous mobile phase at 100% for 6 min, and subsequently increased the organic mobile phase to 80% over 10 minutes and then to 100% organic mobile phase. PPCPs encompass a wide range compound classes and chemical properties and consequently it is necessary to employ both positive and negative electrospray ionization for complete analysis in a single run. All compounds were measured by SRM with fast polarity switching (20 msec) for multi-component analysis. Excellent limits of quantification were achieved in the range 1 – 10 ng/L for nearly all studied compounds, with outstanding linearity ($R^2 > 0.999$). To evaluate the capability of polarity switching the data quality obtained was compared to dedicated negative or positive analysis. Comparisons were made by selecting compounds that prefer positive (Carbamazepine and Dehydronifedipine) and negative ionization (Gemfibrozil and Triclocarban). Findings showed that the data quality obtained during polarity switching experiments was directly comparable to that achieved during dedicated positive or negative analysis. In addition, long term stability was investigated by making 100 injections over > 10 hours, with polarity switching presenting excellent stability.

P-002

APPROCHE EN CHIMIE ENVIRONNEMENTALE : DE LA QUANTIFICATION CIBLÉE DE CONTAMINANTS À L'ÉVALUATION DE LA CONTAMINATION DU MILIEU AQUATIQUE PAR UNE STRATÉGIE NON CIBLÉE

Julien Camilleri[1], Mikaël Tournier[1], Agnéta Kiss[1], Robert Baudot[1], Laure Wiest[1], Romain Carrière[1], Emmanuelle Vulliet[1], Cécile Cren-Olivé[1]

1 - ISA UMR 5280, Service Central d'Analyse (SCA), Chemin du Canal, Échangeur de Solaize, 69390 Solaize

L'évaluation de la pollution du milieu aquatique de surface par divers xénobiotiques montre un intérêt croissant comme le montre le nombre de publications disponibles pour l'analyse ciblée de certaines familles de pesticides ou de médicaments. Les approches ciblées multi-résidus et multi-familles sont un challenge pour l'analyste. En effet la variété des matrices telles que l'eau ou le sédiment et des propriétés physico-chimiques rendent la quantification aux concentrations environnementales d'autant plus complexe.

L'objectif de cette étude est de disposer des méthodes d'extraction et d'analyses multi-résidus validées et sensibles et de pouvoir les coupler à des spectromètres de masse de type triple quadrupole pour la quantification ou QToF pour une approche non ciblée.

Toutes les méthodes développées ont été validées et appliquées à des échantillons réels des deux matrices d'intérêt : l'eau de surface et le sédiment. Les 50 molécules d'intérêt pour l'étude ciblée sont issues de diverses familles de perturbateurs endocriniens (hormones, pesticides, filtre UV, ...) et de principes actifs de la pharmacopée.

Un échantillonneur passif a été calibré afin d'accéder à des concentrations moyennes journalières de pollution. Afin de valider cet outil, une méthode de pré-concentration et analyse en ligne SPE-HPLC-MS/MS (AB Sciex 3200 QTrap) a été développée et validée au laboratoire. Les limites de quantification obtenues par ces méthodes sont inférieures ou égales au ng/L et donc en accord avec les concentrations environnementales. Une campagne en Isère a permis de mettre en évidence la présence de nombreux pesticides et composés pharmaceutiques à des concentrations allant du ng/L à quelques dizaines de ng/L.

Une méthode d'extraction simple et rapide basée sur le principe du QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe) a été mise au point et validée pour l'extraction de ces mêmes composés dans les sédiments, permettant la quantification à des concentrations environnementales.

Ces mêmes techniques de pré-concentration, d'extraction ou d'échantillonnage passif ont été utilisées pour une approche non ciblée. En couplant les systèmes séparatifs à un micrOTOF-Q II (Bruker) ou en injectant en FT-ICR, ces outils permettent de confronter les données acquises à des banques de données de pharmaceutiques, pesticides et métabolite et d'accéder à un aperçu global de la pollution du milieu.

CRIBLAGE DE NOUVELLES BACTÉRIES ENVIRONNEMENTALES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF ET PROTÉOGÉNOMIQUE

Joseph Alexander Christie-Oleza[1], Guylaine Miotello[1], Philippe Guérin[1], Juana Maria Piña-Villalonga[2], Rafael Bosch[2], Balbina Nogales[2], **Jean Armengaud**[1]

1 - CEA, DSV, IBEB, Lab Biochim System Perturb, Bagnols-sur-Cèze, F-30207, France
2 - Microbiologia, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca Spain

L'identification de bactéries par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir de cellules entières devient une méthode standard pour le diagnostic médical car simple et rapide. L'analyse d'échantillons environnementaux reste toutefois un challenge de par l'énorme diversité microbienne qui existe sur Terre et l'absence d'une base de données suffisamment fournie. Nous proposons une stratégie de recherche de signaux *m/z* spécifiques d'un genre donné en se basant sur une identification des protéines les plus abondantes dans les conditions du test et qui généreront des signaux intenses en MALDI-TOF dans la gamme de *m/z* de 1 700 à 20 000. Nous avons identifié les protéines contribuant aux signaux les plus intenses de la bactérie marine *Ruegeria lacuscaerulensis* ITI-1157 en combinant une analyse des cellules par MALDI-TOF et une quantification du protéome par analyse shotgun nanoLC-MS/MS après digestion trypsique. Parmi les neuf protéines identifiées, cinq ont été retenues sur des considérations protéogénomiques. Les valeurs *m/z* théoriques attendues pour ces cinq protéines (formes mono- et di-protonnées) ont été prédites après analyse des génomes disponibles pour le genre *Ruegeria*. Ces cinq biomarqueurs ont été validés par l'analyse d'une deuxième souche de *Ruegeria*, *i.e. Ruegeria pomeroyi* DSS3, par MALDI-TOF. Ils ont ensuite été utilisés comme critères dans une expérience de criblage de nouvelles souches de *Ruegeria* isolées à partir d'eau de mer prélevé dans le Vieux-Port de Marseille puis validées par amplification et séquençage de leur séquence ARN 16S. Cette étude démontre le potentiel de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour faciliter l'isolement de nouvelles souches environnementales d'un genre précis.

[1] *Christie-Oleza et al. (2012) Shotgun nanoLC-MS/MS proteogenomics to document MALDI-TOF biomarkers for screening new members of the Ruegeria genus. Environmental Microbiology, in press.*

P-004

SIGNATURE ISOTOPIQUE COMBINÉE ($\delta^{13}C$-δD) DE TRITERPÈNES PENTACYCLIQUES EXTRAITS DE FUMIERS ARCHÉOLOGIQUES

Jérémy Jacob[1,2,3], **Claude Le Milbeau**[1,2,3], **Nicolas Bossard**[1,2,3], Jean-Robert Disnar[1,2,3], Yves Billaud[4]

1 - Université d'Orléans, ISTO, UMR 7327, 45071, Orléans, France
2 - CNRS/INSU, ISTO, UMR 7327, 45071 Orléans, France
3 - BRGM, ISTO, UMR 7327, BP 36009, 45060 Orléans, France
4 - Ministère de la Culture, DRASSM, 147 place de l'Estaque, 13016 Marseille, France

Les triterpènes de végétaux supérieurs représentent une famille de lipides très répandue chez les angiospermes et sont essentiellement localisés au niveau des cires cuticulaires et des écorces. Ces composés possèdent pour la plupart un squelette hydrocarboné de type oléanane et ursane et, en moindre abondance, lupane, auxquels sont associés un ou plusieurs groupements fonctionnels. Lorsqu'ils sont incorporés dans les sols ou les sédiments, ces composés peuvent subir un certain nombre de modifications telles que la perte des fonctions oxygénées, des isomérisations, l'aromatisation des cycles carbonés et/ou la dégradation d'un cycle. Ces transformations sont dépendantes des conditions bio-physico-chimiques qui règnent dans le milieu. Les produits de dégradation de ces molécules peuvent donc fournir d'importantes informations en vue de reconstructions paléoenvironnementales. Elles constituent par ailleurs un réservoir de molécules originales dont les applications industrielles restent à explorer.

Une grande diversité de triterpènes pentacycliques associés à leurs dérivés diagénétiques ont été détectés dans des fumiers archéologiques datés de l'Age du Bronze préservés au bord du Lac du Bourget. Parmi ceux-ci, l'α- et la β-amyrénone, la friédéline, la lupénone, l'isomultiflorénone et la taraxérone, qui sont des composés ubiquistes chez les angiospermes attestent d'une présence de plantes en C3 alors que la miliacine, la glutinone et la germanicone sont exclusives du millet (seule plante en C4 connue aux abords du Lac du Bourget). Les produits diagénétiques sont, quant à eux, des isomères insaturés, mono-, di- et triaromatiques ayant perdu (ou non) l'un des cycles de leurs squelettes carbonés.

Nous avons mesuré les compositions isotopiques en $\delta^{13}C$ and δD des précurseurs biologiques et des produits diagénétiques par GC-irMS afin (i) de déterminer les organismes sources de ces molécules (C3/C4), (ii) d'élucider les différentes voies diagénétiques conduisant aux dérivés spécifiques et (iii) d'estimer les fractionnements isotopiques de l'hydrogène associés à ces voies de dégradation.

Trois populations de précurseurs biologiques ont pu être distinguées. Les molécules issues du millet présentent des valeurs de $\delta^{13}C$ (-23/-21‰) et de δD (≈ -130‰) systématiquement plus élevées que celles des autres composés produits par des plantes en C3 (-33/-27‰ et -160/-200‰, respectivement). La distribution des valeurs de $\delta^{13}C$ des dérivés diagénétiques montre que, si certains d'entre eux ont une origine purement C3, d'autres résultent de la dégradation de précurseurs issus de plante C3 et de plante en C4. Les valeurs de δD des dérivés diagénétiques sont systématiquement inférieures à celles des précurseurs biologiques, ce qui témoigne d'un appauvrissement en deutérium lors de la diagenèse dont les mécanismes restent à déterminer.

CIMS INSTRUMENT FOR QUASI-SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF H_2SO_4, OH, HO_2 AND ORGANIC RO_2 IN POLLUTED ENVIRONMENT

Alexandre Kukui[1]

1 - LPC2E (CNRS), Orléans

Hydroxyl (OH) and peroxy radicals (hydrogen peroxy HO_2 and organic peroxy RO_2) are important atmospheric species. The OH radical is the major atmospheric oxidation agent determining the atmospheric lifetimes of most of ambient trace gases. Oxidation of atmospheric volatile organic compounds (VOCs) and CO leads to the formation of RO_2 and HO_2 radicals which are partially recycled back to OH. The chemical conversions initiated by OH and photolysis lead to a sometimes complex chemistry involving interaction of the OH and peroxy radicals. Measurements of these radicals are important for understanding the involved photochemical mechanisms. At the same time, because of their low concentrations, less than 107 molecule cm^{-3} for OH, and high reactivity the *in situ* radical measurements are difficult and still relatively rare.

At present, two methods have been essentially used for tropospheric *in situ* OH radical measurements: Fluorescence Assay by Gas Expansion (FAGE) and Chemical Ionization Mass Spectrometry (CIMS). These methods also can be used for the measurements of HO2 (FAGE) and HO_2 and RO_2 (CIMS). We present here modification of previously described CIMS instrument[1] allowing measurements of OH, total peroxy radicals (HO_2+RO_2) and of ratio of hydroperoxy and total peroxy radicals, $HO_2/(HO_2+RO_2)$. In difference to other CIMS instruments used for the measurements of radicals, the presented instrument allows quasi-simultaneous measurements of OH, RO_2 and $HO_2/(HO_2+RO_2)$ and H_2SO_4. Also, in contrast to other CIMS, the presented instrument allows measurements in polluted environment under conditions of high NO_x levels, up to 10-20 ppb.

As an example of the instrument performance we present here results of measurements in Western Antarctica (Concordia station, Dome C) performed in December 2010-January 2011 in the frame of the OPALE (ANR) project.

[1] *Kukui, A., G. Ancellet, G. Le Bras (2008), Chemical ionisation mass spectrometer for measurements of OH and Peroxy radical concentrations in moderately polluted atmospheres, J. Atmos. Chem., 61 (2), 133-154.*

P-006

L'IONISATION CHIMIQUE NÉGATIVE POUR L'ANALYSE DE COMPOSÉS ORGANIQUES HALOGÉNÉS VOLATILES DANS L'AIR ET DANS L'EAU

Clotilde Le Vot[1], Hélène Mestdagh[1], Christophe Dehon[1], Essyllt Louarn[1]

1 - Laboratoire de Chimie Physique, UMR CNRS 8000, Université Paris Sud, Orsay

Le méthane et l'éthane halogénés sont utilisés comme gaz de compression dans les systèmes de refroidissement. Ils se trouvent donc dans l'environnement à des concentrations très faibles de l'ordre du ppt. L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution FT-ICR couplée à une source d'ionisation douce et sélective telle que l'ionisation chimique permet de détecter de tels composés à l'état de trace dans une matrice environnementale complexe. Les précurseurs habituellement utilisés en ionisation chimique positive pour l'analyse environnementale, tels que H_3O^+ et CF_3^+[1], ne sont pas adaptés ou mènent dans certains cas à des voies de fragmentations complexes dans le cas des composés halogénés. D'autres précurseurs utilisés en ionisation chimique négative[2,3], tels que HO^- et $O^{-\bullet}$, ont alors été développés pour détecter et identifier efficacement de tels composés.

Les réactions ion-molécule de ces deux précurseurs avec une série de composés halogénés ont été étudiées avec un spectromètre de masse FT-ICR transportable à aimant permanent de 1,24T (Mobile ICR Analyzer - MICRA)[4]. Les ions précurseurs sont formés à partir d'un gaz neutre : l'eau pour HO^- et N_2O pour $O^{-\bullet}$. Ce gaz neutre est ionisé par un faisceau d'électrons accélérés à 7,5 eV et les ions formés sont piégés dans la cellule grâce à un potentiel négatif de -2,8 V. Pour éviter les interactions entre les électrons et les neutres restants dans la cellule ICR, les électrons sont éjectés en appliquant sur les plaques de piégeage une radiofréquence de fréquence 18 MHz et d'amplitude 1 Vp,p.

La comparaison entre les deux ions précurseurs a montré une réactivité différente selon les molécules halogénées. Le précurseur HO^- est intéressant pour identifier sans ambiguïté les trihalométhanes CX_3H car l'ion produit majoritaire est celui formé par transfert de proton, CX_3^-. Cependant, pour les autres composés, la voie de fragmentation majoritaire est l'abstraction d'un halogénure, ce qui rend leurs identifications impossible. Le précurseur $O^{-\bullet}$ est intéressant pour identifier les HFC puisque l'ion produit majoritaire est celui formé par transfert de proton ou par abstraction de H_2^+. Par exemple dans le cas du HFC-134a ($C_2H_2F_4$), le seul ion obtenu est H_2O^--F^- avec OH^- et C_2F_4 avec $O^{-\bullet}$. Cependant ce précurseur ne montre aucun intérêt dans l'identification des CFC puisque c'est principalement l'halogénure qui est produit. D'autres précurseurs seront donc développés pour identifier efficacement les CFC.

[1] *Dehon et al., Int. J. of Mass Spec., 2011, 299, 113.*
[2] *Mayhew et al., Int. J. of Mass Spec., 2004, 233, 155.*
[3] *Thomas et al., Int. J. of Mass Spec., 1996, 155, 163.*
[4] *Mauclaire et al., European J. of Mass Spec., 2004, 10, 155.*

DÉVELOPPEMENT MÉTHODOLOGIQUE EN SYNTHÈSE CHIMIQUE ET EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE POUR LA PRODUCTION DE MATÉRIAUX BIO-RESSOURCÉS

Mohamed Major[1], Guillaume Moreira[2], Catherine Lefay[2], Trang N.T Phan[2], Didier Gigmes[2], Laurence Charles[1]

1 - Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale, Institut de Chimie Radicalaire (CNRS, UMR 7273) Aix-Marseille Univ., 13397 Marseille Cedex 20, France.
2 - Chimie Radicalaire Organique et Polymères de Spécialité, Institut de Chimie Radicalaire (CNRS, UMR 7273) Aix-Marseille Univ., 13397 Marseille Cedex 20, France.

L'engouement actuel pour la production de polymères à partir de ressources renouvelables, telles que la cellulose, vise à la fois à minimiser notre dépendance vis-à-vis des dérivés pétroliers et à répondre à des enjeux environnementaux. Bien que les polymères naturels aient des propriétés de biodégradabilité intrinsèque, ils souffrent d'inconvénients majeurs : leur sensibilité à l'humidité et leurs propriétés mécaniques médiocres limitent fortement leur application. Une stratégie prometteuse consiste à élaborer des matériaux résultant de mélanges cellulose/polymères synthétiques. C'est un moyen simple de diminuer la proportion de dérivés pétroliers dans des matériaux d'usage courant tout en améliorant leur bio-dégradabilité. Afin d'assurer la stabilité de ces mélanges, il est cependant nécessaire d'ajouter des compatibilisants, composés amphiphiles, miscibles dans chacun des constituants. Pour ce faire, de nombreux travaux explorent la possibilité de modifier la cellulose mais se heurtent à l'extrême complexité structurale et la faible solubilité de ce polymère naturel[1]. Une alternative intéressante consiste à produire des macromolécules hybrides, constituées de chaînes polysaccharides plus courtes et greffées par des segments synthétiques. Le potentiel stabilisant de ces co-polymères étant intimement lié à leurs caractéristiques structurales la mise au point des stratégies de synthèse doit se faire de concert avec le développement des méthodes analytiques.

Cette étude présente des résultats préliminaires obtenus lors de l'utilisation de sucres de faible taille, (glucose, cellobiose et maltotriose) comme substrat saccharidique. Une voie de synthèse en trois étapes, basée sur la polymérisation radicalaire contrôlée assistée par nitroxide (NMP)[2], a été développée pour permettre la croissance du polystyrène à basse température sur ces espèces saccharidiques, une condition cruciale au regard de la stabilité thermique des polymères naturels. La spectrométrie de masse a été utilisée pour caractériser la structure des produits obtenus à l'issue de chaque étape. Sur la base de ces données spectrales, un protocole de purification a été développé afin d'éliminer des produits secondaires à l'origine de réactions de polymérisation compétitives, ce qui a permis d'obtenir les co-polymères saccharide-g-polystyrène attendus.

[1] *HA Krassig In Cellulose and its derivatives: Chemistry, biochemistry and applications, Ellis Horwood Ltd, Chichester, 1985, pp 3-25.*
[2] *E Bloch, TNT Phan, D Bertin, P Llewellyn, V Hornebecq Microporous Mesoporous Mater 2008, 112, 612.*

P-008

FAST GCMS/MS ANALYSIS OF PESTICIDES (QUECHERS) USING RAPID FULL SCAN/MRM SWITCHING MODES

Stéphane Moreau[1], Susanne Kräher[2], S. Kitano[3], Haruhiko Miyagawa[3], Margit Geißler[2], Hans-Ulrich Baier[2]

1 - Shimadzu France
2 - Shimadzu Europa GmbH, Albert Hahn Straße 6-10,47269 Duisburg, Germany
3 - Shimadzu Corporation, 1, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan

The determination of pesticides residues in food prepared by the well-established QuEChERS preparation has been done by single quadrupole GCMS in selected ion monitoring (SIM) or SCAN modes, GCMS/MS using multi reaction mechanisms (MRM) and LCMS/MS (MRM).

Using single quadrupole GCMS full scan modes provide maximum safety to avoid false positive or false negative identification as matrix signals can interfere with the signals of the target compounds. Here large volume injections are required to obtain the regulated sensitivity[1]. On the other hand SIM in GCMS shows significant higher sensitivity for quantitative analysis but contain in presence of matrix some uncertainty for identification. Despite the fact that MRM modes in triple quadrupole GCMS/MS show certainly better safety in Identification of target compounds full scan spectra search gives an additional safety check to avoid false positive or false negative identification in complex matrices. Therefore here MRM/SCAN modes were used to obtain both data sets for each pesticide in one analytical run.

In the past fast GC and GCMS using narrow bore columns have become a powerful tool to increase analysis efficiency in different fields. This approach reduces analysis time drastically while mainly maintaining the chromatographic resolution. As sample capacity for 0.1 mm inner diameter columns is reduced in comparison with standard columns in this work a RTX-5 20 m, 0.15 mm, 0.15 µm was used which was compatible with the matrices analyzed. Regarding the detector part the system must be able to follow sharp increases of signals as the peak widths at half height (FWHM) in fast GC with narrow bore columns are expected to be down to about 0.5 sec.

Therefore in fast GC the mass spectrometric detector must supply enough data points in order to allow quantification. Here the Shimadzu GCMS-TQ8030 triple quadrupole MS was used. This instrument offers full scan scanning speed up to 20,000 amu/sec and 600 MRM transitions/sec sequentially with a minimum dwell time of 1 msec.

The method was adapted to QuEChERS extracts of pear and tea matrix. The limit of quantification (MRM) was below 0.1 ppb. Linear calibration curves were done between 0.5 ppb and 100 ppb using triphenylphosphate (TPP) as internal standard.

The method shows that enough data points can be obtained over each peak for MRM Quantification and full scan spectra for automatic library search. The search algorithm included a linear retention index filter using a dedicated pesticide library (Chromaleont, Italy).

With the above combination of MRM and full scan data a method is supplied which avoids uncertainties in the identification of signal in the presence of matrix signals.

[1] *K. Friedrich, H.D. Winkeler and H.-U Baier, The Column, March 2009.*

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE QUECHERS-LC-TOF-MS POUR L'ANALYSE DE SUBSTANCES PHARMACEUTIQUES DANS DES BOUES ISSUES DE STATION D'ÉPURATION

William Peysson[1], **Cécile Cren-Olivé**[1], Emmanuelle Vulliet[1]

1 - Institut des Sciences Analytiques-UMR5280, Service Central d'Analyse, équipe TRACES, Chemin du canal, 69360 Solaize

De nombreuses substances chimiques issues de nos activités domestiques sont introduites dans l'environnement *via* l'épandage de boues issues de station d'épuration. Les données de la littérature indiquent que l'efficacité des traitements appliqués dans les stations peut varier de 24 à 100% selon le type de molécules et le procédé utilisé. Les rejets de substances pharmaceutiques sont particulièrement préoccupants car ces substances présentent des activités biologiques à très faibles doses. Au niveau européen, peu d'études existent sur la caractérisation de ces substances dans les boues. L'une des principales raisons est la difficulté rencontrée pour leur détection et quantification dans une matrice solide. Il s'agit, en effet, d'un véritable défi analytique que d'analyser une telle diversité de substances à des teneurs très faibles (de l'ordre de la dizaine de ng/g) dans une matrice aussi complexe que la boue.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail consistait à développer une méthode permettant d'effectuer un large screening (près de 150 substances ont été sélectionnées) de substances pharmaceutiques et hormones dans des boues. Pour cela, une préparation d'échantillon innovante, efficace et reproductible basée sur la méthode QuEChERS a été développée, suivie d'une analyse par LC-ToF-MS.

La méthode développée a pu être appliquée à l'analyse des substances ciblées dans diverses boues (chaulées, compostées, digérées, sèches, liquides) collectées dans des stations d'épuration en France.

P-010

IMPACT DE LA PHOTODÉGRADATION SUR LE δD DE LA MILIACINE ET AUTRES TRITERPÈNES PENTACYCLIQUES

Catherine Py-Circan[1,2,3], **Jérémy Jacob**[1,2,3], Mathieu Cazaunau[4], **Claude Le Milbeau**[1,2,3], **Nicolas Bossard**[1,2,3], Abdelwahid Mellouki[4]

1 - Université d'Orléans, ISTO, UMR 7327, 45071, Orléans, France
2 - CNRS/INSU, ISTO, UMR 7327, 45071 Orléans, France
3 - BRGM, ISTO, UMR 7327, BP 36009, 45060 Orléans, France
4 - Institut de Combustion Aérothermique, Réactivité et Environnement, UPR3021 du CNRS, 45071, Orléans, France

Après la mort de leur organisme source, certaines molécules organiques produites par des végétaux supérieurs terrestres sont acheminées, *via* les sols puis les fleuves, vers des lacs ou des mers au fond desquels elles s'accumulent dans les sédiments. L'étude de la diversité et de l'abondance de ces molécules fossiles (ou biomarqueurs moléculaires) accumulées au cours du temps permet de retracer, au même titre que les pollens ou autres fossiles, l'évolution des végétations passées. Par exemple, la miliacine (3β-méthoxy-oléan-18-ène), un triterpène pentacyclique détecté dans les sédiments du Lac du Bourget, a permis de retracer l'évolution de la culture du millet pendant l'âge du Bronze dans les Alpes[1].

Des travaux récents indiquent que le rapport isotopique deutérium/hydrogène (δD ou D/H) de molécules organiques produites par des végétaux supérieurs terrestres dépend des conditions environnementales (température, précipitations, humidité…) qui régnaient lorsqu'elles ont été synthétisées[2], ce qui permet d'espérer reconstruire l'évolution des conditions environnementales à partir de la mesure du δD sur des molécules individuelles extraites de séries sédimentaires. De nombreuses études s'attellent à comprendre les facteurs qui conditionnent le δD de molécules lors de leur synthèse dans la plante[2]. Les biomarqueurs moléculaires, bien que réputés stables, peuvent être détériorés au cours de leur transport ou de leur archivage, ce qui peut affecter leur δD.

Dans cette étude, nous avons voulu déterminer dans quelle mesure la photodégradation pouvait avoir un impact sur le δD de la miliacine et d'autres triterpènes pentacycliques. Les mécanismes de dégradation des triterpènes pentacycliques par photodégradation sont largement connus[3] mais leurs conséquences sur le δD l'est beaucoup moins. Ici, nous avons exposé plusieurs triterpènes pentacycliques (miliacine, lupénone, friédéline, …) à une lumière artificielle et aux UV avant d'identifier et de quantifier leurs produits de dégradation par GC-MS. La détermination du δD de chaque produit de dégradation par GC-irMS et sa comparaison avec le δD des molécules initiales nous permet de discuter les fractionnements isotopiques associés à la photodégradation.

---

[1] Jacob, J., Disnar, J.R., Arnaud, F., Chapron, E., Debret, M., Lallier-Vergès, E., Desmet, M., Revel-Rolland, M. (2008).Millet cultivation history in the French Alps as evidenced by a sedimentary molecule. Journal of Archaeological Science 35, 814-820.

[2] Sachse, D., Billault, I., Bowen, G.J., Chikaraishi, Y., Dawson, T.E., Feakins, S.J., Freeman, K.H., Magill, C.R., McInerney, F.A., Van der Meer, M.T.J., Polissar, P., Robins, R., Sachs, J.P., Schmidt, H.-L., Sessions, A.L., White, J.W.C., West, J.B., Kahmen, A. (2012). Molecular paleohydrology: Interpreting the hydrogen-isotopic composition of lipid biomarkers from photosynthetic organisms. Annual Review of Earth and Planetary Sciences 40, 221-249.

[3] Simoneit, B.R.T., Xu, Y., Neto, R.R., Cloutier, J.B., Jaffé, R. (2009). Photochemical alteration of 3-oxygenated triterpenoids: Implications for the origin of 3,4-seco-triterpenoids in sediments. Chemosphere 74, 543–550.

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE ANALYTIQUE POUR L'ANALYSE D'ANTIBIOTIQUES VÉTÉRINAIRES ET HUMAINS ET STÉROÏDES HORMONAUX DANS LE SOL

Marie-Virginie Salvia[1], Emmanuelle Vulliet[1], Robert Baudot[1], Laure Wiest[1], Cécile Cren-Olivé[1]

1 - Institut des Sciences Analytiques, Département Service Central d'Analyse, UMR5280, Équipe TRACES, CNRS, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

L'utilisation croissante de produits chimiques pour l'agriculture et l'activité domestique est responsable de la dissémination de nombreuses substances nuisibles à l'homme dans l'environnement. Parmi ces dernières, les stéroïdes hormonaux et les composés pharmaceutiques ont suscité une vive attention ces dernières années[1].

Cette étude a pour objectif de développer une méthode analytique pour l'analyse de ces produits à l'état de traces dans le sol. Ainsi, 31 produits ont été sélectionnés pour ce travail, incluant 14 produits vétérinaires, 11 stéroïdes hormonaux et 6 autres produits utilisés dans cette étude comme marqueurs de pollution. Une méthode d'analyse à la fois sélective et sensible, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), a été développée. L'optimisation a permis de déterminer les meilleures conditions chromatographiques et de détection en spectrométrie de masse.

L'analyse d'une matrice complexe telle que le sol a nécessité de mettre en œuvre une préparation d'échantillon rigoureuse pour obtenir une analyse reproductible, et suffisamment sensible pour atteindre les limites de détection requises. Une étape d'extraction inspirée par la méthode QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) a été mise en place. C'est une technique innovante (les premiers travaux datent de 2003), simple, rapide et économique. Cette méthode est basée sur le principe d'une extraction liquide-liquide. L'échantillon est extrait avec un solvant organique en présence de sels et d'agents tampons pour induire la séparation des phases. Plusieurs paramètres ont été optimisés pour extraire au mieux les 31 composés étudiés qui sont la masse de terre introduite, la nature du solvant, les volumes d'eau et de solvant et la nature du tampon. Une étape de purification SPE (Solid Phase Extraction) est nécessaire pour réduire les effets matrice : une cartouche SAX (Strong Anion eXchange) a été utilisée en tandem avec une cartouche StrataX. La procédure analytique permet de déterminer les analytes cibles à des concentrations inférieures au ng/g. Après une validation basée sur ICH/2005, cette méthode analytique a été appliquée à des échantillons de terre réels. Certains ont été traités avec du fumier quelques mois auparavant, d'autres avec des boues de station d'épuration et d'autres n'ont subi aucun traitement. Les résultats montrent que les échantillons contiennent de faibles teneurs en contaminants (inférieur au ng/g).

[1] *K. Kumar, Satish C. Gupta, Yogesh Chander, and Ashok K. Singh, Advances in Agronomy, 87, 1 (2005).*
[2] *MV. Salvia, E. Vulliet, L.Wiest, R. Baudot, C.Cren-Olivé, Journal of Chromatography A (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.034.*



Petites Molécules

CARACTÉRISATION PAR MALDI-TOF DU "COKE SOLUBLE ET INSOLUBLE" SUR UNE ZÉOLITHE BEA

Christine Canaff[1], Ludovic Pinard[1], Soumayah Hamieh[1], Mehrad Tarighi[1], Yannick Pouilloux[1]

1 - IC2MP Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers UMR 7285 - Bâtiment B4, rue Michel Brunet 86022 POITIERS

Les zéolithes sont des catalyseurs très employés en raffinage du pétrole, pétrochimie, dépollution et en chimie fine. Cependant, les zéolithes se désactivent par des dépôts carbonés (« coke »). Les mécanismes de formation de « coke » dans les zéolithes sont bien compris. La raison principale vient du fait que les sites actifs sont pour l'essentiel situés dans les pores de caractéristiques bien définies et de taille voisine de celles des molécules organiques. Les pores sont donc de véritables nanoréacteurs dans lesquels se déroulent à la fois la réaction désirée et la formation de « coke », la croissance des molécules de coke étant limitée par la taille des pores. Les constituants du « coke » zéolithique sont généralement analysés par des méthodes classiques de chimie organique (CPV, SM, IR, *etc.*). Un des problèmes à résoudre est leur récupération dans un solvant, récupération qui se fait après dissolution de la zéolithe dans l'acide fluorhydrique[1,2]. Soulignons qu'aux températures de réaction élevées (> 300°C), une partie du coke est insoluble ou peu soluble dans les solvants organiques, la caractérisation de cette fraction « insoluble » ou « peu soluble » se limitant souvent à la composition élémentaire. Les techniques d'analyses par MADI-TOF et LDI-TOF[3] permettent d'accéder à la distribution massique des composants de ce « coke insoluble », à sa localisation (pore ou surface externe) et à sa morphologie.

Ces techniques de caractérisations ont été utilisées pour la caractérisation complète du « coke » formé lors de la transformation de l'éthanol sur zéolithe BEA à 350°C.

L'ensemble des analyses (GC-MS, MALDI-TOF, LDI-TOF) ont permis d'identifier 15 familles de composés : alkylbenzènes, naphtalènes, pyrènes, anthracènes, chrystènes… Ces différents composés sont plus ou moins alkylés. La distribution du nombre de groupement alkyles (méthyles et éthyles) a été déterminée pour chacune des familles à l'aide des analyses en MALDI-TOF.

Enfin, la combinaison de l'ensemble des résultats obtenus avec ces techniques ont permis d'avoir une cartographie à la fois moléculaire et spatiale de l'ensemble des composés du « coke ». Un mécanisme successif de formation des différents constituants du « coke » sera également présenté.

[1] *M. Guisnet, P. Magnoux, Appl.Catal.54 (1989) 1-27.*
[2] *L. Pinard, P. Bichon, A. Popov, J.L. Lemberton, C. Canaff, F. Maugé, P. Bazin, E. Falabella S-Aguiar, P. Magnoux, Appl. Catal.A 406(2011) 73-80.*
[3] *F. Bauer, W.H. Chen, E. Bilz, A. Freyer, V. Sauerland. S.B. Liu, Journal of Catalysis 251 (2007) 258-270.*

P-013

ADVANCED ANALYTICAL STRATEGY FOR MEASURING PHTHALATE METABOLITES AT TRACE LEVELS IN HUMAN FLUID SAMPLES USING ON-LINE TURBULENT FLOW PRECONCENTRATION WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

Ronan Cariou[1], Marie Allain[1,2], Emmanuelle Bichon[1], Jean-Philippe Antignac[1], Bruno Le Bizec[1]

1 - LUNAM Université, Oniris, USC 1329 Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, France
2 - INRA, Nantes, France

Over the last decade, growing attention has been paid to phthalate diesters, evidencing them as a new potential chemical risk for human. In particular, pieces of evidence relying some of them to reproductive or developmental troubles have been established by the scientific community. Together with an increasing and significant media relay, these results largely participate to the current "hot" debate associated with these substances, on either the scientific, regulatory, risk management or consumer's perception points of views. Used as plasticizers in various applications like food contact materials, medical devices, toys, cosmetics and PVC-based polymers, the sources of exposure are multiple. Consequently, total exposure can only be reported by body burden assessments. Such data is highly valuable for the risk managers. Biomarkers, which are phthalate metabolites, are usually measured in biological fluids by *off-line* or *on-line* SPE-LC-ESI(-)-QqQ. In this context, the aim of this work is to illustrate the potential of recent advances in food analysis by describing an innovative analytical strategy dedicated, phthalate diester metabolites at trace levels in human fluids (urine, serum and breast milk), involving *on-line* preconcentration in turbulent flow conditions with LC-HESI(-)-HRMS. Eventually, the generation of new data will contribute to the Human exposure assessment to these emerging substances through the determination of circulating levels, with potential impact for initiating relevant toxicological tests by orienting target chemicals and/or doses.

MISE EN ŒUVRE DU COUPLAGE HPTLC-MALDI-TOF-MS POUR L'ANALYSE DES FLAVONOÏDES DANS LES EXTRAITS DE POMMES

Laëtitia Fougère[1], Émilie Destandau[1], Benoît Maunit[1], Claire Elfakir[1]

1 - Institut de Chimie Organique et Analytique, UMR 7311 rue de Chartres F-45067 Orléans

La chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) est une technique régulièrement utilisée pour l'analyse phytochimique d'extraits de plantes. C'est une méthode séparative simple, rapide, polyvalente et peu onéreuse comparée à la chromatographie en phase liquide (HPLC). Elle permet d'analyser simultanément plusieurs échantillons, sans traitement préalable et d'obtenir rapidement l'empreinte générale d'un extrait. Après séparation, les molécules peuvent être visualisées soit par l'utilisation de révélateurs spécifiques soit par lecture de la plaque avec un densitomètre. Ces deux modes de détection renseignent sur les familles moléculaires présentes dans l'extrait mais ne permettent pas l'identification des composés. Cette dernière est aujourd'hui possible grâce au couplage HPTLC-MS.

Le but de nos travaux concerne la mise au point du couplage HPTLC-MALDI-TOF-MS (Autoflex, Bruker) pour effectuer l'analyse et caractériser la famille des flavonoïdes, majoritairement présente dans les plantes. Durant cette étude, plusieurs optimisations ont été effectuées à partir de standards et d'un échantillon d'extraits de résidus de pomme, connus pour être une source riche en flavonoïdes tels que la rutine, la quercitrine, la phloridzine. Ces optimisations ont mis en évidence l'importance de paramètres tels que :

- Les conditions de dépôt (quantité, volume) et d'élution sur la plaque afin d'aboutir à une séparation optimale des composés.
- Le mode de dépôt de la matrice, sa nature et sa concentration afin d'obtenir un taux d'ionisation maximal des molécules et ainsi favoriser leur caractérisation par spectrométrie de masse.

Un autre point essentiel est de parfaitement étalonner le spectromètre de masse dans une gamme adéquate (en l'occurrence, 100 à 800 Daltons).

Afin de montrer la pertinence et la justesse des résultats (caractérisation des molécules, proposition de formule brute et proportion relative des composés entre eux) obtenus par HPTLC-MALDI-TOF-MS, le même extrait de résidus de pomme a été analysé par LC-ESI/MS. Les performances de la méthodologie ont été ensuite évaluées sur d'autres extraits de plantes (feuilles de pommier et baies d'argousier).

P-015

MULTI-CLASS PESTICIDE ANALYSIS IN CHALLENGING VEGETABLE MATRICES USING FAST 5 MSEC MRM WITH 15 MSEC POLARITY SWITCHING

Yuka Fujito[1], Yusuke Inohana[2], Kiyomi Arakawa[2], Mikaël Levi[3], **Stéphane Moreau**[3], Ichiro Hirano[2]

1 - Shimadzu Analytical & Measuring Center, Inc., Kyoto, JAPAN
2 - Shimadzu Corporation, Kyoto, JAPAN
3 - Shimadzu France, Noisiel, FRANCE

Many regulatory authorities have established multi-class residual pesticides methods for the analysis of vegetables, fruits and other food stuffs. However, there is no global agreement on the provision of a target list of pesticides and this presents a risk with products moving between different regulatory requirements. In order to eliminate this risk, food safety laboratories need to ideally screen as many compounds as possible in a single run which may reach maximum residual limits (MRL); typically 10 ppb in food matrices. In this study we report the application of ultra-fast 5 msec SRM with 15 msec polarity switching for the analysis of 138 pesticides, while still obtaining excellent LOQs for the majority of compound < 10 ppb. Leek and Paprika (yellow and red) were purchased from a local Japanese grocery store, with the country of origin Japan (Leek) and New Zealand (Paprika). Sample preparation was carried out by the use of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) method. A triple quadruple mass spectrometer (8030, Shimadzu, Japan) with modified ion optics was used to monitor 276 SRM transitions (two SRMs per compound). Each transition was monitored ±0.8 minutes of the target analytes retention time. The maximum loop time was 0.58 seconds and the maximum number of overlapped MRM transitions was 98 (Dwell time: 5 msec, Pause time: 1 msec).

According to the method published by the European Union Reference Laboratory (EURL) entitled "Multiresidue Method using QuEChERS followed by GC-QqQ/MS/MS and LC-QqQ/MS/MS for Fruits and Vegetables", 138 pesticides were selected as target analytes with sample pre-treatment by QuEChERS methods. Of these 138 pesticides, the EURL analyzed and validated 66 pesticides by GC-QqQ and the remaining 72 pesticides by LC-QqQ. In contrast to the EURL method, in this study all 138 pesticides were analyzed in a single analysis using MRM after spiking into vegetable matrices. This was achievable due to the fast dwell (5 msec) and pause times (1 msec) and rapid polarity switching (15 msec) of the triple quadruple mass spectrometer. Each MRM was optimized and calibration curves constructed in the range 1 to 1000 ppb. 21 pesticides measured by GC-QqQ in the EURL method did not reach the necessary LOQ (10 ppb), but the remaining 45 pesticides achieved excellent LOQs in the range 0.08–10 ppb. 5 ppb and 50 ppb matrix matched standards were prepared for recovery studies. 90% of the pesticides analyzed presented excellent recoveries in the range 70-120% in all studied matrices.

DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DE TRACES D'INSECTICIDES ET DE LEURS MÉTABOLITES DANS LE PAIN D'ABEILLES PAR UHPLC-MS/MS

Barbara Giroud[1], Antoine Vauchez[1], Laure Wiest[1], Emmanuelle Vulliet[1], **Audrey Buleté**[1]

1 - Institut des Sciences Analytiques-UMR5280, Service Central d'Analyse, Chemin du canal, 69360 Solaize

Une des causes identifiées de la surmortalité des abeilles à l'échelle mondiale est l'utilisation massive de pesticides qui peuvent contaminer les abeilles soit directement, soit *via* leur nourriture. Afin d'évaluer les effets chroniques de ces pesticides et de leurs métabolites à de faibles doses, des méthodes d'analyse sensibles, robustes et reproductibles sont nécessaires. Notre objectif est de développer une méthode d'analyse innovante, fiable et reproductible pour détecter et quantifier des insecticides de la famille des pyréthrinoïdes et néonicotinoïdes ainsi que leurs métabolites, à l'état de traces (teneurs de l'ordre du ng/g), dans le pain d'abeille. A l'heure actuelle, encore peu de travaux ont porté sur l'analyse de résidus de pesticides dans cette matrice.

La stratégie analytique adoptée repose sur une préparation d'échantillon efficace et reproductible par la technique QuEChERS suivie d'une analyse sélective et sensible par ultra haute performance chromatographie liquide (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem, analyseur de dernière génération.

La méthode développée et validée permet d'obtenir des limites de détection inférieures au ng/g, exceptées pour deux molécules. Elle permet donc la détection des pesticides ciblés et de leurs métabolites, à des seuils sub-létaux, dans le pain d'abeille.

P-017

ANALYSE LC-MS/MS TRIPLE QUADRIPÔLE DE GLUCOSINOLATES DANS DES ÉCHANTILLONS VÉGÉTAUX : PROFILAGE ET QUANTIFICATION, COMPARAISON AVEC UPLC-MS/MS ET APPLICATION AUX ORGANES D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

Arnaud Goyallon[1,2], **François Perreau**[1,2]

1 - INRA, UMR1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France
2 - AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France

Les glucosinolates sont des métabolites secondaires soufrés produits principalement par les plantes de la famille des crucifères[1]. Cette famille inclut nombre de plantes cultivées comme le colza, le chou, la moutarde, et la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Agronomiquement, les glucosinolates sont connus pour leur rôle défensif contre les agresseurs des plantes[2], ainsi que pour la saveur de la nourriture qui en est issue (le piquant de la moutarde par ex.). Si les régimes incluant des choux sont réputés pour leurs effets préventifs contre le cancer, c'est qu'ils contiennent des glucosinolates[3].

Du fait de leur rôle en physiologie végétale et de leur intérêt en nutrition humaine, notre plateau de chimie du végétal a développé des méthodes de profilage et quantification relative de ces composés dans les plantes. Nos objectifs étaient 1) de valider une méthode de profilage (LC-MS) et de quantification (LC-MS/MS MRM) sur ces composés par technologie triple quadripôle, 2) de comparer ces performances avec une méthode utilisant le couplage d'un triple quadripôle récent (Xevo TQ-S) avec une UPLC et 3) d'appliquer la méthode à l'étude de la teneur en glucosinolates dans différents organes d'*Arabidopsis*.

La méthode d'extraction a tout d'abord été mise au point par plan d'expériences de type Box-Behnken, aboutissant à des conditions robustes. Puis par l'analyse LC-MS ES- d'un extrait de plante entière, nous avons pu repérer plus de vingt glucosinolates, grâce notamment à leur motif isotopique caractéristique de multisoufrés. Des analyses LC-MS/MS et la littérature ont appuyé les identifications proposées. La méthode a été validée. Les limitations de l'appareillage LC-MS classique ont été mises en évidence : bas débit, nécessité de deux analyses distinctes pour le profilage et la quantification, limites de détection hautes (µg/g en quantification MRM, 100 fois plus en profilage LC-MS). *A contrario*, L'UPLC-MS/MS a permis l'analyse à haut débit et simultanée, par profilage en balayage complet pour profilage et par MRM pour une quantification ultrasensible.

La teneur en glucosinolates a enfin été analysée en différents organes d'*Arabidopsis*. Si la glucoraphanine est très majoritaire dans les feuilles, les racines contiennent de surcroît l'indolique néoglucobrassicine, tandis que les graines recèlent des composés moins oxydés ou à plus longue chaîne alkyle. Ceci suggère des fonctions différentes pour chaque type de glucosinolate[4].

[1] *N. Agerbirk, C.E. Olsen (2012) Glucosinolates structure in evolution, Phytochemistry 77: 16–45.*
[2] *P. Bednarek et al. (2009). A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense, Science 323 (5910): 101-106.*
[3] *J.D. Hayes, M.O. Kelleher, I.M. Eggleston (2008). The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates, Eur. J. Nutr. 47 (2): 73–88.*
[4] *P.D. Brown, J.G. Tokuhisa, M. Reichelt, J. Gershenzon (2003) Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of Arabidopsis thaliana, Phytochemistry 62: 471–481.*

PRELIMINARY STUDY OF THE OCCURRENCE OF MELANOIDINS IN THE FORMATION OF A NEW FLAVOUR FAMILY IN OAK FOR WINES AND SPIRITS AGEING

Marie-Françoise Nonier[1], Nicolas Vivas[1], Nathalie Vivas de Gaulejac[1], Christelle Absalon[2], Claire Mouche[2]

1 - Centre de Recherche DEMPTOS - CESAMO - ISM - Université Bordeaux 1 - 351 Cours de la Libération - 33400 Talence
2 - CESAMO - ISM - Université Bordeaux 1 - 351 Cours de la Libération - 33400 Talence

The Maillard reaction is the set of interactions resulting from the initial reaction between a reducing sugar and an amino group. This reaction has an enormous importance in food chemistry. It is the main responsible of the production of odours, flavours and pigments characteristics of cooked foods. It can also reduce the nutritional value of foods by degrading the essential amino acids. *In vivo*, it operates in the process of collagen degradation.

We can subdivide the Maillard reaction in three main steps. The first leads to the formation of reversible glycosylamines which rearrange as rearrangements of Amadori or Heyns. The second step is the degradation products of rearrangements of Amadori and Heyns. It leads in particular to the formation of heterocyclic compounds responsible for odours. The third step is the polymerization of intermediate reaction products during the second step. It produces melanoidins. Temperature, reaction time, the water content and the concentration and nature of the precursors influence the Maillard reaction. Industrial applications of Maillard reaction are numerous.

We have developed, at first, a method of extraction and purification melanoidins coffee. Toasted coffee is a major source of melanoidins. We conducted various liquid-liquid extractions, then a separation of compounds by HPLC/DAD. We were able to identify melanoidins coffee with their Visible spectra. They were purified by preparative HPLC. We then studied these compounds by different techniques to try to establish their structures.

We have implemented these methods of extraction and purification to melanoidins oak wood and liquid extracts of oak wood. The most toasted woods are the woods richest in melanoidins. We characterized them through analytical techniques: LC/DAD, LC/MS^n, Pyrolysis/GC/MS. We also study the role of melanoidins on the colour and the flavour of wines and spirits ageing in oak barrels.

P-019

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE MULTI-RÉSIDU PAR SPE-HPLC-MS/MS POUR LE SUIVI DE LA MIGRATION D'ADDITIFS ET PRODUITS DE DÉGRADATION DE CONDITIONNEMENTS PLASTIQUES DANS L'EAU

Charlène Pouech[1], Florent Lafay[1], Laure Wiest[1], Didier Léonard[2], Cécile Cren-Olivé[1]

1 - Université de Lyon - Institut des Sciences Analytiques, Département Service Central d'Analyse - Équipe TRACES, UMR 5280 CNRS, Université Lyon1, ENS-Lyon - 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France.
2 - Université de Lyon - Institut des Sciences Analytiques, Laboratoire des Sciences Analytiques - Équipe SIMS, UMR 5280 CNRS, Université Lyon 1, Bâtiment Curien (CPE), 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France.

Au cours de ces dernières années, un intérêt croissant pour les matériaux plastiques a été constaté. Cet engouement s'explique par leur caractère malléable, incassable, solide, léger, recyclable, transformable et leur remarquable rapport qualité/prix. Ces propriétés sont en particulier dues à l'incorporation de substances, appelées additifs, à des polymères naturels ou synthétiques. En effet, les additifs modifient et/ou améliorent les propriétés et performances du polymère. De ce fait, l'industrie des polymères est désormais en mesure de produire un plastique spécifique pour chaque type d'application tout en respectant les exigences requises du domaine concerné. Ainsi, les matériaux plastiques sont de plus en plus employés pour conditionner des produits alimentaires ou pharmaceutiques.

Cependant, l'inertie d'un emballage vis-à-vis du contenu est rarement totale. La migration des additifs, présents initialement dans l'emballage vers le contenu, correspond au phénomène le plus inquiétant pour la santé du consommateur : le produit peut alors être altéré, ou être rendu toxique. Les industries se soucient alors de ce phénomène, et le maîtrisent. Elles imposent ainsi dans leurs domaines respectifs le nombre d'additifs, la nature des additifs ainsi que les teneurs maximales autorisées à incorporer dans les produits finis. A l'heure actuelle, la méthode de référence pour identifier et quantifier le relargage d'un certain nombre d'additifs est réalisée en HPLC-UV. Or, la présence des additifs généralement à l'état de traces dans les conditionnements nécessite le développement de méthodes beaucoup plus sensibles et spécifiques. La spectrométrie de masse en tandem est alors le détecteur le plus adapté pour gagner en sélectivité, spécificité et sensibilité.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de développer une méthode multi-résidu par SPE-HPLC-MS/MS dans le but d'analyser à l'état de traces et simultanément le relargage d'une vingtaine d'additifs et produits de dégradation dans des solutions. Compte tenu de la diversité des propriétés physico-chimiques des additifs, une comparaison des sources d'ionisation APCI et ESI s'est alors imposée afin de déterminer le mode d'ionisation optimal. En second lieu, une technique d'extraction par SPE a été développée afin d'assurer le maximum de récupération des molécules. Et enfin, cette méthodologie analytique sera validée selon les critères établis par ICH.

QUANTITATIVE ANALYSIS BY MRM OF COLISTIN AND RIFAMPICIN IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CULTURE MEDIUM

Boutayna Rhourri-Frih[1], Corinne Buré[2], Boubakar Ba[1], Jean-Pierre Dubost[1], Jean-Marie Schmitter[2], Karen Gaudin[1]

1 - EA 4575 Développements Analytiques et Pharmaceutiques appliqués aux Maladies Négligées et aux Contrefaçons, Université Bordeaux Segalen
2 - UMR CNRS 5248, Chimie Biologie des Membranes et Nano-objets

Pseudomonas aeruginosa is a common Gram-negative, aerobic bacterium that can cause severe diseases in animals and humans. In cystic fibrosis (CF) disease, chronic endobronchial infection with *P. aeruginosa* is a serious complication[1].

Antibiotherapy is used for the treatment of this associated infection, contributing to a better nutritional and respiratory status and a prolonged survival[2]. Multidrug-resistant *P. aeruginosa* infection may be treated successfully by using two antibiotics with different mechanisms of action. Resistance to colistin is rare and its synergistic combination with rifampicin will most likely succeed in overcoming the resistance of bacterial strains.

An *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic model for the study of antibacterial activity developed in our laboratory will be used to optimize the therapeutic regimens for the association of these two antibiotics. This can be achieved by predicting the antibiotic efficacy thanks to a very tight description of the time course of antibiotic concentrations in the presence of the bacterial strain. Since the simulated pharmacokinetic profiles will be those of the pharmacologically active free fractions, very low limits of quantification (below 0.05ppm) must be reached for these antibiotics in order to measure their concentrations over a long period of time.

A method of simultaneous solid phase extraction of the two antibiotics was developed, with extraction recoveries higher than 90%. The quantitative analysis of colistin and rifampicin was achieved by Multiple Reaction Monitoring (MRM). The calibration curves for each antibiotic using the appropriate transition and internal standard were established.

[1] *J. Cystic Fibrosis, 4, 2005, 35-40.*
[2] *Arch Pediatr. 7, 2000, 645-56.*

P-021

IDENTIFICATION OF MAJOR COMPOUNDS PRESENT IN DIFFERENT ORGANS OF *ROSA HYBRIDA* CV. 'JARDIN DE GRANVILLE' BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH TRIPLE QUADRUPOLE MASS SPECTROMETRY.

Ludivine Riffault[1], Émilie Destandau[1], Laure Pasquier[2], Patrice André[2], Claire Elfakir[1]

1 - Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, rue de Chartres 45067 Orléans cedex 2, France
2 - LVMH recherche, département Innovation Actifs, 185 avenue de Verdun, 45800 Saint-Jean-de-Braye, France

Rosa hybrida cultivar 'Jardin de Granville', a delicate white and clear pink flower, was selected by Parfums Christian Dior to enter in some cosmetic formulations. This *Rosa* cultivar has been selected not only for its beauty but also for its resistance to diseases. The goal of the study is to try to understand why it has those characteristics by analyzing and comparing to other *Rosa* cultivars its molecular content in order to underline specific markers, allowing it to be so singular.

Only some flavonols, anthocyanines and volatile molecules of Rosa flowers have been already identified by mass spectrometry and reported in literature[1,2,3]. Most of them concern *Rosa damascena* flowers, the most used rose in perfume industry. But the molecular content of the other parts of the plant remain not much studied, and the new cultivar 'Jardin de Granville' has never been investigated. In this way the content of winter wood, shoots, early buds, buds just before flowering, flowers and leaves of *Rosa hybrida* cv. 'Jardin de Granville' was evaluated using reversed phase HPLC technique coupled with DAD, ELSD, and ESI-QQQ mass spectrometry.

HPLC-DAD-ELSD analysis of microwave ethanolic extracts of the different parts of the plants showed chromatographic profiles quite similar, and the extracts were mainly constituted of polyphenols, with differences in pic's intensity showing the metabolites evolution in the plant during the growth. Extracts were then analyzed by HPLC-MS in order to identify the major compounds of the different organs. According to literature, kaempferol and quercetin glycosylated derivatives were identified.

HPLC-DAD-ELSD analysis of ethyl acetate extracts showed larger disparities between the different organs chromatograms and flowers seemed to have the higher diversity of molecules classes. In those extracts, more apolar compounds are detected and some of them could be carotenoids, but more precise identifications by HPLC-MS analysis have to be performed.

[1] *Cai et al (2005). Agricultural and food chemistry, 53 : 9940-9948.*
[2] *Kumar et al (2009). Food and Chemical Toxicology, 47 : 361-367.*
[3] *Rusanov et al (2011). Food Chemistry, 129 : 1851-1859.*

FRONTAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY AS MINIATURIZED METHOD FOR QUICK CHARACTERIZATION OF INHIBITORS OF TYROSINASE IN COMPLEX MIXTURES

Aleksander Salwiński[1], Raphaël Delépée[1], Benoît Maunit[1]

1 - Institute of Organic and Analytical Chemistry (ICOA), UMR 7311, University of Orléans, BP 6759 45067 Orléans cedex 2, France

Determination of enzyme-inhibitor or ligand-receptor binding affinity is of key importance in all projects dealing with synthesis of the new drug candidates or finding biologically active compounds in plants for cosmetics. Inhibitors of tyrosinase are attractive for the reason of their prospective application in the treatment of the symptoms of skin hyperpigmentation. Identification of natural biologically active compounds from plants is an important research domain of current pharmacognosy. In case of analysis of the plant extracts, an ideal methodology cannot be limited to detect the presence of ligand/inhibitor in the studied mixture, but should also point out which structure binds the target. Application of standard multiwall, plate-format enzymatic activity assays for detecting inhibitors of plant origin requires time-consuming fractionation of the extract and their applicability is limited for enzymes (reporter of enzymatic reaction required). Frontal affinity chromatography (FAC) was introduced in 1998 by the group of Schriemer[1] and is based on continuous infusion of the mixture of candidate compounds or plant extract to the column with immobilized protein target, to ensure protein-ligand equilibrium during the entire experiment[2,3]. Interacting ligand is retained in the chromatographic support comparing to the void volume marker. On the basis of the parameters of breakthrough points of curves for several concentrations of given ligand it is possible to calculate its dissociation constant. We miniaturized size of FAC-MS-compatible tyrosinase bioreactor to capillary format (ID: 100 µm) by developing porous silica monolith with binding capacity on the level of 4 µg of protein per functional capillary. The principles of FAC-MS as well as practical issues concerning the selection of appropriate enzyme support and the adjustment of the parameters of blank experiment will be discussed.

[1] *D.C. Schriemer, D. R. Bundle, L. Li, O. Hindsgaul, Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 3383-3387.*
[2] *L. Zhu, L. Chen, H. Luo, X. Xu, Anal. Chem. 2005, 77, 6125-6133.*
[3] *Enrica Calleri et al., J. Med. Chem. 2010, 53, 3489–3501.*

P-023

ETUDE DES FUMÉES INSPIRÉES ET EXPIRÉES ET DÉTERMINATION DE L'INFLUENCE DES PARAMÈTRES DE PRÉLÈVEMENT PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Sébastien Schramm[1], Vincent Carré[1], Jean-Luc Scheffler[2], Frédéric Aubriet[1]

1 - Laboratoire de chimie et physique des milieux complexes – Université de Lorraine
2 - Laboratoire d'analyses environnementales Eurofins/Ascal

Il est reconnu que la fumée de cigarette a une activité toxique notamment par l'action délétère directe ou indirecte des composés volatils ou semi-volatils. La phase particulaire n'a encore que peu été étudiée. Les particules inhalées restent piégées plus longuement dans le système respiratoire, les composés adsorbés à leur surface présentent donc un risque d'exposition sur une durée nettement plus longue que celui associé aux composés volatils. Néanmoins, une partie de la phase particulaire inhalée (MSS) est expirée (EXS).

Cette étude s'attache à déterminer et comparer, la composition de la matière particulaire à l'entrée et à la sortie du système respiratoire par désorption/ionisation laser couplé à la spectrométrie de masse à résonnance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier (LDI-FTICRMS). La simulation des bouffées avant le passage dans l'organisme est réalisée de manière standardisée par une machine à fumer dont les paramètres de prélèvement sont définis. Dans le cas des EXS, la mise en place d'une procédure normalisée est plus délicate du fait des variabilités de débit et de durée des bouffées imposés par le volontaire. L'effet de ces deux facteurs ainsi que celui du degré hygrométrique du tabac et de l'introduction d'air via le filtre de la cigarette sont estimés par la réalisation d'un plan d'expériences prenant pour réponses les concentrations en nicotine ainsi que celles en hydrocarbures aromatiques polycycliques. La technique de quantification choisie est la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Ces méthodes ont au préalable été validées. Il est ainsi possible de définir l'influence de ces quatre facteurs sur la prépondérance des processus pyrolytiques et du transfert de manière intacts de substances du tabac vers la fumée.

Ainsi, la forte influence du degré hygrométrique du tabac sur la concentration en nicotine dans les fumées a été mise en évidence. Au contraire, le débit et la durée des bouffées n'ont pas d'effet notable, ce qui nous permet de considérer une certaine reproductibilité du prélèvement des EXS, hypothèse confirmée par l'analyse des EXS provenant d'un second fumeur. La comparaison des analyses par LDI-FTICRMS des EXS et MSS montre de grandes différences sur la nature et la distribution des espèces détectées ainsi que sur leur degré d'aromaticité ce qui laisse supposer des échanges entre le milieu physiologique et la matière particulaire associée à la fumée de cigarette.

OPTIMIZATION OF THE ION PLASMA FORMATION IN A SWITCHABLE REAGENT IONS (SRI) PROTON TRANSFER REACTION-MASS SPECTROMETRY SYSTEM

Étienne Sémon[1], Xaviera Pennanec[1], Jean-Luc Le Quéré[1]

1 - INRA : UMR1324, CNRS : UMR6265, Université de Bourgogne - 17 rue Sully BP86510 21065 Dijon Cedex - France

Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS) is a powerful technique to analyses volatile organic compounds (VOCs). It can be used to measure real-time headspace composition of aroma solutions (*in vitro* conditions) or air flow expired by consumers during food eating (*in vivo* conditions).

PTR reactions mainly involve a proton transfer from the H_3O^+ ion to VOCs. The reaction occurs for all molecules M with a higher proton affinity than water (PA_{water} = 165.1 kcal.mol^{-1}), leading to MH^+ protonated ions with limited fragmentation. The Switchable Reagent Ions (SRI) system on the PTR-MS source[1] offers the opportunity to extend the capability of the technique by generating NO^+ or O_2^+ as other precursor ions. Ionization of compounds with a smaller PA than H_2O is then possible.

Ionization process between reagent ions and VOCs takes place in a drift tube. Changing drift tube parameters and more particularly the E/N ratio (E: the electric field strength and N: the buffer gas number density in the drift tube) can modify the ions plasma pattern. Thus unwanted precursor ions or reagent ion clusters formation may be filtered out. In such case VOCs unexpected ionization pathways or fragmentation may be impeded.

In this work ion plasma compositions have been compared in terms of ions relative abundance *vs.* precursor ions (H_3O^+, NO^+ and O_2^+) and drift tube parameters. The results clearly show that optimizing reagent ion formation is crucial previously to any flavour compound analysis.

[1] *http://www.ionicon.com/*

3-[5'-(METHYLTHIO)-2,2'-BITHIOPHEN-5-YLTHIO]PROPANENITRILE: A NEW MATRIX MOLECULE FOR THE SELECTIVE DETECTION OF ALKALOIDS IN MALDI-TOF

Ghislain Tsague Kenfack[1], Andreas Schinkovitz[2], Denis Seraphin[2], Marylène Dias[1], Pascal Richomme[2], Éric Levillain[1]

1 - Université d'Angers-CNRS, Laboratoire MOLTECH Anjou, UMR-6200 CNRS
2 - Université d'Angers, Laboratoire SONAS, IFR 149 QUASAV

The MALDI[1] (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization) is a powerful analytical technique using matrices molecules which can absorb the laser energy and use it to ionize the sample. Therefore, these matrices help to protect the sample against laser radiation, minimizing the formation of fragmentation and dimerization products. Further some matrices may show substrate specificity, another crucial feature, which allows the selective detection of target molecules by MALDI-MS. Thus, sinapinic acid (SA) is generally used for studies of polar synthetic polymers[2], whereas 1,8-dihydroxy-9,10-dihydroanthracen-9-one (dithranol) is well suited to non-polar synthetic polymers. Moreover, 2,4,6-trihydroxy acetophenone (THAP) and 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) are often used to study oligonucleotides[3], while α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) as well as 2,5-dihydroxybenzoïque[4] (DHB) are used for the analysis of peptides and carbohydrates.

However, only few matrices suited for analysis of secondary metabolites are reported, while these last ones represent an important source of actives compounds, with pharmaceutical properties. Thus, when studying the behaviour of bithiophenic derivatives as MALDI matrix, the 3-[5'-(methylthio)-2,2'-bithiophen-5-ylthio]propanenitrile was identified as a powerful and specific matrix for the detection of alkaloids. That new bithiophenic matrix has been evaluated on almost fifty six compounds belonging to various chemical families. Results were compared with those obtained using commercial matrices such as 2,2':5',2''-terthiophene, dithranol, HCCA or DHB in the same conditions (concentration, ratio matrix/analyte, laser power…). Overall, the 3-[5'-(methylthio)-2,2'-bithiophen-5-ylthio]propanenitrile enhance selectively ionization of alkaloids and yielded high qualities spectrum at low laser energy (10% = 15.6 μJ).

[1] *K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, T. Yoshida, Rapid Commun Mass Spectrom. 1988, 2, 151-153.*
[2] *R. S. Lehrle, D. S. Sarson. Polymer Degradation and Stability. 1996, 51, 197-204.*
[3] *J. M. Asara, J. Allison. Anal. Chem. 1999, 71, 2866-2870.*
[4] *W. Sun, S. Liu, Z.-Liu, F. Song, S. Fang. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1998, 12, 821–824.*



Méthodes Quantitatives

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE DE COMPLEXES HYDROXYALKÉNALS-PROTÉINES ET D'HYDROXYALKÉNALS LIBRES PAR GC-MS/MS

Angélique Abila[1], Céline Cossoul[1], Charlotte Joly[2], Mylène Gobert[3], Blandine Comte[4], Denys Durand[1], **Estelle Pujos-Guillot**[2]

1 - INRA, UMR 1213, Herbivores, F-63122, Saint Genès Champanelle, France
2 - INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Nutrition Humaine, F-63122, Saint Genès Champanelle, France ; Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, F-63000, Clermont-Ferrand, France
3 - INRA, UR 370, Qualité des Produits Animaux, F-63122, Saint Genès Champanelle, France
4 - INRA, UMR 1019, Nutrition Humaine, F-63122 Saint Genès Champanelle, France ; Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, B.P. 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Les hydroxyalkénals tels que le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) et le 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) sont issus de la lipoperoxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) respectivement de type n-6 et n-3. Ces aldéhydes peuvent exister *in vivo* sous forme libre ou, étant très réactifs, peuvent s'adduire par exemple aux protéines. De par leur liaison, principalement avec le groupement thiol de la cystéine des protéines, les hydroxyalkénals induisent l'altération des protéines et sont soupçonnés être à l'origine de la promotion du cancer colorectal. Dans ce cadre, il est nécessaire de doser les hydroxyalkénals dans différentes matrices afin de rendre compte de l'avancée de la lipoperoxydation qui peut être réduite par l'ingestion d'antioxydants. HHE et HNE étant minoritaires dans les différentes matrices étudiées, une méthode d'extraction et d'analyse par GC-MS/MS de ces composés a été développée.

Ce travail a donc consisté à optimiser un protocole d'extraction en trois étapes de ces aldéhydes. Tout d'abord a lieu une réduction en alcools primaires, respectivement le dihydroxyhexane (DHH) et le dihydroxynonane (DHN), pour obtenir des molécules plus stables ; s'ensuit un clivage de la liaison protéique (pour les liés) ou de la double liaison carbone-carbone (pour les libres) pour récolter seulement l'alcool d'intérêt. Enfin, une étape de sylilation a été menée préalablement à l'analyse par GC-MS/MS. La séparation a été réalisée sur une colonne capillaire HP-5MS (50 m x 0,2 mm x 0,33 µm) avec un débit d'hélium de 0,7 mL/min. Un spectromètre de masse de type triple quadripôle équipé d'une source d'ionisation chimique a été utilisé. L'ionisation a été effectuée en mode positif avec comme gaz d'ionisation l'isobutane. L'acquisition des données a été réalisée en mode MRM pour la détection des formes DHH et DHN (produits de HHE et HNE libres et liés). L'utilisation comme standard interne du DHN-d11 a permis de s'affranchir de biais possibles de l'extraction et de l'analyse en GC-MS/MS. Le marquage au deutérium pendant la réduction a facilité la distinction entre les molécules dosées et les formes DHH et DHN existantes sous forme endogène.

La méthode d'analyse développée a été validée, incluant la préparation d'échantillon. Elle a été appliquée à des études dans le but d'évaluer l'efficacité des antioxydants sur la diminution de la lipoperoxydation par la mesure de la quantité d'hydroxyalkénals obtenus.

P-027

QUANTIFICATION DE 5 ISOFORMES DE CYTOCHROME P450 DANS LE FOIE HUMAIN PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN COUPLAGE CHROMATOGRAPHIQUE

Ahmad Al Ali[1,2], David Touboul[1], Jean-Pierre Le Caër[1], Isabelle Schmitz-Afonso[1], Jean-Pierre Flinois[2], Catherine Marchetti[2], Hélène Gondelle[2], Isabelle De Waziers[2], Marie-Anne Loriot[2], Alain Brunelle[1], Olivier Laprévote[3], Philippe Beaune[2]

1 - Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France
2 - Bases Moléculaires de la réponse aux xénobiotiques, INSERM UMR-S775, Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saint Pères, 75270 Paris Cedex 06, France
3 - Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Le métabolisme hépatique est un facteur clé déterminant les différences interindividuelles dans la pharmacocinétique des médicaments. Après avoir été absorbés, les médicaments subissent une biotransformation par des enzymes intracellulaires tels que les cytochromes P450 (CYPs) qui participent de façon centrale à l'élimination des xénobiotiques et dans certains cas à la production de métabolites toxiques et/ou réactifs. Compte tenu de leurs réactivités spécifiques, il est très important d'être capable de doser individuellement les CYPs avec précision, ce qui est rendu délicat par leurs similitudes de séquences.

Les CYPs sont en général quantifiés par amplification de gènes (PCR) ou immuno-marquage mais ces méthodes fournissent soit une information indirecte (quantité d'ANR messager), soit une information avec les limites inhérentes aux dosages immunologiques. Pour surmonter ces problèmes, nous avons développé une méthode MRM (LC-MS/MS) fondée sur la quantification de peptides protéotypiques, méthode indépendante des anticorps.

Le but de la présente étude est de déterminer le niveau d'expression de protéines de 5 isoformes principales: 3A4, 3A5, 2D6, 1A2 et 2J2 mitochondriales et microsomales dans 25 biopsies hépatiques humaines, et de les comparer avec les niveaux d'expression d'ARNm, les dosages des CYPs par western blots et des activités fonctionnelles afin d'évaluer la pertinence des quatre mesures en tant que paramètres du métabolisme hépatique.

Cette méthode de quantification des protéines peut fournir de précieuses données sur les niveaux absolus d'expression des protéines métabolisant les médicaments et cela devrait conduire à une meilleure compréhension du métabolisme hépatique des médicaments ; elle pourrait ensuite être appliquée à d'autres tissus (cerveau par exemple).

METHOD OF AMINO ACID ANALYSIS BY GC-MS AFTER DERIVATIZATION BY SILYLATION WITH MTBSTFA

Marylène Bertrand[1], **Frances Westall**[1]

1 - Centre de Biophysique moléculaire, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2

In this study, a derivatization method for the analysis of amino acids using the silylating agent MTBSTFA (N-methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide) has been developed. Derivatization allows the functionalization of the amine and carboxylic groups, thus leading to a decrease in the temperatures needed for analysis by gas chromatography.

The GC-MS procedure, fragmentation patterns, and the characteristic fragmented ions of each amino acid are described.

It was found that MTBSTFA-derivates produce characteristic fragmentation patterns presenting mainly the $[M-57]^+$ and $[M-159]^+$ fragments, of which $[M-159]^+$ is generally dominant in the mass spectra.

Some validation parameters of analytical methods are given. Tests on linearity, precision, and accuracy were performed.

A major advantage of the present derivatization method combined with GC–MS in SIM mode analysis is the selective and sensitive detection of the amino acids. This simple, rapid and accurate derivatization procedure is suitable for routine analysis.

P-029

IMPROVED RETENTION TIME ROBUSTNESS, DWELL TIME AND CYCLE TIME IN MRM ASSAYS

David Cox[1], Gordana Ivosev[1], Nic Bloomfield[1], Thomas Abbott[2], Christopher Colangelo[2], **Cécile Busset**[3]

1 - AB Sciex, Concord, CANADA
2 - Yale University, New Haven, CT
3 - AB Sciex, Les Ulis, France

Novel Aspect: Improvements to MRM acquisition to enable significantly more compounds in a single assay.

Introduction

With the introduction of scheduling to MRM assays several years ago, the number of compounds / pesticides / peptides that can be monitored in a single assay has greatly increased. As multiplexing pushes higher, these experiments are challenged by the fact that different compounds have different peak widths, different RT stabilities, and different intensities. Having more intelligence built into the MRM scheduling acquisition logic can greatly improve results quality and assay robustness. Here, we evaluate the impact of several improvements to the scheduling of MRM transitions.

Methods

Existing pesticide and protein assays were converted using Excel and imported in to a research version of Analyst® software that was modified to enable the new acquisition features. Samples were analyzed using a QTRAP® 5500 system and data was reviewed in PeakView™ software or MultiQuant™ software. Results were analyzed for their quantitative reproducibility and quality.

Preliminary Data

Retention time robustness was improved by giving wider scheduling windows to only those compounds that displayed broad LC peaks or had large variation in their retention times. A more elegant solution was enabled by extending scheduled windows at run time, but only for transitions that had a signal above a predetermined threshold. For compounds not present in the sample, or compounds that had no shift in retention time, no window extension would occur. This allowed smaller windows to be used, but still capture the tail of each LC peak and be robust to most shifts in retention time. The simplest technique to improve signal to noise was by enabling variable dwell times. Another technique to improve the quantitation results of a scheduling experiment is to extend the number of MRM (xMRM) associated with a compound. Designated primary MRM are monitored throughout their entire scheduled window, while secondary MRM for this compound are only monitored if the primary MRM go above a threshold. This reduced the number of MRM being monitored at any given time, improving dwell time by 2x while decreasing cycle time. The triggered xMRM transitions were used to obtain quantitative results. For a typical pesticide screening assay, the triggered xMRM transitions were used to as ratio ions. The area measured for these ratio ions was within 1% of the same assay run without xMRM. Although it is possible to use triggered xMRM transition to create false spectra for database and library searching, it is better to use full scan product ion spectra for highest confidence. MS/MS data was only triggered when an entire group of MRM transitions, related to a compound /peptide went above a pre-determined threshold, reducing the number of false triggers, while still providing all the full scan MS/MS information for evaluating identification or interference.

SUIVI DU V, Ni, Fe ET S DURANT LA DISTILLATION DE PÉTROLE BRUT PAR CHROMATOGRAPHIE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE (GPC ICP HR MS)

Alain Desprez[1,2,3], Brice Bouyssière[1], Gabriel Krier[2], Pierre Giusti[3]

1 - LCABIE, UMR 5254, CNRS-UPPA, Hélioparc, 2 av. Pr. Angot, 64053 Pau, France
2 - LCP-A2MC, Université de Lorraine, 1 bd Arago, Technopôle Metz 2000, 57070 Metz, France
3 - TOTAL Raffinage Chimie Normandie, Cert, BP 27 76700 Harfleur

Le pétrole est une matrice organique complexe qui contient des molécules allant des alcanes les plus simples aux composés polyaromatiques hétéroatomiques de haut poids moléculaire. Ces pétroles peuvent parfois contenir des concentrations en métaux et en soufre atteignant plusieurs centaines de $mg.kg^{-1}$. Les principaux métaux rencontrés sont le vanadium, le nickel et le fer. Ces métaux étant des poisons pour les catalyseurs utilisés lors du raffinage du pétrole brut, il est nécessaire de connaitre la concentration de ces métaux ainsi que les molécules les complexant.

La spectrométrie de masse à couplage inductif à haute résolution (ICP HR MS) permet l'analyse élémentaire des produits pétroliers. La haute résolution permet de s'affranchir des interférences polyatomiques sur les différents éléments étudiés. Un système de micro nébulisation à consommation totale règle le problème de stabilité de la source d'ionisation à plasma induit lors des analyses de matrices organiques et évite les pertes et ségrégations provoquées par le drain d'un nébuliseur classique.

Le couplage avec trois colonnes de chromatographie à perméation de gel (GPC) permet la séparation en taille des molécules constitutives du produit pétrolier analysé et son couplage avec un ICP HR MS permet d'accéder à la taille des complexes avec le nickel, le vanadium ou le fer. Ce travail présentera les résultats sur la répartition en taille du vanadium, du nickel, du fer et du soufre dans des coupes de distillation (essence lourde, kérosène, gazole, RAT, RSV, VGO) de 4 pétroles bruts différents.

P-031

DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE DE RÉFÉRENCE POUR LE DOSAGE DU CHOLESTÉROL TOTAL ET APPLICATION AU CONTRÔLE QUALITÉ EN BIOLOGIE CLINIQUE

Maud Heuillet[1], **Vincent Delatour**[1], Maryline Peignaux[1], Béatrice Lalere[1], Jacques De Graeve[2], Gilles Dumont[3], Sophie Vaslin-Reimann[1], Laurence Duvillard[4]

1 - LNE - Département « Biomédical et chimie organique »
2 - ANSM - Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
3 - CTCB - Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique
4 - IFR 100 - Biochimie Médicale, Plateau Technique de Biologie

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde avec plus de 17 millions de décès par an. Elles sont essentiellement dues à un excès de cholestérol dont l'accumulation dans les vaisseaux sanguins peut entraîner des complications telles que l'infarctus du myocarde ou des accidents vasculaires cérébraux. Comme le dosage du cholestérol constitue une des analyses les plus fréquemment pratiquées dans les laboratoires de biologie médicale afin d'évaluer le risque lipidique d'athérosclérose, le LNE a développé une méthode de référence primaire pour le dosage de ce composé afin d'évaluer la fiabilité des mesures réalisées dans les laboratoires de biologie médicale. La méthode retenue repose sur la dilution isotopique associée à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (ID-GC/MS). Une analyse détaillée des incertitudes de mesure a permis d'identifier et optimiser les étapes du protocole qui contribuent le plus au budget d'incertitudes. La justesse de la méthode a été évaluée en analysant le matériau de référence certifié du NIST (NIST SRM 1951b), qui se compose de deux lots de sérum humain congelé couvrant la gamme de concentrations ayant un intérêt clinique. Une fois validée, la méthode a permis d'assigner des valeurs de référence à différents échantillons de contrôle de la qualité tels que ceux utilisés dans le cadre du contrôle national de qualité organisé par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), et ceux utilisés dans les essais d'aptitude volontaires organisés par le CTCB (Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique). L'analyse des résultats obtenus suggère que les échantillons de contrôle qualité peuvent être sujets à des effets de matrice plus ou moins importants qui sont susceptibles de fausser l'interprétation des résultats. Enfin, la méthode de référence est actuellement utilisée pour certifier la concentration en cholestérol total d'un matériau de référence en cours de production par le LNE. Celui-ci permettra non seulement d'étalonner les automates utilisés en routine dans les laboratoires de biologie médicale mais aussi de contrôler leur justesse.

ENJEUX DE LA MESURE PAR DES MÉTHODES PRIMAIRES DILUTION ISOTOPIQUE / SPECTROMÉTRIE DE MASSE POUR ACQUÉRIR DES MESURES ENVIRONNEMMENTALES DE QUALITÉ

Béatrice Lalere[1], **Sophie Lardy-Fontan**[1], Julie Cabillic[1], Fanny Gantois[1], Véronique Lediouron[1], Maryline Peignaux[1], Sophie Vaslin-Reimann[1]

1 - LNE LABORATOIRE NATIONAL DE METROLOGIE ET D'ESSAIS

La surveillance, la protection et la prévention de l'environnement sont devenues un des enjeux majeurs des politiques publiques nationales et internationales et une des préoccupations majeures des citoyens. Parce que l'ensemble de ces systèmes décisionnels est basé sur la donnée, un poids considérable est posé sur la qualité de la mesure. La qualité de la mesure implique de disposer de mesures fiables (justes et fidèles) et comparables (traçables et avec un niveau d'incertitudes connu et maîtrisé) et, est donc très lié aux principes de la métrologique chimique et par voie de conséquence à la chimie analytique dans ses concepts et dans les outils qu'elle met en œuvre.

Toutes les méthodes ne sont pas équivalentes surtout si l'on considère les niveaux de concentrations des polluants associés à la complexité des matrices à prendre en compte. Parmi toutes les méthodes disponibles, la dilution isotopique-spectrométrie de masse DI-MS, dont le coût de mise en œuvre est bien trop souvent incriminé, est unanimement reconnue comme étant la méthode de plus haute qualité métrologique. Elle est d'ailleurs reconnue comme la méthode primaire de référence dans le domaine de la métrologie chimique.

Au travers de différents exemples pratiques concernant l'analyse de polluants environnementaux clés (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, pesticides, *etc.*) au sein de matrices représentatives (eaux, air, matières solides), le travail présenté illustrera comment les principes de la dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse permettent d'aboutir à l'obtention de mesures de haute qualité métrologique. Plus largement, ce travail présentera certains verrous et leviers liés à sa mise en œuvre pratique et comment certains de ces points : choix des étalons, méthode de supplémentation des matrices, choix des étalonnages, *etc.* sont susceptibles d'impacter les données de mesure.

P-033

FIABILISATION DES ANALYSES QUANTITATIVES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE-SPECTROMÉTRIE DE MASSE

ENJEUX DE L'ÉTALONNAGE ET DE LA MÉTHODE DE QUANTIFICATION

DÉMONSTRATION À L'ANALYSE MULTIRÉSIDUS DE PESTICIDES À L'ÉTAT D'ULTRA-TRACES DANS LES MATRICES ENVIRONNEMENTALES

Sophie Lardy-Fontan[1], Béatrice Lalere[1], Véronique Le Diouron[1], Sophie Vaslin-Reimann[1]

1 - LNE LABORATOIRE NATIONAL DE METROLOGIE ET D'ESSAIS

Afin de préserver l'environnement et de garantir la sécurité alimentaire des consommateurs, un important arsenal législatif et réglementaire a été mis en place, au niveau européen et national et se traduit par la mise en place de valeurs seuils, représentant de très faibles concentrations pour de nombreux contaminants. Il est donc devenu nécessaire de développer des méthodes analytiques capables de détecter et de quantifier ces molécules à de telles teneurs et cela dans un domaine très concurrentiel. Les enjeux de la fiabilité des données de mesure est au cœur des exigences réglementaires : accréditation des laboratoires ISO 17025, restitution des données de surveillance des milieux respectant la directive QA/QC (2009), démarche de priorisation, établissement de tendances…

Parmi les milliers de cibles pertinentes, la présente étude se concentre sur les pesticides. En effet, la démonstration d'une contamination généralisée de l'environnement n'est plus à faire et, au regard de leurs potentiels toxiques, conforte l'idée qu'ils constituent une préoccupation majeure. En réponse à ce pressant enjeu de besoin d'informations «rapides» et «à meilleur coût» alors que la diversité des cibles analytiques en terme de propriétés physico-chimiques est très importante, les approches dites multirésidus se sont généralisées notamment en chromatographie en phase liquide-électrospray-spectrométrie de masse LC-ESI-MS^n. Parce que les couplages LC-ESI-MS^n sont connus pour leur caractère «versatile», la fiabilité des mesures obtenues est, dans bien des cas, remise en cause.

Au travers du développement d'une méthode d'analyse multirésidus de 27 résidus phyto-pharmaceutiques appartenant à 13 classes différentes dans des matrices environnementales par dilution isotopique associée à la LC-ESI-MS^2 (DI-LC-MS^2), le travail illustre l'importance du choix et de l'évaluation de la méthode d'étalonnage et de la méthode de quantification sur la fidélité des données de mesure. Le travail démontre en quoi le principe de la DI-MS, bien que souvent jugé trop lourd et onéreux à mettre en œuvre, est l'approche la plus appropriée pour réaliser des mesures répondant à des exigences élevées en termes de fidélité. Il souligne également que, dès lors que les principes de la DI-MS ne sont pas applicables, l'étalonnage interne peut conduire à des mesures plus ou moins précises selon les composés et la validation du choix de l'étalon.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF IMPURITIES IN DRUG SUBSTANCES (DS) AT TRACE LEVEL BY LC/MS(/MS) USING HIGH RESOLUTION *VS* TRIPLE QUADRIPOLE MASS SPECTROMETERS

Nathalie Mesplet[1]

1 - Sanofi, 45 chemin de Météline, 04200 Sisteron

Mass spectrometers are part of state-of-the art analytical devices and are usually dedicated either to structural (qualitative) analysis or quantitative analysis.

Quantification of impurities at trace level in Active Pharmaceutical Ingredients (*e.g.* genotoxic impurities) is generally performed on a triple quadripole (TQ) mass spectrometer. High resolution mass spectrometry (HRMS) is an innovative and alternative way for simultaneous qualitative and quantitative analysis. Limits of detection are generally equal or higher on HRMS than on TQ but HRMS enables to track out unknown impurities after data reprocessing using mass accuracy.

P-035

DEVELOPMENT OF A NOVEL METHOD FOR STEROLS AND OXYSTEROLS QUANTIFICATION BY UPLC-ESI-HRMS: APPLICATION TO A NEUROINFLAMMATION RAT MODEL

Anne Regazzetti[1], **Delphine Dargère**[1], Sophie Ayciriex[1], Mathieu Gaudin[1,2], France Massicot[1], **Nicolas Auzeil**[1], **Olivier Laprévote**[1,3]

1 - Faculté de Pharmacie - Université Paris Descartes, Sobonne Paris Cité (C-TAC)
2 - Division Métabolisme, Technologie Servier, Orléans
3 - Service de Toxicologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Paris

In the sporadic form of Alzheimer's disease (AD), age and allele 4 ε of apolipoprotein E are the major known risk factors. Hypercholesterolemia also seems to be involved in AD. Indeed, cholesterol influences several processes implied in the formation of neuritic plaques and neurofibrillary structures. Moreover, changes in cholesterol and its oxidized metabolites homeostasis arise to play a role in the process of neurodegeneration in AD. Taken into account the role of chronic neuroinflammation in AD, we proposed a murine model of neuroinflammation, using chronic injections of lipopolysaccharide (LPS). In this context, we developed a new method for the quantification of cholesterol and its oxidized metabolites using ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (UPLC-ESI-HRMS). The proposed method involves the derivatization of sterols and oxysterols in carbamates to improve their detection by ESI-MS. The optimized chromatographic conditions enable the separation of a mixture containing 11 sterols and oxysterols carbamate derivatives within 6 minutes. The method validation, including specificity, stability, precision, accuracy, reproducibility and recovery was performed according to FDA. This method, which allows quantification of sterols in biological sample on the order of femtogramme, was used to assess changes in sterols and oxysterols concentrations in cortex and hippocampus of LPS-treated rats and controls. LPS treatment specifically induces increase in 7deOHC, cholestanol and desmosterol in hippocampus. The aforementioned cholesterol precursors are considered as markers of cholesterol synthesis. Moreover, 25OHC was decreased in the cortex following LPS treatment.

DOSAGE PAR HILIC-MS/MS DES SUCRES AMINÉS DANS *ESCHERICHIA COLI*

Isabelle Schmitz-Afonso[1], Violaine Chapuis[1], Isabelle Gaugué[2], Jacqueline Plumbridge[2], David Touboul[1], Philippe Durand[1], Alain Brunelle[1], Bernard Badet[1]

1 - Centre de recherches de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France
2 - Sorbonne Paris Cité, Institut de Biologie Physico-Chimique, 13, rue Pierre et Marie Curie, 75 005 Paris, France

La métabolomique a pour objectif l'analyse qualitative et quantitative de tous les métabolites présents dans des échantillons cellulaires, fluides biologiques ou tissus. Cette connaissance permet de progresser dans la compréhension des mécanismes cellulaires. Pour mieux interpréter les données *in vivo* sur le métabolisme des hexosamines chez les microorganismes, en particulier chez la bactérie modèle *E. coli*[1,2], une méthode de quantification a été développée pour des sucres aminés phosphatés et/ou acétylés de la glucosamine.

Les méthodes de choix pour la séparation de petits métabolites polaires sont la chromatographie en phase liquide en mode d'appariement d'ions[3] ou la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC)[4,5]. La première nécessite l'utilisation d'agents comme la tributylamine qui polluent les systèmes analytiques et conduisent à des pertes en sensibilité au cours du temps. Nous nous sommes donc orientés vers la seconde méthode, plus prometteuse dans la séparation des isomères phosphatés de la glucosamine. Ce mode de chromatographie permet l'élution de composés avec une large gamme de polarité, à un pH adapté à chaque famille de composés à séparer.

Une phase stationnaire de type aminopropyle et une élution par un mélange d'acétonitrile et de tampon ont été sélectionnées. Après optimisation du tampon (composition, pH), de la température et du débit, cette méthode a permis la séparation d'un mélange de N-acétyl-glusocamine-1-phosphate, de N-acétylglucosamine-6-phosphate, de glucose-1-phosphate et de glucose-6-phosphate. L'analyse et la quantification du mélange sont obtenues par un couplage LC-MS/MS avec un analyseur triple quadripolaire. Les composés d'intérêt sont ionisés en mode électrospray. Les deux modes d'ionisation, positif et négatif, ont été comparés et les transitions SRM optimisées. La méthode de dosage avec étalonnage interne a été validée en termes de répétabilité (coefficient de variation < 13% pour n=5), linéarité et limites de quantification (de l'ordre de 7 pmol injectés). Le mode HILIC étant très sensible aux faibles variations de composition de l'échantillon en termes de sels, de pH et de solvant de dilution, la maitrise de l'échantillon biologique se révèle un élément déterminant.

[1] *Plumbridge J., J Bacteriol. 191 (18) (2009), 5641-5647.*
[2] *Alvarez-Añorve LI, Bustos-Jaimes I, Calcagno ML, Plumbridge J., J Bacteriol. 191(20) (2009), 6401-6407.*
[3] *Buescher JM, Moco S, Sauer U, Zamboni N, Analytical Chemistry, 82 (2010) 4403-4412.*
[4] *Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD, Journal of Chromatography A, 1125 (2006), 76-88.*
[5] *Preinerstofer B, Schiesel S, Lammerhofer M, Lindner W, Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 312-328.*



Interactions Non-Covalentes

ANALYSE DES ANIONS PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN MODE POSITIF : ÉTUDE DE LEUR COMPLEXATION PAR DES LIGANDS DICATIONIQUES

Christophe Chendo[1], Momar Touré[2], Olivier Chuzel[2], Jean-Luc Parrain[2], Laurence Charles[3]

1 - Fédération des Sciences Chimiques-FR 1739, Spectropole - Aix-Marseille Université - CNRS, Marseille
2 - Institut des Sciences Moléculaires de Marseille - Équipe STÉRÉO - UMR7313, Aix-Marseille Université - CNRS, Marseille
3 - Institut de Chimie Radicalaire - Équipe SACS - UMR6264, Aix-Marseille Université - CNRS, Marseille

L'analyse des anions par spectrométrie de masse est usuellement effectuée en mode d'ionisation négatif puisque ces espèces sont chargées négativement. Cependant, l'ionisation électrospray en mode négatif se heurte à certaines limitations. Les analytes très polaires se concentrent souvent au centre des gouttelettes électrospray[1], ce qui affecte leur rendement d'ionisation. De plus, les anions de faible masse donnent lieu à des signaux dans une zone du spectre de masse où le bruit de fond chimique peut être assez élevé. Par ailleurs, l'opération d'une source électrospray en mode négatif peut donner lieu à des décharges corona qui déstabilisent l'aérosol. A l'inverse, le mode d'ionisation positif n'est pas sujet à la plupart de ces inconvénients et procure généralement une meilleure sensibilité. Dans ce cadre, une approche consistant à complexer des anions avec des ligands doublement chargés positivement pour former des espèces retenant une charge positive a été récemment proposée[2,3].

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité de ligands cycliques multichargés à complexer une série d'anions, notamment les halogénures. Les affinités relatives des anions vis-à-vis des ligands ont été établies en MS après ionisation électrospray de mélanges équimolaires. La dissociation induite par collision des différents complexes a été étudiée par spectrométrie de masse en tandem et leur analyse conformationnelle a été effectuée par mobilité ionique. Les premiers résultats obtenus montrent que, dès lors que leur taille le permet, certains anions seraient insérés au sein du ligand cyclique.

[1] *CG Enke Anal. Chem. 1997, 69, 4885.*
[2] *RJ Soukup-Hein, JW Remsburg, PK Dasgupta, DW Armstrong Anal. Chem. 2007, 79, 7346.*
[3] *E Dodbiba, C Xu, T Payagala, E Wanigasekara, MH Moon, DW Armstrong Analyst 2001, 136, 1586.*

P-038

EVALUATION OF SHEATHLESS CAPILLARY ELECTROPHORESIS AS AN INFUSION PLATFORM FOR THE NANOESI STUDY OF INTACT PROTEINS AND NON-COVALENT COMPLEXES

Yannis-Nicolas François[1], **Rabah Gahoual**[1], Jean-Marc Busnel[2], Emmanuelle Leize-Wagner[1]

1 - Laboratoire de Dynamique et Structure Moléculaire par Spectrométrie de Masse (LDSM2), CNRS – UMR7177, University of Strasbourg, Strasbourg
2 - Beckman Coulter Inc., Brea, Californie, États-Unis

In 1994, M. Mann and M. Wilm caused a true revolution with the development of the nanoelectrospray ion source[1,2]. As compared to the conventional electrospray source, flowrate reduction allows a significant enhancement of the sensitivity. Nevertheless, problems of robustness were noted and somehow hindered a wide applicability of the nanoESI concept. Indeed, aqueous medium and presence of salt may cause loss of sensitivity and spray instability. Here, we have evaluated the suitability of a sheathless capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry (CESI-MS) platform with a porous tip as the nanoelectrospray emitter to analyze with high sensitivity intact proteins and non-covalent complexes.

In a first step, a systematic study of the ionization profile of an intact protein (Myoglobin) has been realized to evaluate the robustness and the enhancement of sensitivity provided by the use of CESI-MS as a nanoelectrospray infusion platform. In a second step, AdR/AdX complexes were analyzed by mass spectrometry under denaturing conditions. Adrenodoxin (AdX) is an iron-sulphur protein involved in the electron transfer from adrenodoxin reductase (AdR) to cytochromes P. In a third step, the complexes were analyzed under native conditions in order to preserve and further study all potential non-covalent interactions. Finally, thermodynamic titrations followed by mass spectrometry have been performed for AdR/AdX complex.

The ultimate aim of this project is to take advantage of the CESI-MS capabilities for the study of high molecular mass protein complexes which are only available in scarce amounts *in vivo*. For this study, native hemocyanin from the deep sea crab *Carcinus maenas* have been analyzed. Hemocyanin, the crustacean respiratory pigment responsible for O_2-transport, exists as hexamers, dodecamers and 18-mers of 75 kDa subunits.

[1] *Wilm M. S. and Mann M., "Electrospray and Taylor-cone theory, Doles beam of macromolecules at last" International Journal of Mass Spectrometry 1994, 136(2-3), 167-180.*
[2] *Wilm M. and Mann M., B. "Analytical properties of the nanoelectrospray ion source." Analytical Chemistry 1996, 68(1): 1-8.*

DISSECTION OF FACTORS AFFECTING GAS-PHASE DISSOCIATION THROUGH ACCURATE DETERMINATION OF LOW AFFINITY PROTEIN-LIGAND K_D BY DIRECT ESI-MS

Lucie Jaquillard[1], Martine Cadène[1]

1 - Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, rue Charles-Sadron, F-45071 Orléans Cedex 2, France.

Most of the cell functions that endow organisms with sustainable life rely on the interaction of a protein with ligands. The protein–ligand equilibrium dissociation constant K_D is an essential parameter used to provide relative affinity information between ligands. Direct complex measurement by ESI-MS has gained interest as a rapid and sensitive tool to derive K_D constants. However, the bound fraction measured in the gas phase reflects not only the solution-binding fraction, but also phenomena related to the transfer of the complex into the gas-phase which generate issues in the measurement of K_D. To address these issues, which are compounded in the case of low affinity systems, and to start dissecting gas-phase dissociation (GPD), we have devised an integrated method.

The complex between a protein and its ligand or protein partner is formed in solution. An optimized protocol for the elimination of the excess ligand using micro-gel-filtration is applied immediately *prior* to ESI-MS analysis. This step serves to control gas-phase aggregation. A mathematical treatment is applied to the fractional binding MS data to account for GPD as well as dissociation resulting from the micro-desalting in low-affinity systems.

Previously, we developed a rational mathematical correction of GPD (f_{sat}), which is combined with an appropriate experimental protocol to deal with gas-phase aggregation. Complexes can follow three types of behaviors after the micro-gel-filtration step and mathematical developments have been described for each case[1]. As a first step towards a fine dissection of factors affecting GPD, the influence on f_{sat} of the type of molecular interactions in the complex, of the ionic strength, and of the instrumental setup have been examined.

GPD seems to depend directly on the type of molecular interactions in the complex. In the case of specific interactions, the ionic strength, *i.e.* the buffer concentration, has non-monotonous effects on f_{sat} and on the affinity, and the variations of these two parameters are not strictly correlated with each other. A key instrumental parameter, the cone voltage, can be used to force GPD, and its influence on K_D and f_{sat} were also measured.

We propose a tentative expression for f_{sat} reflecting the fact that GPD results from multiple dissociation micro-events, which occur both on simultaneous and successive temporal scales.

This direct ESI-MS K_D measurement method provides tools to get insight into factors affecting GPD.

[1] *Jaquillard, L., Saab, F., Schoentgen, F., and Cadene, M. (2012) Improved accuracy of low affinity protein-ligand equilibrium dissociation constants directly determined by electrospray ionization mass spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 23, 908–922.*

P-040

CHARACTERIZING PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS OF SPHINGOLIPID SIGNALING COMPONENTS

Nicolas Lebesgue[1,2], Arjen Scholten[1,2], Joost C.M. Holthuis[3], Albert J.R. Heck[1,2]

1 - Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics, Bijvoet Center for Biomolecular Research and Utrecht Institute of Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands
2 - Netherlands Proteomics Center, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands
3 - Membrane Enzymology, Bijvoet Center and Institute of Biomembranes, Utrecht University, 3584 CH Utrecht, The Netherlands

Sphingolipids are structural components of cell membranes. In addition, they are bioactive signaling molecules implicated in cell growth, apoptosis, differentiation and senescence. In yeast, but also in mammalian cells, the first and rate-limiting step in sphingolipid metabolism is initiated in the endoplasmatic reticulum (ER) by serine palmitoyl transferase (SPT). Recently, Orm proteins were identified as negative regulators of this enzyme. Affinity purification coupled to mass spectrometry revealed that the ER membrane proteins Orm1 and Orm2 form a conserved complex with SPT, Sac1 (a phosphoinositide phosphatase) and Tsc3 (a SPT-regulating protein), referred to as the SPOTS complex[1]. To retain protein-protein interactions, these experiments were performed under native conditions, which are often sub-optimal when membrane bound protein complexes are investigated. In such approaches detergents are essential to liberate membrane proteins, but they also disrupt protein-protein interactions. To overcome such challenges and lengthy optimization procedures Puts *et al.* developed a Tandem Affinity Purification (TAP) protocol combined with *in vivo* cross-linking as a valuable approach to map interaction networks of low-abundant membrane proteins[2]. More recent findings suggest that the SPOTS complex associates with several other sphingolipid signaling components. Therefore, in a targeted proteomics approach, we will apply the TAP-crosslink method to identify new partners, as well as their posttranslational modifications in *Saccharomyces cerevisiae*. This will shed light on molecular mechanisms of the SPOTS complex and reveal cross-talk between sphingolipid metabolism and signaling pathways.

[1] *Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, Aebersold R, Simons K, Shevchenko A, Ejsing CS, Weissman JS. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. Nature. 2010 Feb 25;463(7284):1048-53.*
[2] *Puts CF, Lenoir G, Krijgsveld J, Williamson P, Holthuis JC. A P4-ATPase protein interaction network reveals a link between aminophospholipid transport and phosphoinositide metabolism. J Proteome Res. 2010 Feb 5;9(2):833-42.*

INVESTIGATION OF DENDRIPLEXES BY ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY

Emma-Dune Leriche[1,2,3], Gael Coadou[1,2,3], Hassan Oulyadi[1,2,3], Martin Grossel[4], Catherine Lange[1,2,3], Carlos Afonso[1,2,3], Corinne Loutelier-Bourhis[1,2,3]

1 - Université de Rouen, Laboratoire COBRA UMR 6014 & FR 3038, IRCOF, 1 Rue Tesnière, 76821 Mont St Aignan Cedex, France
2 - INSA de Rouen, Avenue de l'Université, 76800 St Etienne du Rouvray, France
3 - CNRS Délégation Normandie, 14 Rue Alfred Kastler, 14052 Caen Cedex, France
4 - University of Southampton, School of chemistry, Highfield, Hants SO17 1BJ Southampton, UK

In the past decade, polyamidoamine (PAMAM) dendrimers have gained popularity in a variety of disciplines and in particularly for their use in medical applications[1]. PAMAM dendrimers can form non covalent complexes with DNA though electrostatic interactions; they have been used as efficient nonviral gene delivery vectors. However, the cationic surface of these compounds causes high cytotoxicity. Attachment of hydrophobic residues on dendrimers surface may improve their ability to form complexes with DNA via hydrophobic interactions. The chemical modification is envisaged to decrease toxic effects and increase drug and gene carrier efficiency of dendrimers[2]. Thus, we have examined the influence of aromatic amino acids-modified PAMAM G1 on their efficiency to form complexes with DNA.

In this study, the ammonia- and EDA-core PAMAM (first-one-generation, G1) were prepared according to Tomalia divergent synthesis[3]; then the amine terminated G1(N) were modified with aromatic amino acids: phenylalanine or histidine[4]. MS and NMR techniques were used to characterize the modified dendrimers, evidencing the number of attached aromatic amino acids (0 up to n, n= number of terminal amine groups). Non-covalent complexes have been prepared from solutions of modified PAMAM and the self-complementary d(GCGCAATTGCGC)2 oligodeoxynucleotides[4].

The identification and structural characterization of the synthesized modified dendrimers and non-covalent complexes of modified PAMAM with DNA were performed using electrospray/multi-stage tandem mass spectrometry (ESI/MS^n) using an ion trap and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (ESI/Q-TOF-MS^n).

The mass spectra of non-covalent complexes sample showed non-complexed dendrimers, DNA (simple- and double-stranded), and dendriplexes. Travelling wave ion mobility mass spectrometry (TWIM-MS) was used to separate different compound classes, remove background and reduce the spectra complexity.

[1] *Roseita Esfand and al., Drug discovery today, 2001, 6, 427-436.*
[2] *R. Jevprasesphant and al., International Journal of Pharmaceutics, 2003, 252, 263-266.*
[3] *D. A. Tomalia and al., Polymer Journal, 1985, 17, 117-132.*
[4] *K. Kono and al., Bioconjugate Chemistry, 2005, 16, 208-214.*

P-042

CARACTÉRISATION DE COMPLEXES PDF1B/INHIBITEURS PAR MS SUPRAMOLÉCULAIRE ET COUPLAGE MOBILITÉ IONIQUE-MS : STOECHIOMÉTRIE D'INTERACTIONS, AFFINITÉS ET CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS

Stéphanie Petiot-Bécard[1], Sonia Fieulaine[2], Carmela Giglione[2], Thierry Meinnel[2], **Alain van Dorsselaer**[1], **Sarah Sanglier-Cianférani**[1]

1 - Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO), IPHC-DSA, Université de Strasbourg, UdS, CNRS, UMR7178; 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France.
2 - CNRS, Centre de Recherche de Gif, Institut des Sciences du Végétal, Bâtiment 23A, 1 avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.

Depuis quelques années, différentes stratégies basées sur la spectrométrie de masse (MS) ont été développées pour étudier l'architecture 3D des protéines intactes et des complexes non-covalents. Parmi celles-ci, le couplage mobilité ionique-spectrométrie de masse (IM-MS) apparaît comme une technique émergente prometteuse pour la caractérisation structurale de complexes de biomolécules[1,2]. L'étude par IM-MS de systèmes de plus petite taille tels que des complexes protéine/ligand reste toutefois encore rare. Récemment, notre équipe a montré qu'il était possible d'étudier des changements conformationnels subtils, de l'ordre de 2%, lors d'étude d'interactions protéine/ligands[3].

La PDF1B (Peptide DéFormylase 1B) est une protéine impliquée dans le processus d'excision de la méthionine N-terminale (NME), lors de la première étape de déformylation. Ce mécanisme est intéressant à inhiber pour faire face aux phénomènes fréquents de multi-résistances des bactéries aux antibiotiques. La PDF1B a alors été identifiée comme nouvelle cible thérapeutique potentielle. Plusieurs molécules comme l'Actinonine, RAS et AB47 ont été identifiées comme inhibiteurs de la protéine PDF1B.

Dans cette étude, nous avons combiné des méthodologies de MS supramoléculaire déjà bien établies pour la caractérisation de systèmes protéine/ligand à une technologie de MS encore émergente, le couplage IM-MS pour la caractérisation de 3 complexes PDF1B/inhibiteurs.

L'analyse par MS supramoléculaire nous a permis de déterminer les stœchiométries, d'évaluer les spécificités d'interaction, les affinités en solution ainsi que les stabilités en phase gazeuse des complexes PDF1B/inhibiteur. Des expériences de suivi par MS supramoléculaire mettant en compétition les ligands deux à deux ont permis pour la première fois d'obtenir des informations mécanistiques sur le mode d'action de type « slow tight binder » de certains inhibiteurs de PDF1B[4].

L'analyse par IM-MS en conditions natives des complexes PDF1B/inhibiteur a ensuite permis de suivre les changements conformationnels induits par la fixation de chacun des ligands sur PDF1B. Les changements conformationnels extrêmement fin (de l'ordre de 1%) ont pu être mis en évidence, ce qui est en accord avec les données d'analyse structurale.

Cette étude nous a permis de montrer que l'utilisation combinée de la MS supramoléculaire et du couplage IM-MS permet d'ajouter une dimension de caractérisation structurale pour les complexes.

[1] *Ruotolo BT et al., Nat. Protoc., (2008), 3, 1139-1152.*
[2] *Atmanene C et al., Anal. Chem., (2009), 81, 6364-6373.*
[3] *Atmanene C et al., Anal. Chem. (2012); sous presse.*
[4] *Fieulaine S et al., Plos Biol (2011), 9, e1001066.*

NATIVE MASS SPECTROMETRY APPROACHES FOR THE ANALYSIS OF INTACT RIBOSOMES AND RELATED PROTEIN/RIBOSOME INTERACTIONS

Jean-Michel Saliou[1], Stéphanie Petiot-Bécard[1], Sonia Fieulaine[2], Thierry Meinnel[2], **Alain van Dorsselaer**[1], Carmela Giglione[2], **Sarah Sanglier-Cianférani**[1]

1 - Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO), IPHC-DSA, University of Strasbourg UdS. CNRS, UMR7178, 25 rue Becquerel, 67 087 STRASBOURG, France.
2 - CNRS, Centre de Recherche de Gif, Institut des Sciences du Végétal, Bâtiment 23A, 1 avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.

Deciphering the intricate biological mechanisms involved in ribosome functioning is a challenging task, which often requires complementary approaches combining the benefits of orthogonal biophysical techniques (NMR, crystallography, electron microscopy, *etc.*) to study intact ribosomes and further protein/ribosome interactions. Since the determination of high resolution structures of the stable "core" of ribosome, mass spectrometry (MS) based-techniques, and particularly proteomics methods, have served to emphasize the relevance of non-ribosomal proteins that permanently or transiently might associate to the ribosome. Among them, ribosome-associated protein biogenesis factors (RPBs) are molecules acting as soon as a nascent polypeptide reaches the tunnel exit of the ribosome and are involved in the so-called cotranslation events (protein folding, modifications and/or translocation in various compartments).

In the present work, we will focus on native mass spectrometry that studies intact noncovalent assemblies for the characterization of intact ribosomes and related protein/ribosome complexes. Since the first demonstrations of the possibility to analyze intact noncovalent complexes in the gas phase using electrospray ionization, important methodological and instrumental achievements have been made, allowing complexes of various compositions and different sizes ranging from several hundred up to several million Daltons to be investigated with this technique. Native MS is now ready for the analysis of complex machineries like ribosomes and their related protein/ribosome complexes.

Even more recently, hyphenation of ion mobility and mass spectrometry (IM-MS) has greatly enlarged the potentials for biomolecular assembly structural characterization. With the possibility to gather mass and size/shape information concomitantly, IM-MS affords determining collision cross sections (CCS) and subsequent structural information on biomolecule gas phase conformations.

The overall goal of our project is to explore possibilities of native MS and IM-MS approaches to shed light on the dynamic process of how RPBs interact with nascent chains and the ribosome, which is still unclear. Preliminary data about interactions between RPBs in absence of ribosomes are presented. In addition, intact native MS analysis of both *T. thermophilus* and *E. coli* ribosomes will be presented as the bases for further native MS characterization of RBP/ribosome interactions.

P-044

APPORT DE LA MOBILITÉ IONIQUE EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE POUR LES ÉTUDES BIOLOGIQUES SUPRAMOLÉCULAIRES

Anna Ziemianin[1,3], **Catherine Lange**[1,2]

1 - CNRS UMR 6014 & FR 3038 (COBRA), Équipe de Spectrométrie de Masse Moléculaire et Supramoléculaire Université de Rouen, Rue Tesnière, 76821 Mont Saint Aignan cedex
2 - INSA de Rouen, Avenue de l'Université, 76800 St Etienne du Rouvray, 8 France
3 - Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, DSA, IPHC, UMR 7178, CNRS, Université de Strasbourg, 25, Rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France

La préservation de la structure native des complexes en solution est une étape clé pour pouvoir ensuite les analyser en phase gazeuse. Le développement de l'approche par spectrométrie de masse supramoléculaire implique la mise en place de méthodes permettant de profiter du potentiel de technologies MS encore plus puissantes tel que le couplage entre la spectrométrie de mobilité ionique et la spectrométrie de masse (SYNAPT G2 HDMS, Waters).

Le développement de stratégies d'analyses et l'optimisation instrumentale ont été réalisés avec pour but la caractérisation de complexes supramoléculaires de hautes masses protéines–ligands. Ce travail d'optimisation en IMS-MS a été effectué sur la protéine tétramèrique, l'alcool déshydrogénase (ADH) (148 kDa) et les complexe ADH–NAD^+ et ADH–inhibiteurs.

Une attention particulière doit être portée sur la conservation de la conformation native des édifices biologiques analysés en réglant finement les paramètres instrumentaux. Un compromis doit être fait entre l'intensité du signal et la précision des résultats obtenus car une augmentation de l'intensité du signal du complexe sera souvent suivie par une valeur de CCS plus élevée, ce qui correspond à une forme dépliée de l'édifice analysé.

L'optimisation de la procédure de préparation d'échantillons a montré qu'il s'agissait de l'étape primordiale dans ce type d'analyse sans pour autant négliger l'influence des paramètres instrumentaux qui ont été largement approfondis. Nous avons montré sur l'exemple de l'alcool déshydrogénase que la chimie supramoléculaire, croisée avec la technique de mobilité ionique, donne accès aux informations concernant la conformation et permet d'améliorer la connaissance du fonctionnement des molécules macro-biologiques.



Analyse Structurale, Biologie

SEQUENCING OF OLIGOUREA FOLDAMERS BY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Katell Bathany[1], Neil Owens[1], Lucile Fischer[1], Gilles Guichard[1], Jean-Marie Schmitter[1]

1 - University of Bordeaux, UMR 5248 CNRS, Bordeaux, France

De novo design of synthetic objects with well-defined tertiary and quaternary structures mimicking functions of biomacromolecules represents an ultimate goal in biomimetic chemistry. This work is focused on helical oligomers consisting of urea bridging units and bearing proteinogenic side-chains, of the type -(NH-CH(R)-CH_2N'H-CO)$_n$-. Sequence analysis of these oligomers by MS/MS presents a challenging problem as fragmentation across both CO-NH and N'H-CO urea bonds can occur.

As the goal of this work was to study the MS/MS sequencing of peptidomimetic oligourea foldamers, we first have chosen a notation that could easily describe their fragmentation. An oligourea is .-amino acid peptidic analogue obtained by replacing the α-carbon of a γ-amino acid by a nitrogen atom. The symbol chosen for a urea residue is the capital letter used to designate the corresponding α amino acid in the one letter system, but with the lowercase letter "u" added in subscript to refer to the urea bond. The nomenclature used for the description of oligourea fragmentations has been adapted from the classic peptide fragmentation nomenclature[1]. The subscript of an oligourea fragment ion is made up of the letter "u" followed by a number that indicates the number of residues in the fragment.

A series of five model oligoureas was prepared by stepwise assembly of N-Boc-protected monomers[2,3]. Three mass spectrometers were used: a MALDI-ToF-ToF, a MALDI-Q-ToF and a ESI-Q-ToF.

In MS/MS mode we observed the same fragment types with the two MALDI and the ESI mass spectrometers. Compared to MALDI-MS/MS fragmentation of singly charged precursors, ESI-MS/MS fragmentation of doubly charged precursors did not afford additional sequence information. For all examined oligoureas, the most abundant fragment ions belong to a_u, b_u, and y_u series. Moreover, we observed internal fragments resulting from a double cleavage event. These immonium-like reporter ions occurring at the low mass end of the spectrum provide clues to the residue composition of urea oligomers. This information, combined to mass differences observed between successive peaks of the a_u, b_u, or y_u ions series allowed decoding the sequences of model oligoureas using a MALDI-ToF-ToF instrument.

Fragmentation rules determined by means of tandem mass spectrometry for oligourea foldamers establish the basis for a *de novo* sequencing approach in order to screen oligourea combinatorial libraries synthesized on solid phase on micro beads.

[1] *Roepstorff P., Fohlman J., Biomed. Mass Spectrom. 1984, 11, 601.*
[2] *Fischer L. et al., Angew. Chem., 2010, 49, 1067-1070.*
[3] *Claudon P. et al. Angew. Chem., 2010, 49, 333-336.*

P-046

ANALYSIS OF RETINAL GANGLIOSIDES BY HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY ELECTROSPRAY IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY

Olivier Berdeaux[1], Élodie Masson[1], Anne Athias[2], Jean-Paul Pais-de-Barros[2], Stéphanie Cabaret[1], Lionel Bretillon[1]

1 - Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA) - Agrosup Dijon, INRA : UMR1324, Université de Bourgogne, CNRS : UMR6265 - 15 rue Hugues Picardet 21000 Dijon - France
2 - Institut Fédératif de Recherche Santé-STIC - CNRS, INSERM, CHU, Université de Bourgogne - Université de Bourgogne, Dijon - France

Purpose:
Gangliosides are sialic acid-containing glycosphingolipids. A large variety of gangliosides has been described based on differences in the oligosaccharidic chain as well as in the fatty acids and long chain sphingoid bases of the ceramide moiety. Gangliosides are particularly abundant in the central nervous system, including the retina. However, the precise role of gangliosides in the retina and its pathologies is still poorly understood. The ganglioside profile is specific to the organ, its differentiation and pathophysiological status. An efficient method of separation, identification and quantification is therefore crucial to apprehend the huge heterogeneity among these compounds and highlight changes. For that purposes, we report here a powerful analytical method based on hydrophilic interaction liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry (HILIC-ESI-MS/MS), further tested on rat retina.

Methods:
Separation of GM3, GM2, GD3, GD1a, GD1b, GT1b and GQ1a was achieved under HILIC conditions using an amino column. Using a triple quadrupole MS instrument equipped with electrospray ionization source, GM3 and GM2 molecular species were structurally characterized by collision-induced dissociation (CID) of $[M-H]^-$ and GD3, GD1a, GD1b, GT1b and GQ1a by CID of $[M-XH]^{X-}$ in the negative mode. The quantitative analysis of the different ganglioside molecular species was performed in the negative mode by single reaction monitoring (SRM). N-acetylneuraminic acid fragment at *m/z* 290 was produced in the collision cell from the different ganglioside molecular species and used in SRM for quantification. Data were expressed for each molecular species by calculating the ratio of each peak area to the total peak area within each particular class of gangliosides.

Results:
This method enables an effective separation of the major and minor ganglioside species in highly heterogeneous ganglioside mixture. Furthermore, it provides an accurate characterization of the widely variable ceramide moiety, whose role is so far not well understood. Applied to retinal samples, this glycolipidomic approach offers an efficient, sensitive, straight-forward, highly accurate and reliable tool to investigate the role of gangliosides in retina's function and pathologies.

LES PROTÉINES FLUORESCENTES SONT-ELLES UTILISABLES DANS DES CONDITIONS DE STRESS OXYDANT ?

Vivien Berthelot[1], Luis Alvarez[1], Vincent Steinmetz[1], Chantal Houée-Levin[1], Fabienne Merola[1], Marie Erard[1], **Filippo Rusconi**[1,2]

1 - Laboratoire de chimie-physique (LCP) - UMR CNRS 8000 - Université Paris-Sud XI - 91405 Orsay
2 - Laboratoire de biophysique - U565 INSERM - UMR7196 CNRS - USM0503 MNHN - 75005 Paris

Les protéines fluorescentes permettent l'analyse, à l'échelon moléculaire, des interactions protéiques dans les cellules vivantes, notamment en combinant l'imagerie FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) et le phénomène de FRET (Fluorescence Resonant Energy Transfer). Le couple de ces protéines le plus populaire pour l'imagerie de FRET est le couple CFP / YFP (Cyan et Yellow Fluorescent Protein) car les variations de la durée de vie de la CFP permettent de suivre les interactions protéiques. Pour pouvoir tirer parti de ces propriétés de fluorescence lors d'expériences de biologie cellulaire, il est impératif de bien connaître les caractéristiques photophysiques des protéines fluorescentes, en particulier leur susceptibilité à leur environnement physico-chimique proche.

Les propriétés photophysiques de la CFP peuvent dépendre, en effet, de paramètres physico-chimiques comme la température, le pH, les conditions d'irradiation, ou sa propre concentration. Plus récemment, la réaction de l'anion superoxyde sur la GFP a été observée dans la littérature.

Afin d'affiner notre compréhension des propriétés photophysiques de la CFP dans le milieu cellulaire et notamment dans des contextes de stress oxydant nous explorons les effets de formes réactives de l'oxygène ($^{\bullet}OH$, $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2) sur les propriétés photophysiques de la CFP[1]. De plus, nous déterminons si ces effets sont corrélés à des événements chimiques sur la protéine. Une étude fondée sur la mise en œuvre d'une stratégie analytique novatrice[2] impliquant chimie des protéines, chromatographie et spectrométrie de masse montre qu'un certain nombre de résidus de la CFP sont modifiés en présence de radicaux hydroxyle $^{\bullet}OH$.

L'étude pourrait permettre de pointer certains résidus responsables de la perte de propriétés de fluorescence et de là de proposer des mutations susceptibles d'augmenter les performances photophysiques de la CFP.

[1] *Alvarez L., Houée Levin C., Merola F., Pasquier H., Bizouarn T., Baciou L., and Rusconi F., Erard M. Are the fluorescent properties of the Cyan Fluorescent Protein sensitive to conditions of oxidative stress? Photochemistry and Photobiology 2010 86, 55-61.*
[2] *Alvarez, L., Merola, F., Erard, M. and Rusconi, F. Mass spectrometry-based structural dissection of fluorescent proteins. Biochemistry 2009 48, 3810-3812 (3,38).*

P-048

ANALYSE DES PRODUITS DE PHOTO-ADDITION DU GLYCINOATE DE MÉTHYLE SUR LE [C60]FULLERÈNE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE À HAUTE RÉSOLUTION

Marine De Person[1], Adrien Coffre[1], Fathi Moussa[1]

1 - LETIAM - Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud, EA4041, IUT d'Orsay, plateau du Moulon, F91400 Orsay

Depuis leur découverte en 1985 par Kroto, Curl et Smalley, les fullerènes et leurs dérivés de synthèse ont suscité beaucoup d'intérêt dans de nombreux domaines, notamment dans le domaine biomédical[1]. On leur confère ainsi de nombreuses propriétés parmi lesquelles des activités anti-oxydantes, supraconductrices, anti-tumorales, neuroprotectrices ou encore d'absorption des rayons UV.

Cependant les fullerènes sont difficiles à manipuler en milieu biologique à l'état natif car ils sont insolubles dans l'eau et dans la plupart des solvants polaires. De ce fait, la fonctionnalisation chimique des fullerènes en dérivés hydrophiles a pris un essor considérable lors de ces dernières années.

De nombreux dérivés ont pu être synthétisés en greffant sur le C60 des groupements polaires principalement par addition ou par photo-addition. Parmi ces dérivés, les fulleropyrrolidines peuvent être obtenues en faisant réagir du glycinoate de méthyle (GME) avec du C60 suivant une réaction de photo-addition impliquant de l'oxygène à l'état singulet[2].

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme de la réaction. La première s'appuie sur une addition de radicaux GME à la surface du C60 suivie d'une cyclisation en noyau pyrrolidine alors que la seconde suggère la formation d'une molécule d'azomethine ylide (AMY) dans le milieu réactionnel, suivie de l'addition de celle-ci sur la cage C60. Par ailleurs, le nombre exact d'adduits par molécule de C60 pouvant se former dans le milieu reste à déterminer.

En déterminant le nombre maximal d'adduits formés à la surface du fullerène et en identifiant les différents intermédiaires réactionnels par spectrométrie de masse à haute résolution couplée ou non à la chromatographie en phase liquide, l'objet de notre travail a consisté à élucider le mécanisme de formation de ces fulleropyrrolidines.

[1] *Szwarc, H.; Moussa, F. in : Handbook on Fullerene: Synthesis, Properties and Applications, Nova Science Publishers, Inc., Ed. R.F. Verner, C. Benvegnu, pp 405-422.*

[2] *Skanji, R; Ben Messaouda, M.; Zhang, Y.; Abderrabba, M.; Szwarc, H.; Moussa, F. Tetrahedron, 68 (2012) 2713-2718.*

APPORTS DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE SUPRAMOLÉCULAIRE ET DU COUPLAGE MOBILITÉ IONIQUE-SPECTROMÉTRIE DE MASSE POUR LA CARACTÉRISATION ET L'OPTIMISATION D'ANTICORPS THÉRAPEUTIQUES (OPTIMABS)

François Debaene[1], Daniel Ayoub[2], Hélène Diemer[1], Elsa Wagner-Rousset[2], Olivier Colas[2], Alain van Dorsselaer[1], Alain Beck[2], Sarah Sanglier-Cianférani[1]

1 - Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO), IPHC-DSA, ULP, CNRS, UMR7178 ; 25 rue Becquerel, 67 087 STRASBOURG, France
2 - Centre d'Immunologie Pierre-Fabre (CIPF), 5 Av. Napoléon III, BP 60497, F74164 SAINT-JULIEN-EN-GENEVOIS, France

Depuis les dix dernières années, les anticorps thérapeutiques représentent la majorité de molécules thérapeutiques mises sur le marché. Leur chiffre d'affaire devrait doubler dans les dix ans à venir, représentant près de 10% de l'industrie pharmaceutique. Les premières versions génériques (biosimilaires) et composés de nouvelle génération (biobetter) commençant à arriver sur le marché, il devient urgent de standardiser la caractérisation de ces biomolécules. Les différentes techniques de spectrométrie de masse (MS) jouent un rôle primordial à ce niveau.

Avec une masse moléculaire plus de 500 fois supérieures aux petites molécules inhibitrices classiques, les anticorps thérapeutiques présentent de par leur mode de production complexe, une variabilité importante (glycosylation, déamidation, oxydation…) au sein d'un même échantillon mais également d'un lot à un autre pouvant moduler leur efficacité thérapeutique.

Les avancées technologiques en MS en termes de sensibilité, résolution et de transmission d'ions de *m/z* élevés nous permettent aujourd'hui de caractériser précisément ces biomolécules intactes sans avoir à les digérer. Des approches émergentes telles que la MS supramoléculaire ou le couplage mobilité ionique-MS (IM-MS), qui permettent d'étudier les anticorps entiers dans des conditions proches de celles physiologiques, semblent également particulièrement prometteuses pour la caractérisation de cette famille de protéines.

Nous proposons dans ce travail d'illustrer les potentialités de la MS supramoléculaire et du couplage IM-MS pour la caractérisation de différents anticorps thérapeutiques de référence actuellement utilisés en clinique. Les mesures de masses des biomolécules entières en conditions dénaturantes nous renseignent sur l'hétérogénéité des échantillons (contaminants, oxydations, formes tronquées, type de glycoformes, *etc.*) alors que les analyses en conditions natives permettent d'identifier leur état d'oligomérisation ou la stœchiométrie d'interaction de complexes anticorps/antigènes. En complément de l'approche MS supramoléculaire, le couplage IM-MS apporte une caractérisation plus structurale de ces biomolécules thérapeutiques par la mesure des sections efficaces (CCS), le principal avantage résidant dans la faible quantité de matériel nécessaire à l'analyse.

Les techniques émergentes de MS telles que la MS supramoléculaire et le couplage IM-MS permettent de vérifier la qualité des lots produits en terme d'hétérogénéité, mais aussi, par des études structure-activité, d'optimiser des protocoles de production afin d'homogénéiser les lots et de gagner en efficacité thérapeutique.

P-050

EFFET DE LA SÉVÉRITÉ DU TRAITEMENT DE VISCORÉDUCTION SUR UN RÉSIDU SOUS VIDE, SUIVI PAR ESI FT ICR MS

Alain Desprez[1,2,3], Lionel Vernex-Loset[2], Jean-François Muller[2], Nopparat Vorapalawut[2], Brice Bouyssière[1], Gabriel Krier[2], Pierre Giusti[3]

1 - LCABIE, UMR 5254, CNRS-UPPA, Hélioparc, 2 av. Pr. Angot, 64053 Pau, France
2 - LCP-A2MC, Université de Lorraine, 1 bd Arago, Technopôle Metz 2000, 57070 Metz, France
3 - TOTAL Raffinage Chimie Normandie, Cert, BP 27 76700 Harfleur

Le pétrole est une matrice organique complexe qui contient des molécules allant des alcanes les plus simples aux composés polyaromatiques hétéroatomiques, de poids moléculaires variés, plus ou moins fonctionnalisés. Ces composés se répartissent en différentes classes en fonction des hétéroatomes qu'ils contiennent et de leur DBE (Double Bond Equivalent)[1]. Ces classes peuvent être mises en relation avec les propriétés des produits pétroliers.

La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier (FT ICR MS), couplée à une source d'ionisation électrospray (ESI), permet d'atteindre des résolutions très élevées (R > 300 000) avec une précision en masse inférieure à 1 ppm. Il est ainsi possible d'identifier la composition élémentaire des centaines de pics de masse que comporte un spectre de produit pétrolier. Cette technique a déjà été utilisée précédemment pour analyser des asphaltènes et des composés ayant subi des traitements d'hydrogénation[2].

Notre étude, menée en modes d'ionisations négative et positive, concerne plus précisément un résidu sous-vide (RSV) d'un brut de pétrole et 4 résidus viscoréduits (RVR) qui sont issus de ce même RSV, mais selon des sévérités de traitement différentes.

Les effets de la sévérité du traitement de viscoréduction seront discutés en fonction de la répartition des composés dans les différentes classes hétéroatomiques, de leurs degrés d'insaturation et de leur nombre d'atomes de carbone respectifs. Les composés soufrés des différents échantillons seront étudiés avant et après méthylation en présence d'iodure de méthyle[3].

[1] *A. G. Marshall and R. P. Rodgers, "Petroleomics : The Next Grand Challenge for Chemical Analysis", Acc. Chem. Res. 2004, 37, 53-59.*
[2] *J. M. Purcell, I. Merdrignac, R. P. Rodgers, A. G. Marshall, T. Gauthier and I. Guibard, "Stepwise Structural Characterization of Asphaltenes during Deep Hydroconversion Processes Determined by Atmospheric Pressure Photoionization (APPI) Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Mass Spectrometry", Energy & Fuels 2010, 24, 2257–2265.*
[3] *H. Muller, J. T. Andersson and W. Schrader, "Characterization of High-Molecular-Weight Sulfur-Containing Aromatics in Vacuum Residues Using Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry", Anal. Chem. 2005, 77, 2536-2543.*

FRAGMENTATION PATHWAYS OF OCTAMERIC POSS WITH VARIOUS SUBSTITUENTS

Thierry Fouquet[1,3], Jérôme Bour[1], Valérie Toniazzo[1], David Ruch[1], Trang N. T. Phan[2], Laurence Charles[3]

1 - Centre de Recherche Public Henri Tudor - Advanced Materials and Structures - 66, Rue du Luxembourg L-4002 Esch-sur-Alzette (Luxembourg)
2 - Université Aix-Marseille - Institut de Chimie Radicalaire - Chimie Radicalaire Organique et Polymères de Spécialité - Campus de Saint Jérôme - F-13397 Marseille (France)
3 - Université Aix-Marseille - Institut de Chimie Radicalaire - Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale - Campus de Saint Jérôme – F-13397 Marseille (France)

Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes (POSS) are three-dimensional siloxanes resulting from the condensation of trifunctional monomers. A huge literature is now available, from their syntheses to their incorporation into polymeric blends. POSS were extensively used as soluble references for silica surfaces, due to their high silicon/oxygen ratio. It appeared thus obvious to consider them as models for highly cross-linked polysiloxanes, further used as standards in the MS(/MS) characterization of plasma-polymerized hexamethyldisiloxane coatings – the most widely used silicon-containing deposit, exhibiting both PDMS and SiO_2-like structures. Despite mass spectrometry was already described as a well-suited tool, tandem mass spectrometry experiments on POSS were rarely reported and to the best of our knowledge, a unique article is dealing with the fragmentation behavior of a propylamine mono-functionalized POSS upon CID activation[1].

Since the nature of end-groups was shown to influence the MS/MS of linear PDMS, three octameric fully-condensed POSS with various pendant groups were electrosprayed as ammonium adducts and submitted to CID with propylamine, trimethylsiloxy (Q8M8) and dimethylsiloxy arms (Q8M8(H)).

Four consecutive water losses were observed from the protonated octa(propylamine) POSS under CID, occurring through a charge-driven propylamine cyclization. Cyclization of the eight pendant group ultimately leads to the complete unfolding of the octameric cube, to produce a linear octa(azasiloxane) chain bearing a terminal positively charged silicon. A chain reduction mechanism was further proposed to account for the few smallest fragment ions, through the release of cyclic neutrals containing three, four or five monomer units from the linear azasiloxane backbone as stated for hydride terminated PDMS[2]. A similar cube unfolding was then proposed to account for the MS/MS patterns of Q8M8 and Q8M8(H), occurring through multiple transfers of methyl groups or hydrogen atoms from one pendant group to a neighboring silicon vertex, inducing a four-membered ring to be formed. Repeating these charge-remote transfers lead to a random opening route of the octahedron, *i.e.* a random co-polymeric linear chain containing both intact pendant groups and four-membered rings as co-monomers. The numerous small product ions observed for Q8M8 and Q8M8(H) results from the random nature of their unfolding, producing numerous linear isomers of the dissociating species[3].

[1] *J. De Winter, A. L. Goffin, O. Coulembier, P. Dubois, R. Flammang, P. Gerbaux. European Journal of Mass Spectrometry 2009, 15, 431.*
[2] *T. Fouquet, S. Humbel, L. Charles. International Journal of Mass Spectrometry 2011, 306, 70.*
[3] *T. Fouquet, T. N. T. Phan, L. Charles. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2012, 26, 765.*

P-052

RECONSTRUCTION OF A PLASMA-POLYMER ARCHITECTURE OBTAINED FROM A CYCLIC SILOXANE PRECURSOR

Thierry Fouquet[1,2], Jérôme Bour[1], Valérie Toniazzo[1], David Ruch[1], Laurence Charles[2]

1 - Centre de Recherche Public Henri Tudor - Advanced Materials and Structures - 66, Rue du Luxembourg L-4002 Esch-sur-Alzette (Luxembourg)
2 - Université Aix-Marseille - Institut de Chimie Radicalaire - Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale - Campus de Saint Jérôme – F-13397 Marseille (France)

Contrary to conventional polymerization techniques, plasma-polymerization at atmospheric pressure leads to thin, pinhole-free and highly cross-linked films[1]. Their structural characterization by mass spectrometry raises two main issues. First, they are mostly insoluble and not easily amenable to ionization with traditional techniques. Second, when soluble fractions can be extracted, reconstruction of the structures from MS/MS spectra suffers from the lack of controlled standards, required to establish fragmentation routes. An approach combining chemical synthesis, sample chemolysis, ESI-MS(/MS) and solid state NMR is proposed here to address both issues and offer some structural insights into an insoluble plasma-polymer.

Studied samples are plasma-polymerized thin films (aka “pp”) deposited by Atmospheric Pressure plasma generated by Dielectric Barrier Discharge from a cyclic monomer, octamethylcyclotetrasiloxane (D4).

From ESI mass spectra of the ppD4 THF extract (25% w/w) it was found that plasma-polymerization of D4 had produced cyclolinear polysiloxanes described as a random copolymer of D4 and dimethylsiloxane segments, indicating that some precursors remain intact during the plasma polymerization while others would be opened or fragmented into small units[2]. This assumption was supported by comparing MS/MS data of home-synthesized standards to plasma-oligomers CID spectra. A controlled degradation using ethanol as a nucleophilic agent was then proposed to dissolve the ppD4 insoluble part. It would occur through the cleavage of Si-O bonds at branching points, leading to both OH- and EtO-terminated siloxanes for which diagnostic product ions had to be found – and were found by the MS/MS pattern analysis of commercial PDMS. First applied on a reference compound to check for the specificity of the reaction[3], the so-called “ethanolysis” was then implemented on the ppD4 insoluble part and allowed its complete dissolution. ESI-MS(/MS) analysis of the so-obtained sample revealed some linear segments present in the original solid network between branching points, and their average size (3-4 DMS units) and range (from 2 to 8) to be evaluated. Interestingly, various distributions which did not exhibit neither hydroxy nor ethoxy groups were detected, inducing that they were not formed upon the ethanolysis. On the contrary, they were very likely embedded within the insoluble deposit and released as intact oligomers during the chemolysis.

[1] *J. Bour, J. Bardon, H. Aubriet, D. Del Frari, B. Verheyde, R. Dams, D. Vangeneugden, D. Ruch, Plasma Processes and Polymers. 2008, 5, 788.*
[2] *T. Fouquet, J. Petersen, J.A.S. Bomfim, F. Ziarelli, J. Bour, D. Ruch and L. Charles, International Journal of Mass Spectrometry. 2012, 313, 58.*
[3] *T. Fouquet, J. Bour, V. Toniazzo, D. Ruch and L. Charles, Rapid communications un Mass Spectrometry, 2012, submitted.*

A NOVEL MODIFICATION OF GREGLIN, A SERINE PROTEASE INHIBITOR

Guillaume Gabant[1], Christophe Epinette[2], Alain Roussel[3], Christine Kellenberger[3], Baris Korkmaz[2], Francis Gauthier[2], Martine Cadène[1]

1 - Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans
2 - INSERM U-1100 "Pathologies Respiratoires: Protéolyse et Aérosolthérapie", Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 37032, Tours.
3 - Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, CNRS-UMR 6098, 13288, Marseille

Human neutrophil elastase (HNE) is thought to disrupt the pulmonary architecture during inflammation through direct action on extracellular matrix proteins. This serine protease is involved in tumor invasion and in lung diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cystic fibrosis (CF). Greglin is a powerful HNE inhibitor, purified from the ovary of the desert locust *Schistocercagregaria*[1].

The development of novel anti-HNE therapies to treat inflammatory diseases seems promising. The physicochemical properties of greglin suggest that it can be used as a template to design a new generation of highly resistant HNE inhibitors.

Greglin has 83 amino acids and bears putative phosphorylation sites. However, according to X-ray crystallography, it appears that the database sequence contains some mistakes. Here, we use a combination of biochemical tools and mass spectrometry to correctly annotate spectra for all amino acids and post-translational modifications of greglin, with the aim of designing new inhibitors.

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry experiments on reduced and dephosphorylated whole greglin allow for the determination of the number of disulfide bridges and the phosphorylation state. Interestingly, a delta mass of +478.97 Da is measured compared to the theoretical monoisotopic mass of greglin, suggesting a longer sequence, mutations and/or unexpected modifications.

The primary sequence of greglin was investigated using high-resolution nanoLC-ESI-UHR-Q-TOF (Bruker, maXis) on proteolytic peptides. *De novo* sequencing was performed and pointed to 5 diverging residues in the sequence. No additional amino acid was observed. Moreover, a previously unknown modification was found to be associated with the N-terminal part of greglin (delta mass of +472.151 Da). This modification is very labile during the CID fragmentation process and is not associated with a loss from a residue side chain. An individual protonated entity (observed at *m/z* 473.1531), consistent with the mass increment of the modification, is also found in MS2 spectra. Pseudo MS3 experiments on this species using ISD+CID were performed and suggest the presence of hexose (neutral loss of 162.0529 Da) and alcohol and/or acid group (neutral losses of 18.0109 Da). Several molecular formulas are proposed. Work is underway to localize this unknown modification and to determine if it has a possible physiological role.

[1] *Brillard-Bourdet M, Hamdaoui A, Hajjar E, Boudier C, Reuter N, Ehret-Sabatier L, Bieth JG, Gauthier F. A novel locust (Schistocercagregaria) serine protease inhibitor with a high affinity for neutrophil elastase.Biochem J. 2006 Dec 15;400(3):467-76.*

P-054

NEW FRAGMENTATION PATHWAY OF TETRAHYDROPROTOBERBERINE ALKALOIDS DETERMINED FOLLOWING *IN VIVO* BIOCONVERSION OF 6-^{13}C LABELLED TYRAMINE IN *CORYDALIS BRACTEATA* (*FUMARIACEAE*)

Nadezda Khodorova[1,2], Serge Pilard[3], Paulo Marcelo[4], Michelle Lequart-Pillon[1], Michèle Boitel-Conti[1]

1 - EA 3900 BIOPI "Biologie des Plantes et Innovations", Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80039 Amiens, France
2 - Current address: UFR "Nutrition Animale Qualité des Produits et Bien Être", AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris, France
3 - Plateforme Analytique, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue St Leu, 80039 Amiens, France
4 - Plateforme d'Ingénierie Cellulaire et Analyses de Protéines, Université de Picardie Jules Verne, 1-3 rue des Louvels, 80036 Amiens, France

The genus *Corydalis* contains about 450 species, widely distributed in the northern hemisphere. Many *Corydalis* species are traditionally used in oriental medicine for treatment of inflammation, gastric and liver disorders. The major bioactive constituents in these species are considered to be benzylisoquinoline alkaloids (BIA), some of which have been shown to be of potential therapeutic value for the treatment of Alzheimer's disease[1] and as anti-cancer drugs[2]. However, little is known about the sites of alkaloid accumulation, biosynthesis and possible metabolism in *Corydalis* plants.

C. bracteata is an early spring perennial tuberous herb distributed in the Siberian part of Russia. After spring vegetation the plants lose aerial parts and fall into summer dormancy. Until the next spring, the plant is represented by only an underground tuber with a bud.

Using high resolution LC-MS/MS we could identify 13 BIA accumulated in different tissues of *C. bracteata* during its development. Most of these compounds are tertiary tetrahydroprotoberberines (scoulerine, cheilanthifoline, stylopine, tetrahydrocolumbamine, canadine and tetrahydropalmatine) and quaternary protoberberine alkaloids (coptisine, palmatine, dehydrocorydaline, jatrorhizine and N-methylstylopine) along with one benzylisoquinoline alkaloid reticuline and the protopine.

In order to outline organ localization of alkaloid biosynthesis we have performed tracer feeding experiments using 6-^{13}C-tyramine as a tracer. The tracer was applied to detached Corydalis plant organs (leaves, stems, roots and tubers). The presence of 6-^{13}C-alkaloids was detected in all studied plant organs by the occurrence of $[6\text{-}^{13}C+H]^+$ ions observed in ESI-MS spectra. This suggests the possibility of *de novo* biosynthesis of BIA alkaloids in every *Corydalis* plant organ.

In addition to the study of alkaloids bioconversion, MS/MS and MS^n analysis of labeled tetrahydroprotoberberine alkaloids suggest the possibility of a new fragmentation mechanism of these compounds. To date, fragmentation pathway of tetrahydroprotoberberines has been depicted as a rupture of C-C liaisons in the cycle C which results in Retro-Diels-Alder reorganization of the molecule[3,4]. However, comparing the fragments of labeled compounds *versus* non-labeled ones, we demonstrate that another fragmentation pathway is possible, namely, the rupture of C-C liaisons in the cycle B followed by 1,3 proton migration according to a 4 centers mechanism.

---

[1] Adsersen A, kJølbye A, Dall O, Jäger AK. 2007. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from Corydalis cava Schweigg. & Kort. Journal of Ethnopharmacology 113: 179–182.

[2] Schwarz RE, Donohue CA, Sadava D, Kane SE. 2003. Pancreatic cancer in vitro toxicity mediated by Chinese herbs SPES and PC-SPES: implications for monotherapy and combination treatment. Cancer Letters 189: 59–68.

[3] Deevanhxay P, Suzuki M, Maeshibu N, Li H, Tanaka K, Hirose S. 2009. Simultaneous characterization of quaternary alkaloids, 8-oxoprotoberberine alkaloids, and a steroid compound in Coscinium fenestratum by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry. Journal Pharmaceautical and Biomedical Analysis 50: 413-425.

[4] Schmidt J, Boettcher C, Kuhnt C, Kutchan TM, Zenk MH. 2007. Poppy alkaloid profiling by electrospray tandem mass spectrometry and electrospray FT-ICR mass spectrometry after [ring-13C6]-tyramine feeding. Phytochemistry 68: 189-202.

CARACTÉRISATION STRUCTURALE DE NOUVELLES ISOFORMES DE β-DÉFENSINES AVIAIRES PAR TOP-DOWN ET DÉTERMINATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

Valérie Labas[1,2], Amanda Kravtzoff[3], Grégoire Harichaux[1,2], **Ana-Paula Teixeira-Gomes**[1,4], Gilles Lalmanach[3], Anne-Christine Lalmanach[4]

1 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours -Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France
3 - Inserm U1100, Pathologies respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie, F-37100 Tours
4 - INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France – Université de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France

Les défensines sont des acteurs majeurs de l'immunité innée des muqueuses. Ces peptides cationiques présents dans tout le règne animal sont composés de 30 à 50 acides aminés et possèdent une activité antibactérienne, antifongique et antivirale. Les défensines représentent ainsi des molécules candidates comme alternative aux antibiotiques. Malheureusement, du fait de leur structure très compacte en feuillet β stabilisé par trois ponts disulfures, les défensines sont difficiles à produire sous forme recombinante ou par synthèse peptidique. Cependant, les β-défensines aviaires (AvBD) qui possèdent une forte homologie de séquence et de structure avec les β-défensines humaines[1] sont, pour certaines, fortement produites dans la moelle osseuse de poulet[2]. L'analyse protéomique par bottom-up et top-down d'un extrait de moelle nous a déjà permis d'identifier et de caractériser trois AvBD (1, 2 et 7)[3], puis de montrer la présence d'une forme tronquée pour l'AvBD2 et l'AvBD7[4]. Ces formes pourraient être générées *in vivo* par l'action de protéases, mais leur activité antibactérienne n'est pas connue. Notre travail a donc consisté à caractériser par spectrométrie de masse à haute résolution par une approche top-down, l'ensemble des isoformes de l'AvBD 1, 2 et 7, et à mesurer leur activité antimicrobienne. Nous avons donc développé une stratégie basée sur l'utilisation de cathepsines à cystéine, protéases déjà connues pour dégrader certaines défensines humaines afin de générer, par protéolyse ménagée, des isoformes d'intérêt. Nous avons évalué l'action de 5 cathepsines humaines (B, H, K, L et S) sur les formes complètes d'AvBD 2 et 7. Pour cela, le clivage par les protéases a été suivi par RP-HPLC couplé à la spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode linéaire et réflectron. Cette étude a permis de caractériser finement 1, 4 et 3 isoformes supplémentaires respectivement pour l'AvBD 1, 2 et 7 avec la perte de 1 à 3 résidus N ou C-ter. De plus, deux cathepsines (B et K) se sont révélées être des outils de choix pour générer certaines isoformes de l'AvBD 2 et 7. Les premiers tests d'activité microbienne sur 2 souches (Gram + et -) ont permis d'observer que le pouvoir antibactérien des isoformes pouvait être variable. Ces premiers résultats apportent de nouvelles informations à prendre en compte pour la conception de thérapies futures.

[1] *Derache et al., J. Biol. Chem., 2012, 287(10):7746-55.*
[2] *Van Dijk et al., Vet. Immunol. Immunopathol., 2008, 124(1-2):1-18.*
[3] *Derache et al. Antimicrob. Agents Chemother., 2009, 53(11):4647-55.*
[4] *Labas et al., ICM-MS and Top-Down to characterize biomarker, SMAP, Avignon, 2011.*

P-056

USE OF PROCAINE AND PROCAINAMIDE AS CO-MATRICES FOR THE ANALYSIS OF OLIGOSACCHARIDES BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY

Hélène Lavanant[1,2,3], Corinne Loutelier-Bourhis[1,2,3], Carlos Afonso[1,2,3]

1 - Université de Rouen, UMR CNRS 6014, COBRA, FR3038, rue Tesnière, 76821 Mont St Aignan CEDEX, France
2 - INSA de Rouen, avenue de l'Université, 76800 St Etienne du Rouvray
3 - CNRS, Délégation Normandie, 14 rue A. Kastler 14052 Caen, CEDEX

Analysis of oligosaccharides by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry often yields only alkali metal cation adducts, which results in lower fragmentation yields and difficulty to retrieve sequence information. Derivatization by reductive amination may be used to promote *Y*-type glycosidic cleavages, by the addition of a basic tag on the reducing end. However, this involves time–consuming preparations and purifications with sample loss. Here, procaine and procainamide were used directly as co-matrices with 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB).

Acidified 10 g/L procaine hydrochloride or procainamide hydrochloride solutions in water/acetonitrile were added to the oligosaccharide solution one minute before preparing our

MALDI targets using DHB with the dried droplet method. This simple protocol resulted in homogeneous deposits. Acetic acid, formic acid, trifluoroacetic acid and phosphoric acid were tested to optimize derivatization yield. Phosphoric acids showed the highest yield although the sample was more homogeneous with acetic and formic acids. The method was applied to linear and branched oligosaccharides.

Positive ion mass spectra, easily acquired in an automated mode, presented a high percentage of oligosaccharides derivatized as Schiff base or glycosylamine detected as protonated molecules $[M + H]^+$ or $[M + Na]^+$. The high abundance of procaine or procainamide on the target did not impede the ionization process, improved the signal to noise ratio and eliminated the need to search for "sweet spots". With the presence of a group of higher proton affinity on the reducing end, fragmentation of the protonated precursor ions of the derivatives largely favored *Y*-type glycosidic cleavages.

The branched oligosaccharide studied were xyloglucan-derived oligosaccharides and showed remarquably simple fragmentation patterns which allowed straightforward verification of the residue content.

CARACTÉRISATION D'ADDUITS DE SPIN D'UN COMPOSÉ NITROSO β-PHOSPHORYLÉ : LE DEPNP

Aurélie Mizzi[1], Abdel Al Zeine[1], Robert Lauricella[1], Béatrice Tuccio[1], Laurence Charles[1]

1 - Aix-Marseille Université, Institut de Chimie Radicalaire UMR 7273, Équipe SACS – 13397 Marseille Cedex 20, France

Le piégeage de spin est une technique dans laquelle un radical libre fugace réagit avec la double liaison d'un composé diamagnétique, l'accepteur de spin, pour former un radical d'une durée de vie plus longue, l'adduit de spin. Dans cette méthode, les pièges utilisés sont classiquement des nitrones ou des composés nitroso. Bien que la spectroscopie de Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) de l'adduit de spin fournisse des informations structurales sur le radical piégé, les radicaux libres avec des structures similaires donnent souvent des signaux RPE identiques. De plus, la réduction biologique d'adduits de spin conduit à des espèces diamagnétiques indétectables par RPE.

De précédents travaux, réalisés au sein de notre équipe[1,2,3], ont montré que la spectrométrie de masse peut permettre de surmonter ces difficultés : de faibles quantités d'adduits de spin sont détectées en ESI-MS, le mode MS/MS permettant ensuite de déterminer précisément leur structure. Cette méthode permet non seulement l'étude des formes nitroxyde paramagnétiques, mais aussi de leurs dérivés oxydés ou réduits, indétectables par RPE.

Cette méthode a déjà été employée avec succès pour caractériser les adduits de diverses nitrones ainsi que du 2-méthyl-2-nitrosopropane. Nous présentons ici son extension au cas d'adduits de spin d'un composé nitroso β-phosphorylé : le DEPNP (2-(Diéthylphosphonate)-nitrosopropane). Divers adduits de spin de radicaux libres, formés par photolyse d'iodures d'alkyle ou d'aryle, ont ainsi été détectés par RPE et ESI-MS dans des milieux réactionnels complexes, puis leur structure a été établie par MS/MS, sans purification chromatographique préalable.

[1] *M. Triquigneaux, R. Lauricella, B. Tuccio et L. Charles, Nucleophile Addition of Reduced Glutathione on 2-Methyl-2-nitroso compound : A Combinated Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Electrospray Tandem Mass Spectrometry Study. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2009, 20 (11) 2013-2020.*

[2] *B. Tuccio, R. Lauricella, L. Charles, Characterisation of free radical spin adducts of the cyclic betaphosphorylated nitrone DEPMPO using tandem mass spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry 2006, 252 (1) 47-53.*

[3] *I. El Hassan, L. Charles, R. Lauricella, B. Tuccio, Detection and identification of various carboncentred free radical using N-aryl-ketonitrones : a spin trapping / EPR / MS study. New Journal of Chemistry 2008, 32 (4), 680-68.*

P-058

CRITÈRES DE DIFFÉRENCIATION ET D'IDENTIFICATION DE LA SULFATATION ET DE LA PHOSPHORYLATION DES PROTÉINES

Julien Parra[1,2], Véronique Legros[1,2], Régis Daniel[1,2], Florence Gonnet[1,2]

1 - Université d'Évry Val d'Essonne, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, bd F. Mitterrand, 91025 Évry, France
2 - CNRS, UMR 8587, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, bd F. Mitterrand, 91025 Évry, France

L'étude des modifications post-traductionnelles (MPTs) constitue un des axes majeurs de recherche de l'ère post-génomique. Sur les 250 MPTs répertoriées à ce jour[1], seules deux d'entre elles, la phosphorylation et la glycosylation, sont principalement étudiées. Or, depuis moins d'une dizaine d'années, d'autres MPTs suscitent également un intérêt croissant, notamment la sulfatation pour son rôle dans l'interaction protéine-protéine et les processus biologiques de signalisation[2]. Les acides aminés concernés par la sulfatation sont identiques à ceux qui peuvent être phosphorylés avec cependant une prévalence différente, la phosphorylation étant majoritairement portée par la sérine et la thréonine, alors que la tyrosine est l'acide aminé le plus fréquemment sulfaté. Ces deux modifications mènent à un incrément de masse quasiment similaire, à savoir 79,9568 u pour la sulfatation, et 79,9663 u pour la phosphorylation, soit une différence de $9{,}5.10^{-3}$ u. Afin d'identifier de manière univoque ces deux MPTs, une demande croissante se fait jour pour une méthode permettant de discriminer ces deux modifications. En effet, malgré l'avènement de spectromètres de masse à haute résolution de type FT-ICR et Orbitrap™, il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode permettant de différencier facilement et avec certitude ces deux MPTs. Nous avons mené des travaux sur le peptide modèle CCK-8 (hormone gastro-intestinale) sous deux formes, sulfatée et phosphorylée, afin de développer une méthode d'analyse MS efficace et sensible permettant de différencier ces deux modifications. Nos premiers résultats indiquent une différence de stabilité des deux MPTs en fonction du mode d'ionisation. Ainsi, nous avons observé que la sulfatation est plus stable que la phosphorylation en mode négatif, alors que l'inverse est observé en mode positif. De plus, les deux MPTs se différencient par leur dissociation en MS^3 (mode positif), avec une perte de neutre de 80 u correspondant au groupement SO_3 pour le peptide sulfaté, et une perte de 98 u correspondant au groupement H_3PO_4 pour le peptide phosphorylé. À terme, l'identification d'ions diagnostiques devrait également permettre la distinction des deux MPTs. L'ensemble de ces critères distinctifs intégré en une méthode applicable aux milieux biologiques complexes, devra permettre de mieux appréhender le rôle de la sulfatation dans les phénomènes de reconnaissance et d'interaction entre biomolécules.

[1] *F. Wolf, Ann. Rev. Biochem. 1981, 50, 783-814.*
[2] *K.L. Moore, J. Biol. Chem. 2003, 278, 24243-24246.*

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF XYLO-GLUCO-OLIGOSACCHARIDES BY NEGATIVE ESI-Q-TOF MASS SPECTROMETRY

Bernard Quémener[1], Marc Lahaye[1]

1 - INRA – Biopolymères, Interactions, Assemblages – Rue de la Géraudière BP 71627, F-44316 Nantes, France

Xyloglucans of tamarind and apple were hydrolyzed by commercial beta-endoglucanase from Megazyme. The degradation products were separated by high performance anion exchange chromatography (HPAEC). Using *on-line* carbohydrate membrane desalter, the released and well separated oligosaccharides were purified for further structural characterization using negative electrospray ionization mass spectrometry (ESI-Q-TOF). Under collision induced dissociation (CID), the negative ion fragmentation spectra of the deprotonated quasi-molecular ions were mainly characterized by glycosidic cleavage ions from the *C*-series which produce in turn series of related *A*-type cross-ring cleavage ions carrying linkage information of the linear backbone. In addition, specific *D*-ions arising from double *D*-type cleavage were also produced. These last dominant ions corresponded to the various antennae or side chains carrying by the core. These both characteristics were very useful to provide sequence and side chain relevant information. The CID spectra obtained using negative electrospray ionization mode were very informative that structural isomers, differing only in their substitution pattern, can be differentiated and fully characterized by this approach.



PROTÉOMIQUE

ÉTUDE PROTÉOMIQUE DE LA SORTILINE, UN RÉCEPTEUR DÉTERMINANT POUR LA TOXOPLASMOSE CAUSÉE PAR LE PARASITE *TOXOPLASMA GONDII*

Tchilabalo Dilezitoko Alayi[1], Christine Schaeffer-Reiss[1], Agnès Hovasse[1], Pierre-Julien Sloves[2], Stéphane Delhaye[2], Thomas Mouveaux[2], Elisabeth Werkmeister[2], Christian Slomianny[3], Isabelle Callebaut[4], Rajshekhar Y. Gaji[5], Vern B. Carruthers[5], Alain van Dorsselaer[1], Stanislas Tomavo[2]

1 - IPHC, UdS, CNRS, UMR 7178, Strasbourg, France
2 - Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France
3 - Laboratory of Cell Physiology, Université de Lille, France
4 - Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés, CNRS UMR 7590, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
5 - Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, USA

Les apicomplexes, y compris *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparumqui* représentent un vrai problème de santé publique et vétérinaire. Ils ont comme dénominateur structural commun la présence de trois organites apicaux : rhoptries, micronèmes et granules denses exclusivement trouvés dans ces parasites et essentiels pour envahir et survivre dans les cellules hôtes. Les récepteurs qui sont responsables dans le tri, le transport des protéines présentes dans ces organites sécrétoires ne sont pas encore connus mais demeurent au centre du développement de stratégies thérapeutiques.

Nos travaux ont porté sur un récepteur putatif nommé TgSORTLR ("*T. gondii* Sortilin-Like Receptor") qui est localisé simultanément dans l'appareil de Golgi et les structures endosomales. L'étude protéomique du complexe protéique, isolée grâce à l'utilisation d'un agent chimique pontant le DSP, a permis d'identifier des protéines partenaires telles que les micronèmes (MIC1, MIC4) et les rhoptries (ROP1, ROP2, ROP4 et ROP5).

Nous avons démontré que le domaine N-terminal de TgSORTLR interagit spécifiquement avec les protéines ROP et MIC, alors que son extrémité cytoplasmique C-terminale se fixe spécifiquement aux protéines endosomales et joue un rôle capital dans le trafic antérograde et rétrograde du récepteur, dans sa localisation subcellulaire et ses fonctions biologiques.

Ainsi, la TgSORTLR est non seulement impliquée dans le tri des protéines mais également dans la biogenèse d'organites apicaux, et l'infection de l'hôte[1] et permet donc d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la toxoplasmose, le paludisme et autres maladies parasitaires humaines et vétérinaires.

Une étude détaillée combinant les techniques de biologie cellulaire, biochimie et génétique de cinq protéines partenaires du domaine C-terminal de la Sortiline identifiées par protéomique est en cours afin d'élucider leurs fonctions biologiques.

[1] *Sloves PJ, Delhaye S, Mouveaux T, Werkmeister E, Slomianny C, Hovasse A, Dilezitoko Alayi T, et al. (2012). Toxoplasma Sortilin-like Receptor Regulates Protein Transport and Is Essential for Apical Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection.Cell Host Microbe 11,515-527.*

P-061

INTERACTION PROTEOMICS SUGGESTS A NEW ROLE FOR THE TFS1 PROTEIN IN THE GENERAL STRESS RESPONSE IN YEAST

Martine Beaufour[1], Fabienne Godin[2], Béatrice Vallée[2], Hélène Bénédetti[2], Martine Cadène[1]

1 - Spectrométrie de Masse, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France
2 - Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France

Human phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (hPEBP1), also known as Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) is a human member of the PEBP family whose orthologs are present in a wide variety of organisms. PEBP proteins have been assigned various functions in higher eukaryotes. hPEBP1 is the object of a growing scientific interest nowadays as more evidence points toward its role as a human metastasis suppressor[1].

Tfs1p is a yeast member of the PEBP family. So far, it has been shown to be involved in two biological processes: the inhibition of CPY, a serine carboxypeptidase, and the inhibition of Ira2p, a GTPase activating protein (GAP) involved in the Ras/cAMP/PKA pathway. It is reasonable to assume that Tfs1p, like its higher eukaryotes orthologs, is involved in other processes. Thus, we have undertaken a careful inventory of Tfs1p partners using interaction proteomics targeted on this protein in order to shed light on possible new functions and to bring new clues and new tracks on both Tfs1p and hPEBP1.

To identify proteins involved in complexes where Tfs1p was present, TAP-tagged Tfs1p was expressed in a genomically modified yeast strain and Tfs1p partners were recovered after affinity purification. Purified proteins were then separated by gel electrophoresis, proteolyzed with trypsin, analysed by nanoLC-ESI-MS/MS, and identified with database searching.

Overall, fourteen partners of Tfs1p were identified[2]. Seven proteins are involved in biosynthesis and/or energy metabolism, and five proteins participate in transcription/translation/folding processes. A GAP, involved in cell trafficking (Glo3p), and a proteinase (Lap4p), unrelated to CPY, were also identified. We confirmed the binding of Tfs1p with Glo3p and the metabolic enzymes Idp1p and Pro1p by co-immunoprecipitation.

The TFS1 gene is known to be overexpressed following exposure to stress[3] and to play a role on the Ras/cAMP/PKA pathway which controls important processes such as metabolism, stress resistance, growth and meiosis[4]. We show in this work that, in addition to this indirect role, the protein is directly involved in metabolic pathways and that one of its role might be to help the cells adapt to stress by acting on their metabolism.

[1] *Granovsky et al. Cell Res. 2008, 18 (4), 452-457.*
[2] *Beaufour et al. J. Proteome Res. 2012, dx.doi.org/10.1021/pr201239t. Epub May 10, 2012.*
[3] *Hasan et al. Mol. Microbiol. 2002, 45 (1), 233-241.*
[4] *Thevelein et al. Mol. Microbiol. 1999, 33 (5), 904-918.*

TOXICITÉ PLACENTAIRE : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS ÉPIGÉNOMIQUES D'EXPOSITION AU BENZO(A)PYRÈNE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Raphaël Bilgraer[1], Sylvie Gillet[1], Olivier Laprévote[1]

1 - Laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire (C-TAC) - Université Paris Descartes - 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris - France

L'atmosphère dans laquelle nous évoluons est imprégnée de divers composés chimiques carcinogènes dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), benzo(a)pyrène (B(a)P) en tête. Outre leur pouvoir génotoxique, peu d'informations sont disponibles dans la littérature concernant leur capacité à perturber les mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications post-traductionnelles des histones) régulant l'expression des gènes sans altérer leurs séquences nucléotidiques (Conrad H. Waddington, 1942).

Le B(a)P peut compromettre la mise en place normale du phénotype durant les phases précoces du développement embryonnaire. Avant d'atteindre le fœtus, il doit franchir le placenta. Seule interface existante entre la circulation sanguine maternelle et le fœtus, le placenta est le siège de tous les échanges métaboliques ainsi que de la sécrétion hormonale nécessaire au maintien de la grossesse. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence des marqueurs épigénétiques de toxicité du B(a)P via l'identification des modifications post-traductionnelles constitutives du code histone (acétylation, phosphorylation, mono-, di- et triméthylation). Pour cela nous avons utilisé un modèle cellulaire humain dérivé de choriocarcinome mimant au plus près les caractéristiques des cytotrophoblastes constitutifs de la barrière hémato-placentaire : la lignée BeWo. Une fois ces cellules exposées au B(a)P, elles sont lysées afin d'obtenir une préparation de chromatine à partir de laquelle sont extraites les histones. Deux stratégies analytiques faisant appel à la spectrométrie de masse sont alors employées. La première utilise comme matériel de départ les histones intactes purifiées en mélange et a recours à un couplage hors-ligne nanoLC-MALDI-TOF/TOF permettant d'obtenir un profil des histones et de leurs variants exprimés. L'autre stratégie est basée sur l'étude des peptides de protéolyse (« bottom-up ») et utilise un couplage chromatographique avec un spectromètre de masse Orbitrap™ de haute résolution permettant de déchiffrer le code histone. La somme des informations obtenues devrait permettre de mettre en évidence différents degrés de modification des histones après exposition au B(a)P et in fine d'en dégager des biomarqueurs épigénomiques spécifiques. Une fois cette stratégie validée sur le modèle BeWo, elle devrait être appliquée à des cultures primaires de trophoblastes obtenues à partir de placentas humains.

P-063

INTACT CELLS MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY PROFILING OF MALE CHICKEN *GALLUS GALLUS* SEMEN: COMPARISON BETWEEN FRESH AND FROZEN SPERM

Marie-Christine Bourin[4], Karine Cahier[1,2], Isabelle Grasseau[4], Valérie Labas[1,2], Grégoire Harichaux[1,2], Ana-Paula Teixeira-Gomes[1,3], Jean Didier Terlot[4], Nadine Gérard[2], Elisabeth Blesbois[4]

1 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours -Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France
4 - INRA, UR 83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly France

Management of genetic diversity has to be optimized in order to preserve genetic variability and finally biodiversity. Semen cryopreservation is an important tool for the management of genetic diversity in avian species. It is the only non-invasive method that allows storage of genetic diversity in cryobanks and re-introduction in animal populations. Despite increasing success, sperm quality is however still impaired by freeze-thaw process. Initial semen quality measured by *in vitro* quality test or fertility is a key factor for the success of cryopreservation[1]. Thus the knowledge of molecules implicated in semen quality is very important. Among these, the Intact Cells MALDI-TOF Mass spectrometry (ICM-MS) profiling of sperm may reveal new biomarkers[2]. Evolution of proteomic profiles may give key information on the specific alterations occurred with the freeze-thaw process and also lead to improvements of the cryopreservation procedures.

In this context, our project aimed to evaluate the effects of cryoprotectants (dimethyl acetamide or glycerol) and cryopreservation on the peptide/protein profile of chicken sperm using differential and quantitative ICM-MS analysis. This was performed on semen of individual males with different initial sperm quality. Sperm quality was assessed by *in vitro* quality tests (mass motility, objective measurements of motility, acrosomic reaction, cells viability) and by fertility of fresh semen.

We found no effect of the cryoprotectant addition on the molecular profile of spermatozoa. However, the freeze-thaw process induced changes but this did not affect the characteristic profile of the semen. Therefore, *in vitro* semen quality tests were measured on fresh and frozen-thawed individual semen originating from 12 males known for their differences in semen quality. For each test, the ICM-MS profile of the "worst" male chicken was compared to the "best" one. Lists of peptidic biomarkers were obtained and compared between fresh and frozen-thawed sperm. Two potential biomarkers were common to most tests: one specific of good semen quality and one specific of bad semen quality. The identification of these markers will be done through Top-Down analyses requiring prerequisite purification of the peptides of interest.

In conclusion, we showed that ICM-MS profiling is an efficient method to display quality biomarkers from fresh or frozen semen.

---

[1] *Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. Theriogenology 2008, Jan 15;69(2):252-61.*

[2] *Labas V., Harichaux G., Grasseau I., Terlot JD., Teixeira-Gomes AP., Druart X, Gérard N., Blesbois E. Biomarkers of chicken sperm quality displayed by Intact Cells MALDI-TOF Mass Spectrometry. Congrès de spectrométrie de masse & Analyse Protéomique (SMAP), 19-22 septembre 2011, Avignon.*

SCHEDULING OF VERY LARGE MRM ASSAYS ON A HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETER

David Cox[1], J. Bryce Young[1], Stephen A. Tate[1], Nic Bloomfield[1], **Cécile Busset**[2]

1 - AB Sciex, Concord, CANADA
2 - AB Sciex, Les Ulis, France

Novel Aspect: Scheduling of MRM and product ion experiments on a high resolution TOF instrument.

Introduction

High resolution TOF instruments, with sensitivity and dynamic range similar to triple quadrupole instruments, enable both characterization and quantification experiments to be acquired on the same instrument. This has enabled the rapid turn-around of protein identification results, into measurable protein assays. Often, it is desirable to characterize and develop a protein quant assay on a high resolution TOF instrument, and then transfer this assay to a triple quadrupole platform. This workflow requires larger number of MRM to be evaluated on the TOF instrument than in the final assay. By enabling scheduling of MRM on a TOF instrument, an assay including many thousands of MRM can be evaluated and developed.

Methods

Assays were designed using Skyline software. Mass / retention time lists were imported in to the inclusion list of an IDA experiment using a research version of Analyst® TF software. These methods were run on an Eksigent cHiPLC Nanoflex system coupled to a TripleTOF™ 5600 system. Data was reviewed in PeakView™ software or MultiQuant™ software.

Preliminary Data

The benefits of scheduling were investigated using a 10 peptide beta-galactosidase assay, and adding an increasing number of other masses to the assay (resulting in over 1000 scheduled product ion experiments in a single run). By using scheduling, the cycle time and dwell time for the peptides was maintained at a level suitable for quantitation. Most of the peptides had 5-10 or more fragment ions that could be evaluated for inclusion in a protein quant assay, thus resulting in the capability of running several thousand high resolution MRM in one run. In addition to beta-galactosidase, other, more biologically relevant samples were investigated, showing similar results. This implementation of scheduling used a fixed cycle time and a fixed dwell time across the entire run. This helped in method development. Cycle time was set based on the desired number of points across an LC peak. The dwell time was set to give adequate signal to noise. The result of a fixed cycle time and fixed dwell time is that concurrency now affects the width of a scheduled window. Areas of low concurrency resulted in windows that extend past the expected end time. This enabled assays that were more robust to shifts in retention time. A benefit of MRM assays on a high resolution TOF instrument is that each spectrum contains the fragmentation pattern for the entire peptide. As mentioned, this allows a large number of MRM to be extracted from the full scan spectrum. An additional benefit is that the file can be searched using traditional peptide identification search engines, or library search algorithms. This enabled confirmation of identification, and gave indications of any potential interference.

P-065

PROTEINS IN ART PAINTINGS: INVESTIGATION ON THEIR CHEMICAL MODIFICATIONS

Sophie Dallongeville[1], Nicolas Garnier[1], **Christian Rolando**[1], **Caroline Tokarski**[1]

1 - Miniaturisation pour l'Analyse, la Synthèse & la Protéomique, USR CNRS 3290, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Chemical analyses of artwork samples mainly consist in the identification of the compounds highlighting then the artist's technique but providing also essential information to Art historians. Focusing on proteins, widely used as binder in art painting, little is known about their ageing or about the interaction with other components, which is of huge importance to understand the chemical mechanisms that take place in the artwork and propose appropriate conservation conditions or restoration procedures.

In this work, we proposed a proteomics approach on egg-based model paintings allowing the identification and localization of the protein modifications resulting from (i) the presence of linseed oil in the sample and (ii) artificial and natural ageing.

Model paintings containing lead white and egg as binder were prepared. As protein/oil emulsions were also frequently used, model paints with and without linseed oil were prepared. Artificial ageing was performed under controlled temperature and humidity with 12 h cycles of UV irradiation (365 nm) in order to imitate day/night cycles. The proteins were extracted from the painting by grinding the sample in a molecular resin with 1% TFA acidified water. Proteins were denatured, reduced, alkylated and hydrolyzed with trypsin enzyme. The peptides obtained were analyzed by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry.

In a first time, protein extraction was performed shortly after the making of the paintings in order to investigate the effect of linseed oil. The presence of lipids resulted in numerous oxidations mainly located on tryptophan residues showing that lipid peroxidation, catalyzed by the lead white pigment, was involved in the damaging of the protein binder. The effect of ageing, achieved either artificially with 240 h UV irradiation, or naturally by exposure to sunlight at ambient temperature during 2 years, was also studied. Oxidations on tryptophan residues were also identified in the case of aged samples. Most of time, the tryptophan residues were dioxidized into N-formylkynurenine, leading to a mass increase of 32 Da. For aged samples containing linseed oil, supplementary oxidations located on methionine residues were also identified.

TYPAGE DIRECT DE BIOPSIES AMYLOÏDES

Emmanuelle Demey-Thomas[1], **Sophie Liuu**[1], Emie Durighello[1], Magali Colombat[2], Gilles Grateau[3], **Joëlle Vinh**[1]

1 - Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, CNRS USR 3149 / ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France
2 - Service d'anatomie et cytologie pathologiques, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine Paris, 75020 Paris, France
3 - Service de médecine interne, Hôpital Tenon, UPMC, Inserm U933, 4 rue de la Chine Paris, 75020 Paris, France

Les amyloses sont des maladies qui se manifestent par des agrégats de protéines extracellulaires dans divers tissus de l'organisme. Il existe une vingtaine de différents types d'amyloses, généralisées ou localisées qui se différencient par leur protéine précurseur[1]. De nos jours, le diagnostic se fait principalement par immunohistochimie. Cette technique, nécessitant des anticorps spécifiques, permet de mettre en évidence jusqu'à une dizaine de protéines, mais son interprétation restant fortement dépendante du pathologiste et du matériel employé, peut être non concluante.

Récemment de nouvelles techniques ont fait leur apparition, combinant la micro dissection laser (MDL) et la spectrométrie de masse[2]. Une des étapes clé de l'analyse protéomique par approche "bottom-up" reste la protéolyse enzymatique, et le traitement par ultrasons permet d'en améliorer la réalisation[3]. Notre travail vise à identifier des marqueurs amyloïdes en utilisant une approche protéomique à partir de tissus bruts traités par ultrasons, éliminant l'étape de MDL pour rester au plus près d'un typage clinique.

Après la phase d'optimisation du système nanochromatographique (matériel, connexions...) sur un mélange de protéines standards digérées, puis sur des biopsies de reins (préparation, gradients), les biopsies prélevées chez des patients atteints de différents types d'amyloses sont directement broyées et digérées par la trypsine, sous ultrasons. Cette technique permet d'augmenter l'efficacité et le temps de la digestion, tout en minimisant la quantité d'échantillons biologiques nécessaires.

Ces échantillons digérés sont ensuite analysés par nano-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (MS/MS) à haute résolution de type nanoESI-LIT/FTICR (LTQ FT Ultra, Thermo Fisher Scientific) pour une identification et une quantification label-free des protéines[4].

La confirmation du diagnostic clinique des patients atteints par la pathologie d'amylose décelée dans différents organes/tissus (reins, poumons, glandes salivaires, testicule, humeur vitrée), par cette approche protéomique, nous a permis de valider notre protocole de traitement. Cette méthode, efficace pour des biopsies de faible volume permettrait d'identifier de nouvelles protéines amyloïdogènes, ce qui ne pourrait pas être le cas en immunohistochimie où la connaissance de la protéine au préalable est nécessaire.

[1] *G.Grateau et al., Médecine Sciences, 2005: 627-633.*
[2] *S. Sethi, et al Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2010; 5(12): 2180-7.*
[3] *L. Fernandez, et al JIOMICS, 2011, 1(1): 144-150.*
[4] *J.C. Silva, Mol Cell Prot, 2006, 5: 144-56.*

P-067

NEW TRENDS IN PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY IDENTIFICATION: EVALUATION OF MALDI TOF MASS SPECTROMETRY, A PROTEOTYPIC APPROACH, IN COMPARISON TO CONVENTIONAL APPROACH BY GENOTYPIC AND PHENOTYPIC METHODS

Christelle Fontaine[1]

1 - Sanofi-Pasteur

Microbial identification in the pharmaceutical industry is a difficult topic. Many methods based on different analytical techniques are available. Each has restrictions due to the method and database limitations and each has inherent shortcomings in terms of accuracy, reproducibility, technical complexity, rapidity and cost. Very little guidance exists on how to conduct clearly these microbial identifications.

Rapid and reliable identification of bacteria, moulds and yeasts is a real challenge in microbiological testing for the pharmaceutical industry applied to injectable products like vaccines, *in-process* control and the many environmental controls.

The MALDI TOF Mass Spectrometry is well positioned to meet this challenge.

The objective of the study is to assess the strengths and weaknesses of Mass Spectrometry in terms of high throughput, relevance of the database with pharmaceutical and environmental strains, species discrimination and cost. The proteotypic approach performed on multiple suppliers equipment will be compared to conventional routine enzymatic method such as the phenotypic method and to the reference method of sequencing.

DETECTION OF rHuEPO IN HORSE PLASMA SAMPLES USING NANOLC – Q EXACTIVE

Patrice Garcia[1], Florence Cormant[1], Claire Dauly[2], Marie-Agnès Popot[1], Yves Bonnaire[1], Ludovic Bailly-Chouriberry[1]

1 - Laboratoire des Courses Hippiques (LCH), 15 rue de Paradis, 91370 Verrières-le-Buisson, France
2 - Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France

Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) is a 30-34 kDa glycoprotein banned by the racing authorities. Methods to differentiate horse endogenous EPO and rHuEPO have been developed employing LC-MS/MS or isoelectric focusing (IEF) with double-blotting. However, the short confirmation time window for such compound in plasma remains a problem for horseracing doping control laboratories. In this study a new sample preparation using disposable anti-EPO monolith columns was combined with nano-LC-MS/MS analysis on a high resolution Orbitrap mass analyzer.

rHuEPO spiked plasma sample were extracted using anti-EPO monolith columns according to the modified protocol of the EPO purification kit from MAIIA Diagnostics (Uppsala, Sweden) proposed by Bailly-Chouriberry *et al.*[1]. Samples were analyzed on a Thermo Fisher Scientific quadrupole Orbitrap instrument (Q-Exactive) coupled to a Thermo Fisher Scientific Easy-nLC system. A method focused on targeted MS/MS scans at 35,000 resolving power for sequence confirmation was applied to detect 2 specific peptides, T6 and T17, previously described[2] as proteotypic variants of the rHuEPOs used in equine doping control.

Detection of rHuEPO is traditionally performed with selective reaction monitoring (SRM) on a triple quadrupole mass spectrometer. This technology is known to provide efficient sensitivity and robustness. However, in complex matrices like plasma, limits of detection are often correlated by the presence or not of interferences which can, to some extent, be overcome by applying gas phase separation like high-Field Asymmetric waveform Ion Mobility Spectrometry (FAIMS) which brings an additional dimension of selectivity[1]. High resolution mass spectrometry was here successfully applied to detect 2 peptides of rHuEPO in plasma with good sensitivity without the need of FAIMS. The presence of rHuEPO was confirmed with a limit of detection at 25 pg/mL, which represents, in term of sensitivity and detection time, an improvement over previously published methods. These results hold promise for the use of high resolution mass spectrometry dedicated to peptide and protein based drugs in horse doping control. In order to improve detection times and/or to specify the EPO manufacturer origins, it would be important to look at, with a major interest, of the post-translational modifications.

[1] *L. Bailly-Chouriberry, F. Cormant, P. Garcia, M. Lönnberg, S. Szwandt, U. Bondesson, M-A Popot and Y.Bonnaire, Analyst, 2012, 137, 2445-2453.*
[2] *F. Guan, C. Uboh, L. Soma, E. Birks, J. Chen, J. Mitchell, Y. You, J. Rudy, F. Xu, X. Li and M. Mbuy, Anal. Chem., 2007, 79, 4627-4635.*

P-069

PROTEOMIC STUDIES OF THE FIRST β2 MICROGLOBULIN MUTANT INVOLVED IN A CASE OF HUMAN AMYLOIDOSIS SHOW ONLY THE VARIANT PEPTIDE IN THE PRAS EXTRACTS OF THE AMYLOID DEPOSITS

François Guillonneau[1,2,4], Philippe Chafey[1,2,4], Guilhem Clary[1,2,4], Marie-Claude Menet[5], Franck Brachet[6], Cédric Broussard[1,2,4], Daniel Robic[6], Madeleine Riès-Kautt[1,2,3]

1 - INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France
2 - CNRS, UMR8104, Paris, France
3 - Faculté de Médecine Paris Descartes - 24, rue du Faubourg St Jacques 75014 PARIS, France
4 - Plate-forme Protéomique 3P5, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
5 - Laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire (EA 4463), Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité 75006 Paris, France
6 - Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques (CNRS UMR 8015), Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité 75006 Paris, France

So far β2-microglobulin has been described to be responsible for amyloidosis in long term dialyzed patients for whom the glycated form of this protein accumulated. In an amyloidosis case which was not related to dialysis, Pras-method extraction of amyloid-laden spleen together with various proteomics analysis approaches allowed recurrent β2-microglobulin identification as the best amylogenic protein candidate of a new human amyloidosis. Optimization of trypsinolysis and mass spectrometry analysis along with adapted data treatment gave enough evidences to point out that an undescribed mutant version of the protein could cause this amyloidosis form. It has been confirmed that the tryptic peptide 96-101 NEYACR instead of DEYACR. Ultimately only the mutant peptide NEYACR, and no normal DEYACR, could be evidenced in the spleen, liver and heart of the same patient showing the systemic type of this amyloidosis.

COMPARISON OF TWO LABEL-FREE QUANTITATIVE METHODS ON EWE CEREBROSPINAL FLUID (CSF) PROTEOME IN REGARD WITH THE CONTROL OF SEASONAL REPRODUCTION

Grégoire Harichaux[1,2], Dominique Gennetay[1], Ana-Paula Teixeira-Gomes[2,3], Janina Skipor[4], Jean-Claude Thiery[1], Valérie Labas[1,2], **Laurence Dufourny**[1]

1 - INRA, UMR INRA 85, Physiologie de la Reproduction et des Comportements – UMR CNRS 6175 – Université de Tours – IFCE, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UR 1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France
4 - Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland

Among all mass spectrometry based quantitative proteomic approaches currently available, we have chosen two label free methods (spectral counting and peptide pattern-based method) to study the ovine cerebrospinal fluid (CSF) proteome in regard with the control of seasonal reproduction.

Photoperiod, the main physical synchronizer of seasonal reproduction, is now acknowledged as a key player of the modulation of CSF content since different amounts of gonadal steroids[1] (estradiol, progesterone) and protein hormones such as leptin[2] have been observed between sheep placed in long or short day lengths. We recently showed that these variations may stem from a seasonal fine-tuned regulation of structural protein content in tight junctions of the choroid plexuses (CP)[3]. From this, we hypothesized that a higher permeability of CP under long days would facilitate the access of plasma proteins to CSF and therefore to the central nervous system. It is also interesting to highlight that CP secrete more CSF under short days which could translate into a seasonal variation of CP synthesis of transporters.

In order to get a quick overview of the protein expression variability between CSF from ewes placed in short days (n=5) or in long days (n=5), (active and an inactive gonadotrope axis, respectively), biological samples were pooled for each condition and proteins were precipitated, concentrated[4] and included in polyacrylamide gel without protein fractionation. After in-gel tryptic digestion of the total protein extract, we analyzed peptides by nanoLC (Ultimate 3000 RSLC) coupled to high resolution mass spectrometry (LTQ velos Orbitrap instrument). Quantitative results obtained using Scaffold 3Q+ software for the spectral counting method and SIEVE 1.3 to retrieve the extracted ion chromatograms of ions (XIC) were compared and merged by focusing our attention on the differentially expressed (p-value < 0.05) proteins common between the two methods.

Among the 115 identified proteins and validated by the protein Prophet algorithm, 10 were more expressed in long days and 7 were more expressed in short days with the two label free methods. These proteins are involved in numerous functions (hormone transport, immune system, metabolism, angiogenesis…). Western Blot analyses are currently performed to confirm these data.

[1] *Thiery JC et al., J Pineal Res. 2006, 41:306-12.*
[2] *Adam C et al., Endocrinology 2006, 147 : 4589-98.*
[3] *Lagaraine C et al., Brain Res 2011, 1393 : 44-51.*
[4] *Chevalet M et al., Proteomics 2007, 7 : 1757-1770.*

P-071

PRIME-XS: A EUROPEAN PROTEOMICS INFRASTRUCTURE

Albert Heck[1], Kris Gevaert[2], Ralph Schlapbach[3], Jérôme Garin[4], Kathryn Lilley[5], Eduard Sabidó[6], **Lucrèce Matheron**[1], Reinout Raijmakers[1]

1 - Netherlands Proteomics Centre, Utrecht University, The Netherlands
2 - Flemish Institute for Biotechnology, Ghent, Belgium
3 - Functional Genomics Centre Zurich, ETH Zurich, Zurich, Switzerland
4 - CEA, Grenoble, France
5 - University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom
6 - CRG, Barcelona, Spain

PRIME-XS: A European Proteomics Infrastructure

The EU funded PRIME-XS consortium provides an infrastructure of proteomics technologies to the European biological and biomedical research community. It consists of twelve partners, distributed over Europe that together develop new technologies to better aid there search community in answering current day scientific questions. This includes the development, among others, bioinformatic tools to analyze large-scale proteomics data, and novel technologies to analyze protein interaction networks, post-translational modifications of proteins and more sensitive ways to detect protein and peptide biomarkers in complex samples. The consortium organizes a wide range of meetings, courses and training events to disseminate their knowledge and expertise.

The core of the project is formed by six access facilities, through which the consortium provides access to their technology, open to all researchers in Europe. Interested researchers can apply on the PRIME-XS website by submitting a short project proposal and selecting one of the access sites through an online application system at the PRIME-XS website (www.prime-xs.eu). All proposals are independently peer-reviewed by external scientists and judged on their feasibility and the suitability of the selected proteomics technology. If approved by the reviewers, the users are invited to execute the proposed proteomics experiments at the access site, together with local instrument operators.

The PRIME-XS project started early 2011 with a development phase. The first user projects were accepted for execution in August 2011 and by the beginning of 2012 already over 30 user projects had been accepted to the various access sites. The great interest shown by the European biomedical research community for this type of proteomics infrastructure shows the still growing need for the availability of state-of-the-art proteomics technology.

COMPREHENSIVE TARGETED QUANTITATIVE PROTEOMICS TAKING MULTIPLEXED ASSAYS TO A NEW LEVEL

Christie Hunter[1], Sean L. Seymour[1], **Cécile Busset**[2]

1 - AB SCIEX, Foster City, CA
2 - AB Sciex, Les Ulis, France

Novel Aspect: Validation of highly multiplexed targeted peptide quantification using MS/MSALL with SWATH™ Acquisition

Introduction

The extreme complexity and dynamic range of proteins in proteomic samples challenges traditional data dependent workflows to reproducibly and deeply interrogate the sample. Recent QqTOF innovations providing high speed acquisition of high resolution MS/MS spectra have enabled a new data independent acquisition strategy. In this workflow (called MS/MSALL with SWATH™ Acquisition), the Q1 quadrupole is stepped at 25 amu increments across the target mass range in 25 Da steps. Transmitted ions are fragmented in the collision cell and fragments are analyzed in the TOF MS Analyzer at high resolution. This is done in a LC cycle time, such that MS/MS spectra is acquired on every peptide in sample. High resolution XICs are then generated post-acquisition for quantification.

Methods

Human plasma was depleted of the top 14 proteins using a MARS14 depletion cartridge. Three other proteomes of increase complexity were also used. All samples were reduced, alkylated, and digested, providing a solution of ≈ 1 µg/µL. The samples were analyzed using the Eksigent nanoLC-Ultra® 2D System combined with the cHiPLC®-nanoflex system in Trap-Elute mode. Replicate injections were run to assess reproducibility of ≈ 500 ng of sample on column. The samples were analyzed using the MS/MSALL with SWATH™ Acquisition on a TripleTOF™ 5600 System, where Q1 was scanned from 400-1000 *m/z* in 25 Da steps and MS/MS was acquired from 100-1500 *m/z*. All data were processed using the beta processing plug-in within PeakView™ Software.

Preliminary Data

Validation of the quantitative limits of this technique is the focus of this work, using common proteomes of increasing complexity. MS/MS spectral libraries are first created from information dependent acquisitions that were processed with ProteinPilot™ Software. Working from these peptide MS/MS spectral libraries, XICs for target proteins and peptides were generated from the data independent dataset acquired using MS/MSALL with SWATH™ Acquisition. All samples were acquired using the same generic SWATH acquisition strategy, collecting high resolution (> 15,000) TOF MS/MS data. For depleted plasma, XICs to ≈ 650 peptides and 150 proteins were extracted and analyzed for peak area reproducibility across the multiple sample injections. Impact of extraction width on peak area %CV was explored. From the resulting ≈ 3900 XICs, 75% of the data has %CV below 20%, indicating very good reproducibility at high multiplexing. Summing of XICs and peptide to produce protein level data provided very high protein level reproducibility even on lower abundant proteins like CRP and fibronectin. As proteomes of increasing complexity were explored, there was a small decrease in the quantitative profile of the data. However, even for the cell lysate case where > 30,000 XICs for 5000 peptides and 1300 proteins were extracted and quantified, ≈ 65% of XIC raw peak area had reproducibility < 20%. Even though the Q1 isolation window is broader, the higher resolution MS/MS data provides good specificity for high quality quantitation on these complex proteomes, but with extremely high multiplexing levels because of the comprehensive nature of the dataset.

P-073

CARACTÉRISATION DE BIOMARQUEURS D'EXPOSITION À DES CANCÉRIGÈNES PAR ANALYSE PROTÉOMIQUE

Marianne Ibrahim[1,3], Lauriane Kuhn[2], Philippe Hammann[2], Z. Dagher[3], Ramez Chahine[4], Emmanuelle Leize-Wagner[1]

1 - Laboratoire de Dynamique et Structure Moléculaires par spectrométrie de Masse (LDSM2), Institut de Chimie, Université de Strasbourg, France
2 - Plateforme Protéomique de l'Esplanade, Université de Strasbourg, France
3 - Laboratoire de Biologie, Faculté des Sciences II, Université Libanaise, Liban
4 - Laboratoire de Physiologie, Faculté des Sciences Médicales, Université Libanaise, Liban

Présents en phases gazeuse et particulaire, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés bien représentatifs de la pollution atmosphérique. Leur toxicité est très variable : le Benzo(a)pyrène (BaP), classé groupe 1 selon le Centre International de la Recherche sur le Cancer, est cancérigène pour l'Homme tandis que le Benzo(e)pyrène (BeP), un composé ayant la même formule chimique que le BaP est classé groupe 3 comme étant non cancérigène pour les humains.

Dans cette étude, nous avons réalisé une analyse protéomique différentielle par approche gel 2D sur un modèle de cellules hépatiques (HepG2) exposées au BaP ou BeP. Cette analyse comparative contribue à la compréhension fine des processus des effets du BaP sur ce modèle. L'utilisation d'un contrôle négatif pertinent, le BeP, valide notre hypothèse de départ pour discriminer la réponse au BaP et non l'exposition à un stress chimique lambda. 28 spots d'intérêt ont été identifiés par spectrométrie de masse (MALDI TOF Bruker et Triple TOF 5600 AB Sciex). Ces protéines sont impliquées dans l'apoptose, la prolifération cellulaire, le transport, ainsi que dans des processus métaboliques et de biosynthèse. Les candidats trouvés peuvent-ils constituer de nouveaux biomarqueurs ? Parallèlement à cette approche sur protéome total, une étude complémentaire sur le secrétome est en cours de réalisation, basée sur le même design expérimental.

En perspective, nous souhaitons valider les biomarqueurs intéressants dans les milieux biologiques des populations exposées aux HAP, notamment chez des fumeurs, des agents de police exposés professionnellement aux HAP et des patients atteints de pathologies respiratoires.

[1] *IARC, (2008). Air Pollution, Part 1, Some Non-heterocyclic Polycyclic.*
[2] *Stastna and Van Eyk. Proteomics (2012); 12 : 1-14.*
[3] *Katada K, et al. Journal of proteomics (2012); 75 : 1803-1815.*

DIFFERENTIAL AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF BOVINE CUMULUS CELLS PROTEOMES IN RELATION TO DEVELOPMENTAL POTENTIAL OF ENCLOSED OOCYTE

Valérie Labas[1,2], Audrey Gargaros[1,2], Grégoire Harichaux[1,2], Ana-Paula Teixeira-Gomes[1,3], Lionel Lardic[2], Svetlana Uzbekova[1,2]

1 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours -Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France – Université de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France

In mammals, an oocyte is surrounded with cumulus cells (CC) which support its growth and maturation up to fertilization. CC and oocyte exchange different regulatory factors *via* gap-junctions and by secretion. During maturation, meiosis resumption in the oocyte is accompanied with cumulus expansion and extracellular matrix (ECM) formation. Differential expression of a number of genes in CC reflects the maturation stage of enclosed oocyte[1] and its capacity to embryo development after *in vitro* fertilization[2]. Here we compared proteomes of CC enclosing immature oocytes of prepubertal calves (IMP), of adult cows (IMA) and of mature oocytes after maturation *in vitro* (MIV) or *in vivo* (MAT). 10 µg of total protein extracts were resolved by SDS-PAGE and each gel track was sliced in 20 bands. After *in-gel* trypsin digestion, peptide extracts were analyzed in triplicate by nanoliquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LTQ velos Orbitrap instrument) with a high-low strategy. FTMS and IT-MS/MS data were confronted to IPI bovine databank using MASCOT search engine. Peptide and protein identifications were validated by the peptide and protein Prophet algorithm using Scaffold 3 software with a false discovery rate < 0.1%. To determine the level expression of proteins through the four physiological conditions, we used the Scaffold 3 Q+ quantitative module based on spectral counting method.

Among 2378 proteins identified in bovine CC, 177 proteins were differently represented between IMP/IMA, 472 between IMA/MAT, 291 between IMA/MIV, and 452 between MIV/MAT ($p < 0.05$). Moreover, 58 specific proteins were expressed only after maturation *in vivo* (not detected in IMA or MIV) such as "deleted in malignant brain tumors 1" or "lactotransferrin". Regarding the process of *in vivo* oocyte maturation, the comparison of GO terms of 278 up-regulated proteins in IMA and 165 in MAT revealed that regulation of transcription, chromosome organization, nuclear acid binding and nitrogen compounds metabolism were enriched in IMA; whereas protein and lipid binding, enzyme inhibitor and regulator activity, secretion and glycosylation site N-linked were enriched in MAT. All these data corroborated with functioning of CC in metabolic support for immature oocytes in IMA condition, and in production of ECM to prepare ovulation and fertilization in MAT. In conclusion, analysis of CC proteome revealed a number of novel protein factors related to oocyte maturation and quality.

[1] *Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. Mol Hum Reprod 2010;16: 531-538.*
[2] *Regassa A, Rings F, Hoelker M, Cinar U, Tholen E, Looft C, Schellander K, Tesfaye D. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. BMC Genomics 2011;12: 57.*

P-075

DIFFERENTIAL AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF SEMINAL PLASMA USING BOTTOM-UP, MALDI-TOF PROFILING AND TOP-DOWN APPROACHES

Valérie Labas[1,2], Marie Gaudin[1,2], Grégoire Harichaux[1,2], Ana-Paula Teixeira-Gomes[1,3], Guillaume Tsikis[2], Stéphane Ferchaud[4], Xavier Druart[2], **Nadine Gérard**[2]

1 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours -Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France – Université de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France
4 - INRA UEICP, Venours F-86480 Rouillé

We previously demonstrated by Intact Cells MALDI-TOF Mass Spectrometry (ICM-MS) that hypotonic resistance of boar sperm could be related to their protein composition[1]. At ejaculation, seminal plasma (SP) interacts with spermatozoa and modifies their hypotonic resistance[2]. We hypothesize that ICM-MS sperm profiles are linked to different SP protein composition. The aim of the present study was to compare the nature and amount of peptides/proteins present in SP from boars producing sperm with low or high hypotonic resistance. Therefore, two differential and quantitative proteomic approaches were performed.

On one hand, a bottom-up approach using SDS-PAGE and nanoLC-MS/MS (Ultimate RSLC system coupled to LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer) was performed with a "high-low" resolution MS strategy. All data were matched against NCBInr database using Mascot and identifications were validated by the peptide and protein Prophet algorithm using Scaffold software. To determine the differences in protein expression, spectral counting quantitative method was employed using Scaffold 3 Q+. Among all proteins identified, 8 proteins were differently represented between seminal plasmas associated with low and high sperm hypotonic resistance

On the other hand, a MALDI-TOF profiling approach was performed to detect endogenous peptides and small proteins present in the 2-20 kDa mass range. Desalted SP were spotted with sinapinic acid matrix and analyzed by linear MALDI-TOF MS. Data processing and statistical analysis (p value < 0.01, fold change > 2) were performed using MassLynx and Progenesis softwares, respectively. Among a total of 132 *m/z* visualized in the MALDI-TOF profiles, 34 were differentially expressed between seminal plasmas associated with high and low sperm hypotonic resistance. In order to identify them, a top-down proteomic approach was employed. FTMS and $FTMS^2$ data were matched against Uniprot "PIG house" database using Prosight PC software. Among the 131 *m/z* predominantly observed in the FTMS spectrum, 85 distinct molecular species were present in different charge states (3+ to 17+). Most belong to the protein family of the spermadhesins that are known to have glycosylated isoforms but other molecular species are still unknown.

In conclusion, in this study, a hybrid strategy combining bottom-up, MS profiling and top-down complementary proteomic approaches enabled characterization of peptide and protein biomarkers of boar reproductive efficiency.

[1] *Dewaele L, Tsikis G, Ferchaud S, Labas V, Spina, Teixeira-Gomes AP, Druart X, Gérard N 2011. Post epididymal maturation of boar spermatozoa. Reproduction in Domestic Animal 46 suppl2: 88 (abstract OC12).*
[2] *Druart X, Gatti JL, Huet S, Dacheux JL, Humblot P2009. Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility.Reproduction 137: 205-213.*

SEMEN CHICKEN PHENOTYPE USING MALDI-TOF PROFILING OF SEMINAL PLASMA OR EJACULATED SPERMATOZOA TO DISPLAY QUALITY SEMEN BIOMARKERS AND INTERACTIONS BETWEEN CELLS AND FLUIDS

Valérie Labas[1,2], **Marie-Christine Bourin**[4], Karine Cahier[1,2,4], Isabelle Grasseau[4], Ana-Paula Teixeira-Gomes[1,3], Jean Didier Terlot[4], Nadine Gérard[2], Elisabeth Blesbois[4]

1 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours -Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France – Université de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France
4 - INRA, UR 83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly France

We previously demonstrated that the semen quality of male chicken could be discriminated by Intact Cells MALDI-TOF Mass Spectrometry (ICM-MS) analysis of spermatozoa[1]. In the semen, the spermatozoa cells bath in seminal plasma (SP) and interact with the peptidic or proteic components[2]. Whereas the sperm cells profiles are linked to the SP protein composition, the aim of the present study was to compare the molecular profiles of ejaculated spermatozoa with the corresponding SP and to characterize interactions between cells and biological fluid.

SP was collected from 11 male chickens with variable semen quality. A MALDI-TOF profiling was performed on SP and spermatozoa, to detect peptides and small proteins (2-20 kDa mass range). Desalted SP were spotted with sinapinic acid matrix and analyzed by linear MALDI-TOF MS. Data processing and statistical analysis (p value < 0.01, fold change > 2) were performed using MassLynx and Progenesis softwares, respectively. Among a total of 174 *m/z* visualized in profiles, 91 were differentially expressed between seminal plasmas. Principal Component Analysis demonstrated variability between animals as previously observed during differential and quantitative analysis on whole spermatozoa. Good and bad semen qualities were also highly discriminated. Moreover, 15 peaks were common between cells and SP profiles. In order to identify them, bottom-up and top-down proteomic approaches have been employed.

On one hand, SP were analyzed using classical SDS-PAGE-nanoLC-MS/MS strategy (bottom-up) to have the most comprehensive inventory of peptides and proteins. On the other hand, SP were analyzed by LTQ Velos Orbitrap instrument to identify biomarkers revealed by profiling and not detectable by the previous method. top-down identifications and characterizations were done using ProSight PC software. Raw data were processed and confronted to an annotated chicken database. Several major peaks were formally identified by top-down analysis. Among these, different isoforms of the Avian β-defensin 10 (AvBD 10) were common between spermatozoa and SP.

In conclusion, for the first time, a molecular phenotype based on peptide/small protein spectral profile was performed on both spermatozoa and SP of male chicken semen. In this study, profiling allowed us to distinguish good or bad quality semen of male chicken. It also permits to display interactions between spermatozoa and the SP components and to identify them such as Avian β-defensins.

[1] *Labas V., Harichaux G., Grasseau I., Terlot JD., Teixeira-Gomes AP., Druart X, Gérard N., Blesbois E. Biomarkers of chicken sperm quality displayed by Intact Cells MALDI-TOF Mass Spectrometry. Congrès de spectrométrie de masse & Analyse Protéomique (SMAP), 19-22 septembre 2011, Avignon.*

[2] *Teixeira-Gomes AP., Dewaele L., Tsikis G., Gérard N., Druart X., Labas V. ICM-MS analysis to display specific protein interactions between cells (spermatozoa) and biologic fluid (seminal plasma). Congrès de spectrométrie de masse & Analyse Protéomique (SMAP), 19-22 septembre 2011, Avignon.*

P-077

TOP-DOWN PROTEOMIC STRATEGY TO IDENTIFY OOCYTE QUALITY BIOMARKERS REVEALED BY INTACT CELLS MALDI-TOF PROFILING

Valérie Labas[1,2], Audrey Gargaros[1,2], Ana-Paula Teixeira-Gomes[1,3], Véronique Cadoret[2,4], Fabrice Guerif[2,4], Dominique Royère[2,4], Svetlana Uzbekova[1,2]

1 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours -Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France – Université de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France
4 - Unité de Biologie de la Reproduction, CHRU Bretonneau, 37044 Tours

Intact Cells MALDI-TOF Mass Spectrometry (ICM-MS) was recently adapted on few cells biopsies of cumulus cells (CC) surrounding bovine and human oocytes before fertilization[1]. Reproducible mass fingerprints of such samples revealed several hundreds of peaks ranged between 3-25 kDa. A number of them varied between different physiological conditions in relation with oocyte capacity to develop into viable embryo[2] and might be considered as potential biomarkers of oocyte quality in assisted reproduction technology protocols.

To identify peptides or proteins differentially expressed, a bottom-up proteomic approach using SDS-PAGE and nanoLC-MS/MS was performed on bovine CC. Among all the identified proteins, 530 had molecular weight < 25 kDa. However, due to post-translational modifications no correspondence can be made between the theoretical mass of identified proteins and the experimental peak *m/z* value of species detected by ICM-MS[3]. Therefore, a top-down proteomic approach consisting to perform direct fragmentation of intact molecular species was carried out to obtain sequence and structural information. From 40 immature bovine Cumulus-Oocyte Complexes (COC) and CC from 12 mature human oocytes, protein/peptide extracts were desalted and concentrated with Zip Tip C4. Differential elution with acetonitrile was applied to fractionate and enrich small molecular species. Fractions were infused and analyzed by tandem high resolution (R 100,000) mass spectrometry using LTQ Velos Orbitrap instrument with CID/HCD/ETD fragmentation modes. Identification and characterization were done using ProSight PC software. Raw data files were processed by THRASH, and FTMS data were confronted to simple or highly annotated bovine or human databases using Absolute Mass or Biomarker search options. Several major peaks in bovine COC and human CC corresponding to thymosine family proteins were formerly identified. Moreover, N-terminal acetylation post-translational modification was displayed for all of them.

In conclusion, oocyte quality biomarkers revealed by differential and quantitative ICM-MS profiling could be identified using top-down proteomic approach. Thus, we have developed a hybrid strategy that required short sample preparation time, could be performed on less than 30 µg of polypeptides and allows characterization and identification of biomarkers in a mass range never studied by the classical proteomic approaches.

---

[1] *Labas V, Spina L, Gérard N, Cadoret V and Uzbekova S. ICM-MS profiling of human, equine and bovine cumulus cells to display markers implicated in oocyte maturation. 26éme congrès "Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique", 2009, Dijon, p. 291.*

[2] *Cadoret V ., Uzbekova S., Spina L., Puard V., Guerif F., Royère D., Labas V. 2010 Analyse protéomique du cumulus humain : une approche indirecte de la viabilité de l'embryon. XXIIIème Colloque Biotechnocentre, Seillac, 21-22 Octobre 2010.*

[3] *Uzbekova S, Spina L, Teixeira-Gomes AP, Labas V. (2011). From single cell MALDI-TOF profiling to protein identification in mammalian egg: integrative approach to study the oocyte quality. 27ème Congrès "Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique", 19-22 Septembre, Avignon, p. 113.*

APPROCHE QUANTITATIVE iTRAQ COUPLÉE À UNE ÉTUDE DE PHOSPHOPROTÉOME CHEZ *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

Marjorie Leduc[1], **Kévin Adam**[2], **Emmanuelle Sacco**[1], Virginie Salnot[1], Laila Sago[3], François Guillonneau[3], Cédric Broussard[1], Michel Arthur[1], Patrick Mayeux[1,2]

1 - Plateforme de Protéomique Paris Descartes (3P5)
2 - Institut Cochin, Dép. Immunobiologie et Hématologie
3 - LRMA, Équipe 12 UMR S 872

Contrairement aux cellules eucaryotes qui présentent un très grand nombre de phosphorylations sur de nombreuses protéines, le nombre de protéines phosphorylées est très faible chez les bactéries et leur analyse est particulièrement difficile. De plus, chez les bactéries, des phosphorylations sur des résidus d'acide aspartique et d'histidine existent en plus des résidus usuels (sérine, thréonine, tyrosine).

Notre étude porte sur la comparaison quantitative des protéines phosphorylées de 4 souches d'*Enterococcus faecium* présentant différents phénotypes de résistance aux antibiotiques. Le métabolisme de ces bactéries pathogènes ne permettant pas l'utilisation d'un marquage SILAC, nous avons choisi un marquage chimique post-digestion : l'iTRAQ.

Un protocole de purification globale des phosphopeptides a été mis au point. Dans un premier temps, ce protocole de purification implique une chromatographie SCX pour décomplexifier le mélange de peptides. Puis, chaque fraction subit une série de purifications sur IMAC-Fer et TiO_2 afin d'augmenter au maximum l'efficacité de récupération des phosphopeptides. Des colonnes de graphites sont utilisées avec des colonnes de C18 pour assurer une récupération maximale des peptides phosphorylés tout en s'assurant que les fractions éluées soient compatibles avec l'analyse par spectrométrie de masse qui suit. Le spectromètre de masse utilisé est un LTQ-Orbitrap Velos.

L'analyse MS/MS est réalisée à partir des différentes fractions à l'aide d'une méthode de fragmentation CID (MSA) + HCD compatible à la fois avec une bonne identification des phosphopeptides et une bonne détection des rapporteurs iTRAQ.

Le principal défi de ce projet réside dans le choix du logiciel d'analyse. En effet, Maxquant nous a permis de détecter les phosphopeptides marqués à l'iTRAQ (avec création d'une modification supplémentaire dans Andromeda) mais pas de les quantifier. A l'inverse, ProteinPilot nous a permis de détecter des phosphopeptides et de les quantifier. Cependant, on notera que Maxquant donne une localisation des phosphorylations plus fine que ProteinPilot. ProteomDiscoverer, quant à lui, est capable de détecter les phosphopeptides marqués à l'iTRAQ, de les quantifier et de donner des probabilités de localisation pour chaque phosphorylation. Dans ce poster, nous évaluerons la pertinence des résultats obtenus par ces divers logiciels.

P-079

POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF THE HBHA OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* REVEALED BY MASS SPECTROMETRY

Louise H. Lefrancois[1], **Ana-Paula Teixeira-Gomes**[1,2], Grégoire Harichaux[2,3], Christelle C. Bodier[1], Florence B. Gilbert[1], Thierry Cochard[1], Sophie Lecher[4], Dominique Raze[4], Camille Locht[4], Valérie Labas[2,3], Franck Biet[1]

1 - INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France – Université de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France
2 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours - Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France
4 - INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Univ Lille Nord de France Institut Pasteur de Lille, CIIL F-59021 Lille Cedex, France

The study of the virulence factors of pathogenic bacteria is essential to elucidate the mechanisms of pathogenicity but also for their use in prophylaxis. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) is the etiological agent of *paratuberculosis* or Johne's disease, a chronic enteric disease of ruminants led to significant economic losses in the bovine sector. Virulence mechanisms implemented by the bacteria remain largely unknown at the present time. In *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), the heparin binding hemagglutinin adhesin (HBHA) has been described as major virulence factor involved in the mechanism of extra-pulmonary spread which is a key step to the pathogenesis of MTB. When this protein is produced in native form its carboxyl-terminal domain contains methylations which are essential for inducing a protective response and also crucial to induce an immune response used for early diagnosis of tuberculosis. The objective of this study is to establish the biochemical characteristics of the adhesin HBHA homologue expressed by Map (map-HBHA).

Purification of the map-HBHA in its native form was done by a heparin sepharose affinity chromatography. The expression of the adhesin in the different collected fractions was verified by western-blot analysis using monoclonal antibodies. After digestion with trypsin of protein bands corresponding to HBHA, peptides were analyzed by an Ultimate 3000 RSLC nanoUHPLC coupled to a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer.

Mass spectrometry analysis allowed us to identify and characterize the HBHA expressed by Map for the first time. This analysis has revealed the presence of several post-translational modifications including acetylation on the N-terminal end of the protein and three sites of lysine methylation in the carboxyl-terminal domain of the protein.

The prospects of this work will seek to discover if these post-translational modifications play a role on the structure of the protein and on the induction of a cellular immune response.

OPTIMIZED DIGESTION PROTOCOL TO IMPROVE PROTEIN IDENTIFICATION IN IMMUNOPRECIPITATION EXPERIMENTS IN PROTEOMICS STUDIES

Thibaut Léger[1], Manuel Chapelle[1], Camille Garcia[1], Jean-Michel Camadro[1,2]

1 - Proteomics@IJM, Mass Spectrometry Core Facility, Institut Jacques Monot (IJM) - Université Paris Diderot - Paris 7, CNRS UMR7592 - Bâtiment Buffon, 15 rue Hélène Brion, 75205 Paris cedex 13, France
2 - Molecular and Cellular Pathology Program, Institut Jacques Monot (IJM) - Université Paris Diderot - Paris 7, CNRS UMR7592 - Bâtiment Buffon, 15 rue Hélène Brion, 75205 Paris cedex 13, France

Identification of multiple partners in protein complexes is a recurrent problem in proteomics studies. Enrichment in such complexes involve most of the time an immunoprecipitation step of the target protein and the identification of the co-immunoprecipitated proteins. Classical protocols involve generally a dedicated step aimed at eluting from the immunoadsorbant the proteins of interest. The commonly used strategies generally rely on either pH-dependant dissociation of the immune complexes or on a denaturation step followed (or not) by an SDS-PAGE fractionation of the eluted proteins.

In the present work, we evaluated the benefits of a simpler procedure based on a direct trypsic digestion of the immuno-complexes captured on protein A/G coated magnetic beads (Protocol A). We show that the protein identification efficiency is equivalent to that obtained when the beads are eluted using a strong base (Protocol B) and is far more efficient than any acidic elution (Protocole C) of the proteins before proteolytic digestion. However the proteome coverage using the three procedure presents up to 20% differences, with specific proteins identified only using a given digestion protocol.

As expected, a pre-fractionation into 5 (or 20) gel slices of the SDS-denaturated immune complexes on beads (Protocol D) gave the highest number of identified proteins. The analysis of the sum of the identifications using Protocols A, B and C showed only minor differences with that of Protocol D (5 slices).

In conclusion, our new optimized protocol A appears to be the most time/cost/benefice efficient of the different protocols tested, and is now used on a routine basis to analyze complex mixtures of proteins in immunoprecipitation experiments.

P-081

NOUVELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES ET DIAGNOSTIQUES DU CANCER ANAPLASIQUE DE LA THYROÏDE

Sophie Liuu[1], Veronica De Simone[2], Daniela Califano[2], Gennaro Chiappetta[2], Giovanni Chiappetta[1], Joëlle Vinh[1]

1 - Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, CNRS USR 3149, ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris, France.
2 - Functional Genomic Unit, National Cancer Institute, Fondazione G. Pascale, via M. Semmola, 80131 Naples, Italy

Le cancer anaplasique de la thyroïde (CAT), est l'un des cancers les plus graves chez l'être humain. La survie moyenne des patients atteints est de quatre à neuf mois après le diagnostic, et pour le moment, il n'existe pas de traitement curatif. Ce type de cancer se développe généralement chez des personnes ayant été exposées à des radiations pendant leur croissance, et chez des personnes ayant subi des carences en iode.

BAG3 est une protéine qui a une activité anti-apoptotique, elle assure la survie des cellules tumorales dans plusieurs types de tumeurs. Cette protéine est exprimée dans les carcinomes thyroïdiens, et plus particulièrement dans les CAT. Sa régulation négative conduit à l'apoptose des cellules du cancer de la thyroïde[1,2,3]. Dans cette étude, il s'agit de trouver les protéines, régulées par BAG3, impliquées dans la croissance des cellules cancéreuses et la métastase. Pour cela, nous avons dans un premier temps marqué la lignée cellulaire 8505C du CAT avec des isotopes (SILAC - Stable isotope labeling by amino acids in cell culture[4]). Puis, dans un deuxième temps, ces cellules ont été analysées par spectrométrie de masse tandem à haute résolution (QExactive, ThermoFisher Scentific). Les protéines sélectionnées seront dans la suite validées pour leur modulation et leur importance dans les cellules du CAT et d'autres cellules cancéreuses. Enfin leur activité biologique et leur utilisation potentielle comme cibles thérapeutiques seront évaluées.

Les résultats permettront de mieux comprendre les mécanismes de croissance et de dégradation métastatique dans le cancer anaplasique de la thyroïde, et d'identifier de nouvelles cibles pour le pronostic, les études thérapeutiques et le diagnostic.

[1] *Ammirante M. et al., Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(16):7497-502.*
[2] *Chiappetta G. et al., J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97(1):E115-20.*
[3] *Rosati A et al., Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(7-8):1337-42.*
[4] *Ong S. et al., Mol Cell Proteomics. 2002 ; 1(5):376-86.*

UTILIZATION OF LABEL FREE SPECTRAL COUNTING TO QUANTIFY THE PROTEINS INVOLVED IN THE VARIOUS PHASES OF CHICKEN EGGSHELL MINERALISATION

Pauline Marie[1], Valérie Labas[2,3], Grégoire Harichaux[2,3], Aurélien Brionne[1], Yves Nys[1], Joël Gautron[1]

1 - INRA, UR83 Recherches avicoles, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours -Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France

Avian eggshell is a natural bioceramic and a physical barrier against microbial contamination. It's formed in the uterus which secretes the mineral and organic precursors (components of uterine fluid). This calcium carbonate biomineral is well ordered. It's considered that its micro-structure and texture is determined by the organic matrix proteins which control the mineralization process and consequently its mechanical properties. Recent advances using high-throughput methods (transcriptomics and proteomics) have led to the identification of more than 500 proteins in the shell[1] and 600 uterine transcripts[2]. In this study, we report our tentative to further characterize the proteins controlling the process by quantification of proteins associated to the different phases of shell calcification, and more particularly those involved in initiation of the mineralization that is crucial to determine the texture and shell quality.

A quantitative proteomic study was performed on uterine fluid proteins collected at the three stages of eggshell mineralization. After *in gel* digestion, peptides were analyzed by nanoLC MS/MS using a LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer. Identifications, validations and spectral counting quantifications were performed with Mascot and Scaffold 3 Q+ softwares. We have identified and quantified about 100 different proteins (NCBI). Amongst them, 54 were found to be statistically abundant depending on the mineralization stages (ANOVA with $p < 0.05$). Analyses are in progress to establish their role in the calcification process by studying their functional domains, their described role in other milieu and their interaction with other molecules. Moreover, a peptidomic analysis using MALDI-TOF profiling and top-down approaches is currently developed to obtain the most comprehensive inventory of molecular species on uterine fluid.

In the present study, we characterize and quantify for the first time proteins present in each stage of mineralization, such as sulfhydryl oxidase 1 or gelsolin. The same determination will be carried out on eggshell proteins extracted at various stages of mineralization and on their corresponding transcripts using RNA sequencing. This strategy using recent advances in high-throughput technologies, and more particularly in quantitative mass spectrometry, should contribute to elucidate the eggshell calcification process to provide new tools to improve egg quality, and ensure an egg free of pathogens for consumer.

[1] *Mann, K. et al, 2006, Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer, Proteomics, 6 (13): 3801-3810.*
[2] *Jonchere, V. et al, 2010, Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg, Bmc Genomics, 11.*

P-083

NEW INSIGHTS INTO HUMAN CHK2 KINASE AUTOPHOSPHORYLATION SITES

Pauline Marteau[1], Nathalie Nozerand[1], Charles Marchetti[1], Jean-Charles Gaillard[1], Alain Dedieu[1], **Béatrice Alpha-Bazin**[1]

1 - CEA, iBEB, Service de Biochimie et Toxicologie nucléaire, Centre de Marcoule, F-30207 Bagnols-sur-Cèze

Human checkpoint kinase 2 (Chk2) is an important multi-functional player in the signaling pathways upon DNA damage (especially DNA double-strand breaks). Following DNA damage, activated Chk2 is able to phosphorylate a great variety of substrates involved in a great variety of signaling pathways including cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis, and senescence. Chk2 activation and regulation mechanisms are complex driven mostly by phosphorylation processes. In response to DNA damage, the phosphorylation of hChk2 at Thr68 by ATM* protein kinase leads to its full activation by autophosphorylation. In the absence of *de novo* DNA damage and during mitosis Chk2 autoactivation, has been attributed to oligomerization, reported in the event of increased Chk2 expression.

In a former study carried out on recombinant Chk2, as interestingly it could be purified as phosphorylated protein, numerous autophosphorylation sites were identified by mass spectrometry. We here report the impact of three of the newly discovered autophosphorylation sites on Chk2 enzymatic activity in term of autophosphorylation. Whereas phosphoenrichment and a multi-instruments approach (Maldi-TOF, IT, QqTOF, linear IT-ETD) had been previously used to face phosphorylation analysis, the results presented show the assets of the analysis on Orbitrap mass analyzer. The reliable accurate mass measurement turns out extremely useful for such challenging applications.

**Ataxia Telangiectasia-Mutated*

[1] *Bartek, J. and J. Lukas, Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. Cancer Cell, 2003. 3(5): p. 421-429.*

[2] *Stolz, A., Ertych N. and Bashtians H. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. Clin Cancer Res, 2011. 17(3): 401-405.*

[3] *Gabant G, Lorphelin A, Nozerand N, Marchetti C, Bellanger L, Dedieu A, Quéméneur E, Alpha-Bazin B, Autophosphorylated residues involved in the regulation of human Chk2 in vitro. J Mol Biol, 2008. 380(3): p. 489-503.*

ENABLING TOOLS FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE PROTEOMICS

Lucrèce Matheron[1,2,3,4], Serena Di Palma[1,2,3,4], Houjiang Zhou[1,2,3,4], Christian Frese[1,2,3,4], Mohammed Shabaz[1,2,3,4], Albert J.R. Heck[1,2,3,4]

1 - Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics Group, Utrecht University, the Netherlands
2 - Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, the Netherlands
3 - Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, the Netherlands
4 - Netherlands Proteomics Centre, the Netherlands

The success of proteomics builds on the development of a wide array of methods to delve ever deeper into the proteome. This poster gives an overview of some of the techniques available and/or developed in our laboratory for bottom-up proteomics studies and is centered on the peptide level.

Several tools are in place to access quantitative information on protein expression by mass spectrometry, including chemical stable isotope labeling. Stable isotope dimethyl labeling is a triplex method at the MS level, performed either in solution or on-column. It has been shown to allow quantification of more than 2500 proteins of 1 µg of a human cell lysate in a cost-effective manner, in combination with Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)[1].

Cellular lysates are often too complex to access under-represented subsets of a proteome. Off-line pre-fractionation steps have proved very powerful and we have explored several of these to reach deeper into the proteome. Among them, Strong Cation Exchange (SCX) separates the peptides according to their net charge. Therefore, it does not only reduce the complexity of a full lysate, but also allows access to peptide populations whose charge state differs from classical tryptic peptides, like phosphorylated and acetylated peptides. HILIC is another promising pre-fractionation method [1]. Further enrichment techniques can then be used, including TiO_2, IMAC-Ti(IV) or a second dimension of SCX, at a different pH, for phosphopeptides[2,3].

Identification and quantification of proteins requires the fragmentation of the digested peptides. In addition to the classical Collision Induced Dissociation (CID), alternative fragmentation techniques like Higher-energy Collision Dissociation (HCD) and electron-based method such as Electron Transfer Dissociation (ETD) are now emerging. These methods are highly complementary. For example, it was shown that HCD outperforms the others for doubly charged peptides, while ETD is particularly well suited for peptides with a higher charge state and for the study of post-translational modifications. This lead to the development of decision-tree regulated MS analysis combining these fragmentation techniques[4].

Specific experiments require specific combinations of the above-described tools, whereby the choice is often guided by the biological question. We make these tools and our expertise available through the European large-scale proteomics infrastructure PRIME-XS (http://primexs.eu/).

---

[1] Di Palma, S.; Raijmakers, R.; Heck, A. J.Mohammed, S. Evaluation of the deuterium isotope effect in zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography separations for implementation in a quantitative proteomic approach. Anal Chem 2011, 83(21), 8352-8356.

[2] Zhou, H.; Low, T. Y.; Hennrich, M. L.; Van der Toorn, H.; Schwend, T.; Zou, H.; Mohammed, S.Heck, A. J. Enhancing the identification of phosphopeptides from putative basophilic kinase substrates using Ti (IV) based IMAC enrichment. Mol Cell Proteomics 2011, 10(10), M110 006452.

[3] Hennrich, M. L.; Van den Toorn, H. W.; Groenewold, V.; Heck, A. J.Mohammed, S. Ultra acidic strong cation exchange enabling the efficient enrichment of basic phosphopeptides. Anal Chem 2012, 84(4), 1804-1808.

[4] Frese, C. K.; Altelaar, A. F.; Hennrich, M. L.; Nolting, D.; Zeller, M.; Griep-Raming, J.; Heck, A. J.Mohammed, S. Improved peptide identification by targeted fragmentation using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. J Proteome Res 2011, 10(5), 2377-2388.

P-085

CARACTÉRISATION DE DIFFÉRENTS SOUS-TYPES DE COMPLEXE BOTULIQUE A PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Valérie Morineaux[1], **Julien Enche**[2], Christelle Mazuet[3], Didier Hilaire[1]

1 - DGA Maîtrise NRBC - Département Toxicologie Générale et Analytique
2 - DGA Maîtrise NRBC - Département Analyse Chimique
3 - Institut Pasteur

L'analyse des locus botuliques par biologie moléculaire des souches de *Clostridium botulinum* de type A a permis la mise en évidence de différents sous-types de toxines A. Peu de travaux ont cependant été menés sur la corrélation entre ces génotypes ainsi mis en évidence et le phénotype des différentes souches productrices.

La caractérisation par spectrométrie de masse des différents sous-types de toxine botulique A a été effectuée sur des complexes obtenus suite à la purification partielle de différents sous-types de toxine botulique A par chromatographie gel filtration. Les échantillons semi-purifiés ont ensuite été fractionnés sur un gel d'électrophorèse 1D puis analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse après une étape de digestion trypsique sur gel. Les analyses ont été réalisées sur une chromatographie Dionex Ultimate 3000 équipée d'une colonne Dionex Pepmap 100 150 mm x 300 µm x 5 µm, couplée à un spectromètre de masse Bruker Esquire 3000+. Les données ont été acquises en mode MS/MS automatique et envoyées vers MASCOT pour la recherche des protéines dans la base de données NCBInr.

Six différents sous-types ont été caractérisés : A1, A2, A3, deux différents A1(B) et A1Ha-. Une souche de Clostridium sporogenes a été utilisée comme témoin négatif puisqu'elle ne produit pas de complexe botulique.

Les résultats obtenus montrent la présence de toutes les protéines attendues des complexes des sous-types A1 (neurotoxine, NTNH et hémagglutinines), A1Ha- et A2 (neurotoxine et NTNH). La neurotoxine du sous-type A3 n'a pas été mise en évidence bien que sa présence ait été préalablement confirmée par expérimentation animale. Par ailleurs, seule une identification partielle des protéines attendues a été obtenue pour les deux complexes de sous types A1(B) (hémagglutinines non détectées).

L'analyse par Western Blot de ces mêmes échantillons a cependant permis de valider la présence du complexe de sous-type A3 (neurotoxine et NTNH) ainsi que celle des hémagglutinines des souches A1(B), témoignant ainsi d'un manque de sensibilité de la méthode.

Des travaux sont actuellement en cours pour tenter d'identifier toutes les protéines des sous-types A3 et A1(B) par spectrométrie de masse.

[1] *Dover, N., J. R. Barash, et al. (2009). "Novel Clostridium botulinum toxin gene arrangement with subtype A5 and partial subtype B3 botulinum neurotoxin genes." J Clin Microbiol 47(7): 2349-50.*
[2] *Marshall, K. M., M. Bradshaw, et al. (2007). "Plasmid encoded neurotoxin genes in Clostridium botulinum serotype A subtypes." Biochem Biophys Res Commun 361(1): 49-54.*
[3] *Smith, T. J., K. K. Hill, et al. (2007). "Analysis of the neurotoxin complex genes in Clostridium botulinum A1-A4 and B1 strains: BoNT/A3, /Ba4 and /B1 clusters are located within plasmids." PLoS One 2(12): e1271.*

MÉCANISMES ÉCOPHYSIOLOGIQUES: UN NOUVEAU CHAMP D'APPLICATION DES STRATÉGIES PROTÉOMIQUES

Marine Plumel[1], Danièle Thiersé[1], Alain van Dorsselaer[1], François Criscuolo[1], Fabrice Bertile[1]

1 - Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, UdS, CNRS, Strasbourg, France

L'écophysiologie évolutive étudie l'adaptation des organismes aux conditions environnementales. Les êtres vivants évoluent dans un environnement où l'énergie disponible est limitée. Or le succès de la reproduction des animaux implique d'y allouer une grande quantité d'énergie (effort reproducteur), qui n'est alors plus disponible pour d'autres fonctions essentielles de l'organisme. Ceci pourrait induire des « coûts » (réponses délétères) pour l'organisme et ainsi compromettre son intégrité et sa survie.

L'objectif de ce projet était d'évaluer les réponses hépatiques engendrées par un effort reproducteur variable, en comparant des souris allaitant un nombre plus ou moins grand de jeunes. Le foie est en effet le carrefour clé du métabolisme et il est très sensible à tout changement métabolique et oxydatif.

Pour faire varier l'effort reproducteur, la taille des portées de plusieurs souris a été manipulée afin de constituer un groupe de souris contrôle (non manipulé), un groupe de souris « à effort de lactation réduit » et un groupe de souris « à effort de lactation augmenté ». Les trois protéomes hépatiques ont été comparés par 2D-DIGE et analyses nanoLC-MS/MS. L'identification des protéines a été réalisée à partir des moteurs de recherche OMSSA et Mascot simultanément. La banque de données « target-decoy » utilisée, extraite à partir de NCBInr (taxonomie : *mus musculus*), ainsi que les recherches OMSSA et l'extraction des annotations fonctionnelles des protéines ont été générés à partir de notre interface "Mass Spectrometry Data Analysis" (msda.unistra.fr).

Près de 400 spots protéiques ont été étudiés. 486 protéines uniques ont été identifiées avec un taux de faux positif inférieur à 1%. Sept spots protéiques, contenant 9 protéines distinctes, avaient une intensité différant statistiquement entre les trois groupes (Anova + tests de Tukey ; $p < 0.05$). L'extraction des annotations fonctionnelles des protéines identifiées dans ces spots montre qu'elles sont impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des sucres et des composés séléniés, ainsi que dans la réponse immunitaire et l'homéostasie calcique. Notre étude suggère donc que le stress oxydatif, précédemment décrit dans la littérature comme principal coût de la reproduction n'est pas le seul processus susceptible d'être influencé par l'effort reproducteur. Les variations identifiées dans ce projet seront validées par Western-Blot.

[1] *Harshman, Zera, The cost of reproduction: the devil in the details, Trends in Ecology and Evolution,2006, 22(2):80-86.*

P-087

ANALYSES PROTÉOMIQUE ET PEPTIDOMIQUE DES INTERACTIONS TIQUE / *BORRELIA* / PEAU

Gilles Schnell[1], Amandine Boeuf[1], Aurélie Kern[2], Frédéric Schramm[2], Véronique Delval[1], Elody Collin[2], Benoît Jaulhac[2], Nathalie Boulanger[2], Laurence Sabatier[1]

1 - Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO), Département des Sciences Analytiques (DSA), Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), ECPM, Strasbourg
2 - Physiopathologie et médecine translationnelle: groupe Borréliose de Lyme, Facultés de Pharmacie et de Médecine, Strasbourg

La Borréliose de Lyme, due à la transmission de la bactérie *Borrelia burgdorferi sensu lato*, est la maladie vectorielle la plus répandue dans l'hémisphère nord.

Après inoculation par piqûre de tique, une inflammation cutanée apparaît au niveau du site de piqûre, suivie de diverses manifestations cliniques (cutanées, neurologiques ou articulaires…). Ces différentes manifestations pourraient être liées à des facteurs de virulence spécifiques de certaines souches de *Borrelia*. L'infection par l'intermédiaire d'une tique est plus pathogène que l'infection par inoculation des bactéries à l'aide d'une seringue. Ceci peut être dû à l'effet immunomodulateur d'extraits de glandes salivaires. Notre objectif est d'identifier à la fois des facteurs de virulence bactériens et des molécules de tique qui favorisent l'infection bactérienne.

D'une part, nous avons réalisé une analyse différentielle protéomique de 3 souches de *Borrelia* de différentes virulences. Après extraction, séparation sur gel SDS PAGE, découpe systématique et digestion, le contenu protéique est analysé par nano-LC-MS/MS. Cette stratégie a permis l'identification de plus de 700 protéines par souche, dont 80 protéines spécifiques à la souche la plus virulente. L'utilisation combinée de deux moteurs de recherche (Mascot et OMSSA) a augmenté sensiblement le nombre d'identifications. Des analyses par RT-PCR sont en cours pour étudier l'expression de protéines d'intérêt au niveau cutané.

D'autre part, nous avons mis au point une méthode d'analyse par RP-HPLC d'extraits de glandes salivaires de tiques. Des tests ont été réalisés sur les fractions collectées et ont révélés des activités intéressantes sur des cellules de peau. L'identification des molécules contenues dans ces fractions est en cours par MS et MS/MS.

MALDI-TOF PROFILING OF FOLLICULAR FLUIDS FROM VARIOUS MAMMALIAN SPECIES

Ana-Paula Teixeira-Gomes[1,3], Valérie Labas[1,2], Audrey Gargaros[1,2], Kathy Soutonie[1,2], Nadine Gérard[2], Karine Reynaud[4], Svetlana Uzbekova[1,2]

1 - INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs, F-37380 Nouzilly, France
2 - INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements - UMR CNRS 7247 – Université de Tours - Institut Français du Cheval et de l'Équitation, F-37380 Nouzilly, France
3 - INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly France – Université de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France
4 - UMR 1198 INRA-ENVA, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France

Follicular fluid (FF) is the *in vivo* environment of mammalian oocytes during their growth and maturation in antral ovarian follicles. The FF is a complex biological medium comparable to blood plasma. It contains a variety of compounds that includes proteins, lipids and metabolites that may all play a role in giving the oocyte a capacity to ovulate and give an embryo. A number of proteins have been isolated and identified in FF using conventional bottom-up proteomic approaches[1], with or without depletion techniques[2]. The knowledge of polypeptides content in FF can be expected to provide information on oocyte environment that may then benefit *in vitro* fertilization techniques and assisted reproduction technologies (ART) in humans and in domestic animals. However, small molecular species (< 20 kDa) were not enough investigated.

Our first objective was to obtain characteristic peptide/protein profiles of FF from several mammalian species, using linear MALDI-TOF mass spectrometry profiling. Fluids from bovine, human, equine, canine and porcine follicles were desalted using solid-phase extraction (SPE). However, the SPE strategy applied to crude FF samples was proved to be poor due to the presence of highly abundant proteins originating from plasma. To obtain a better mass fingerprint, we developed a sample preparation procedure involving the depletion of high molecular weight proteins and the enrichment in small molecular species using ultrafiltration. After optimization of microscale sample preparation on bovine FF, we applied this technique to FFs from other species and obtained characteristic FF's profiles for each of them. Based on the data generated by this procedure, we investigated the differences in FF's profiles between the species which differ in ovulation and *in vitro* oocyte maturation rates. Our objective was to optimize ART procedures used prior to *in vitro* fertilization.

In conclusion, due to its complexity profiling of FF was a challenge, and the procedure reported here gave us a chance to obtain for the first time a mapping of peptides and small proteins in mammalian FF. Due to the large amount of biological materiel available, identification of species could be performed using a top-down approach. In perspective, differential analysis of FFs from individual follicles of different size and physiological stages will be carried out in order to comprehend the mechanisms in the final steps of oocyte maturation and ovulation in different species

[1] *Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P, Di Ilio C. Proteome analysis of human follicular fluid. Biochim Biophys Acta. 2006 Nov;1764(11):1775-85.*
[2] *Fahiminiya S, Labas V, Dacheux JL, Gérard N. Improvement of 2D-PAGE resolution of human, porcine and equine follicular fluid by means of hexapeptide ligand library. Reprod Domest Anim. 2011 Jun;46(3):561-3.*

P-089

FAST MICROBIAL LYSIS AND PROTEIN DIGESTION PROTOCOL FOR PEPTIDES ANALYSIS BY LC-ESI MASS SPECTROMETRY IN MRM MODE

Laurent Veron[1], Véronique Lanet[3], Myriam Cubizolles[3], Marie-Hélène Charles[1], Thibault Champion[1], Hervé Rostaing[2], Agnès Dupont-Fillard[2], Florence Rivera[3], Frédéric Mallard[3], Patrick Broyer[2], Christine Peponnet[3], Yannick Charretier, Jean-Philippe Charrier[1], Gaspard Gervasi[1]

1 - bioMerieux S.A, chemin de l'Orme, Marcy L'Étoile, 69280 France
2 - bioMerieux S.A, 5 rue des Berges, Grenoble, 38 000 France
3 - CEA-Leti, MINATEC Campus, 17 rue des Martyrs, Grenoble Cedex 9, 38054 France

Within a few years, MALDI-TOF Mass Spectrometry has revolutionized the conservative practices of clinical microbiology laboratories enabling the fast bacterial species identification from isolated colonies on agar plates or from processed blood cultures. The direct identification from other body fluids (*e.g.* pathogenic urines) should be feasible but some hurdles (like low bacterial load, polymicrobial samples) still need to be solved. Bacterial identification by MALDI-TOF MS consists in acquiring a protein mass spectrum from whole microbes and comparing the obtained peak pattern with a proprietary spectral library using interpretation algorithms. Shorter time to results for identification, cost savings, reduction of laboratory waste have convinced clinicians that MALDI-TOF MS could change microbiology[1]. Currently, MALDI-TOF MS is essentially used for identification. Other potential applications like typing, antimicrobial susceptibility testing (AST) and microbial virulence are described in literature but the MALDI-TOF technology might be not generic enough. However, it is believed that other innovative Mass Spectrometry approaches could allow typing, AST and microbial virulence determination. Our approach to get typing, resistance, virulence (TRV) information from an unknown sample is based on LC-ESI MS technology. Fast bacterial identification, typing, resistance, virulence information could be obtained by searching targeted specific peptides using Multiple Reaction Monitoring. For that purpose, extraction of proteins from microorganisms is needed and a fast digestion protocol is required to generate tryptic peptides. Usually, chemical lysis with acids, surfactants or chaotropes is used to promote protein extraction from micro-organisms but these chemicals often become an issue for the following steps: pH incompatibility for trypsin digestion, partial enzymatic inhibition by high chaotropic agent concentrations, ionization suppression in MS by ionic surfactants. Other lysis techniques are described in literature (pressure[2], freeze-thaw cycles, ultra-sounds[3]). In addition, to get a complete protein digestion, reaction is usually performed overnight. Here we described a 30 minutes protocol combining an ultrasound-assisted lysis with beads enabling a fast and efficient protein digestion.

[1] *Gaillot O, Blondiaux N, Loïez C, Wallet F, Lemaître N, Herwegh S, Courcol R.J. J Clin Microbiol. 2011; 49 (12):4412.*
[2] *Smejkal G.B., Robinson M.H., Lawrence N.P., Tao F., Saravis C.A., Schumacher R.T., J Biomolecular Techniques. 2006;17:173-175.*
[3] *Taylor M.T., Belgrader P., Furman B.J., Pourahmadi F.,Kovacs G.T.A., Northup M.A., Analytical Chemistry, 2001, 73, 492-496.*

CHARACTERIZATION OF MEMBRANE-PROTEINS BY INTERFACING NANOLC NESI MS/MS AND MALDI MS/MS ANALYSIS: MAXIMIZING THE INFORMATION OBTAINABLE IN A SINGLE LC-MS EXPERIMENT

Kees Vlak[2], Frank Porbeck[2], Hao Xie[1], Hartmut Michel[1], Julian D. Langer[1],

1 - Max-Planck-Institute of Biophysics, Frankfurt (Germany)
2 - Advion Ltd., Harlow (UK)

Conclusions

A combined platform for online nESI spray and MALDI sample spotting for LC-MS/MS offers a convenient way to maximize the amount of sequence information that can be derived from a single LC-MS experiment.

Introduction

In the recent years, mass-spectrometry based analyses of membrane proteins have developed substantially. Various strategies have been implemented for obtaining sequence information on hydrophobic transmembrane domains: using different proteinases to obtain alternative peptides in domains that are inaccessible to proteolytic cleavage by standard enzymes, performing digests in solution with organic solvents or modifying peptides with chemical compounds for better ionization efficiencies. The ionization of these peptides was usually done with either ESI or MALDI sources, as both techniques ionize complementary sets of peptides. Here we describe a fast and robust technique that allows on a single platform parallel online MS data acquisition using a chip-based nanoelectrospray ionization source and simultaneous sample spotting for subsequent MALDI analyses.

Methods

Selected membrane proteins were submitted to proteolytic cleavage by different proteinases. Both in-gel and in-solution digestions peptides were separated using reverse-phase nanoLC systems. A post column split on the TriVersa NanoMate system was used for online-nESI-MS/MS analysis and simultaneous fraction collection of the other part of the nanoLC-flow directly on a MALDI target for offline MS/MS analysis. The flow on the micro-fabricated nano ESI chip was approx. 100 nL/min and coupled to a Bruker maXis ESI-q-TOF mass spectrometer. Fractions were deposited every 20 sec directly onto a prespotted 384 AnchorChip MALDI target and selected spots were analyzed on a Bruker Autoflex III Smartbeam MALDI-TOF/TOF mass spectrometer.



Imagerie

MAPPING THE LIPID COMPOSITION IN MOUSE BRAIN BY LIQUID EXTRACTION SURFACE ANALYSIS

Reinaldo Almeida[1,2], Zane Berzina[1], Peter Husen[1], Johannes Vogt[2], Hans Kristian Hannibal-Bach[1], Jan Baumgart[2], Robert Nitsch[2], Christer Ejsing[1]

1 - University of Southern Denmark - Department of Biochemistry and Molecular Biology - Odense, Denmark
2 - Advion Ltd. - Harlow, UK
3 - Institute for Microscopical Anatomy and Neurobiology - Mainz, Germany

Lipids can perform structural and functional roles within the body and are known to be important mediators of cell signaling. One of the most lipid-rich organs is the brain, and lipids account for approximately 50% dry weight. Deregulation in lipid metabolism in the brain is commonly associated with many disorders and diseases including schizophrenia, Alzheimer's and Parkinson's diseases. Mass Spectrometry Imaging techniques permit the direct scanning of tissue slices without losing the precise anatomical localization, which is of importance to understand the physiopathology of the different lipid species in central nervous system.

Here we demonstrate the analysis of mouse brain tissue by Liquid Extraction Surface Analyses improving the lipid coverage and number of quantified lipid species using successive switching between acquisition polarity modes.

Frozen Mice brain tissue, horizontally sliced in 15 µm thickness and placed onto a glass slide, was analyzed on a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer equipped with a TriVersa Nanomate ion source. Lipids were automatically micro extracted using 0.5 µL extraction solvent spiked with Lipid standards, and infused at a flow rate of 40 nL/min. MS Spectra were acquired by multiple overlapping segment range acquisition (200-550, 500-1000, 950-2000 *m/z*) with a target mass resolution of R=100,000 at *m/z* 400 in both polarity modes. MS/MS fragmentation was performed by data-dependent selection of the 10 most intense peaks in the segment range using dynamic exclusion. Each extract was acquired for 3.75 min in positive Ion mode and 3.75 min in negative Ion mode, with parallel Top 10 MS/MS acquisition, resulting in a total analyses time of 8 min. We also allow 0.5 min for signal stabilization between the polarity changes. This result in more than 500 MS/MS scan events per acquisition. For quantitative analyses the extraction solvent was spiked with a yeast specific Lipid standard mixture containing only Lipids, which are not expected to be detected in the brain tissue. Different regions of mice brain where analyzed and compose of mainly saturated and mono unsaturated Phosphatidylcholines and Phosphoethanolamines. Diacylglycerols, Phosphatidylserines and Phosphatidylinositol were detected in the negative Ion mode. Sphingolipids like Ceramides, Hexocylceramides and Sulfatide species could also be monitored as well as Phosphatidylinositol phosphate (PIP), which plays an important role in lipid and cell signaling and membrane trafficking.

[1] *Schuhmann K, Almeida R, Baumert M, Herzog R, Bornstein SR, Shevchenko A: Shotgun Lipidomics on a LTQ Orbitrap mass spectrometer by successive switching between acquesition polarity modes. Journal of Mass Spectrometry 2012;47(1):96-104.*
[2] *Lu A, Waanders LF,Almeida R,Li G, Allen M, Cox J, Olsen JV, Bonaldi T, Mann M: Nanoelectrosprayt peptide mapping reviseted: Composite survey spectra allow high dynamic range protein characterization without LCMS on an orbitrap mass spectrometer. International Journal of Mass Spectrometry 2007;(268)2-3;158-167.*
[3] *Kertesz V, VanBerkel GJ: Fully automated liquid extraction-based surface sampling and ionization using a chip-based robotic nanoelectrospray platform. Journal of Mass Spectrometry 2009 45(3) 252-60.*

P-092

APPLICATION DE L'IMAGERIE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE TOF-SIMS À L'ÉTUDE DE VÉGÉTAUX : ÉTUDE DE MÉTABOLITES DE BOIS DE *DICORYNIA GUIANENSIS*

Claudia Bich[1], Nadine Amusant[2], David Touboul[1], Didier Stien[1], Alain Brunelle[1]

1 - Centre de Recherche de Gif, Institut des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse 91198 Gif-sur-Yvette cedex
2 - CIRAD-UMR Ecofog, 2091 Route de Baduel, BP 792, 97337 Cayenne cedex

Bien que l'analyse de composés organiques d'origine végétale soit déjà établie, leur analyse directe en surface reste délicate et peu répandue, principalement à cause de la difficulté de la préparation de l'échantillon. Dans cette étude préliminaire, un spectromètre de masse TOF-SIMS équipé d'une source d'agrégats de bismuth (Bi_3^+) a été utilisé pour acquérir des images ioniques de coupes de bois. Cette technique d'imagerie par spectrométrie de masse ne nécessite aucun prétraitement de l'échantillon et n'est pas destructive. Il est alors possible de cartographier un composé à la surface d'une coupe de tissu.

Les coupes transversales de 30 µm d'épaisseur de bois de *Dicorynia guianensis Amshoff* (*Leguminosae*), un arbre de Guyane française, ont été conservées entre deux lames de verre jusqu'à l'analyse. Ces coupes ont été fixées sur des lames ITO (lame en verre rendue conductrice par un dépôt de moins de 10 nm d'oxyde d'indium et d'étain) à l'aide de ruban adhésif double face conducteur. Les coupes ont été installées les unes à côté des autres selon leur orientation et la position radiale d'origine (de l'aubier externe vers le duramen interne) sur une même lame. Le même type d'image a été acquis dans chaque région et les spectres ont été superposés afin de détecter des différences métaboliques entre les différents tissus.

De ce fait, il a été possible de repérer des ions caractéristiques d'un composant principal du bois, la lignine, et même plus précisément 3 types de lignines (selon la nature du monomère) la G, la H et la S-lignine. Pour chaque type de lignine, il existe un ou plusieurs ions spécifiques ; deux fragments caractéristiques de la S-lignine ont une différence de masse exacte très faible (Δ=0,03 Da) et la résolution du ToF-SIMS ne nous a pas permis de conclure quant à la présence d'un seul. Dans le cas de la H-lignine, les deux espèces possibles ont été détectées et localisées selon le plan ligneux et selon le type de tissus. Dans la partie la plus externe du bois, l'aubier, des lipides tels que les diacylglycérols ou les acides gras, en particulier le C16:0, ont été détectés. L'étude porte aussi sur la localisation d'un métabolite particulier de ce bois, la tryptamine, qui conduit en TOF-SIMS à 2 fragments significatifs, obtenus après analyse du standard en mode positif. La tryptamine a donc pu être détectée à la surface des coupes de bois et localisée préférentiellement dans le duramen externe.

EVALUATION DE LA PERMÉABILITÉ DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE PAR IMAGERIE MALDI : APPLICATION À L'ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ D'UN TRAITEMENT DU GLIOBLASTOME

Grégory Hamm[1], David Bonnel[1], Olivier Keunen[2,3], Fred Fack[2,3], Simone Niclou[2,3], Jonathan Stauber[1]

1 - ImaBiotech, MALDI Imaging Dept., Parc Eurasanté, 885 Rue Eugène Avinée, Loos, France
2 - CRP Santé, Luxembourg, Luxembourg
3 - Norlux, Luxembourg, Luxembourg

Le développement de médicaments ciblant une tumeur au niveau du cerveau représente un challenge car ces derniers doivent être capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (Blood Brain Barrier en anglais ou BBB). Cette barrière physiologique sépare la circulation sanguine du liquide céphalo-rachidien. Elle protège le cerveau des agents pathogènes, des toxines et des hormones circulant dans le sang, mais peut également, limiter la pénétration de certains médicaments visant la tumeur. L'évaluation de la perméabilité de la BBB aux médicaments d'intérêt est un facteur critique de mesure d'efficacité du traitement. Dans ce contexte, l'imagerie par spectrométrie de masse (MSI), largement utilisée dans l'étude du système nerveux central depuis ses premiers développements, peut apporter certaines informations à cette problématique. L'amélioration constante des résolutions spatiales accessibles durant l'expérience de MSI rend possible l'analyse de très fines structures biologiques comme peut l'être la BBB. Tout d'abord et afin d'obtenir un modèle d'étude de la BBB, des marqueurs positifs (Diazepam) et négatifs (Aténolol) du passage de cette dernière ont été suivis directement sur le tissu à proximité des vaisseaux sanguins après administration. Afin de localiser le plus finement possible ces vaisseaux sanguins, un marqueur spécifique des cellules endothéliales (Anticorps CD31) est également utilisé. La distribution de l'anticorps est réalisée parallèlement via MSI et microscopie à fluorescence sur des coupes adjacentes. Par la suite, nous avons voulu appliquer ce modèle à l'étude d'un médicament connu. Notre choix s'est porté sur le Temozolomide (TmZ). Ce principe actif anticancéreux est indiqué pour traiter un glioblastome multiforme nouvellement diagnostiqué en association avec la radiothérapie. Sa distribution ainsi que celle de son principal métabolite (le MTIC) a été évaluée dans le tissu par imagerie MALDI, ces médicaments devant cibler spécifiquement la zone tumorale au niveau du cerveau et ainsi améliorer l'efficacité du traitement et diminuer leur toxicité. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence d'un traitement anti angiogénique (empêchant la fabrication des vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs cancéreuses) sur l'efficacité du TmZ. En effet, ce traitement peut influencer l'action du TmZ en entrainant une normalisation morphologique des tissus les rendant plus imperméables et diminuant ainsi la pénétration des médicaments. Dans un dernier temps, la recherche de biomarqueur spécifique de la zone cancéreuse ou des métabolites associés au traitement anti cancéreux a été effectuée. Ces travaux offrent une vision nouvelle de l'évaluation des traitements ciblant les tumeurs cérébrales.

Métabolomique, Glycomique, Lipidomique

IN VITRO METABOLISM IN MOUSE LIVER MICROSOMES OF NOVEL PRODRUGS FOR MELANOMA TARGETING AND STRUCTURAL ELUCIDATION METABOLITES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY METHOD

Mathieu André[1], Marie-Joëlle Couret[1], Sébastien Tarrit[1], Éric Debiton[1], Jean-Michel Chezal[1], Emmanuelle Mounetou[1], **Marie-Josèphe Galmier**[1]

1 - UMR 990 Inserm/Université d'Auvergne, Imagerie moléculaire et thérapie vectorisée, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Malignant melanoma is a major public health problem in many countries and its rates are dramatically increasing worldwide[1]. Metastasis and resistance account for the poor response to existing treatments and the associated high mortality. Since standard therapies like radiotherapy or monochemotherapy only have response rates around 10%, combined treatments lead to higher response rate but without significantly improving the survival. The lack of specificity of these therapies has steered research on melanoma treatments and targeted chemotherapy approaches that could allow delivering higher doses to the tumor with less toxicity on healthy tissues.

The aim of this work is to design melanoma-targeting prodrugs with selective intra-tumoral release.

We evaluated a first generation of prodrugs which include:

● Drug: iododeoxyuridine (IUdR). This antimetabolite, analogue of the thymidine nucleoside will be used as a model of drug for the preliminary *in vitro* and *in vivo* evaluation. 3' and 5' substitution of IUdR would block its DNA incorporation. Moreover, the iodine atom allows radiolabelling and DNA incorporation assessment by radioactive counting.

● Melanin-targeting ligand. Our laboratory developed potent melanoma-seeking agents. One of these compounds named $^{[131]}$I ICF01012 displayed a high and long-lasting concentration in the melanosomes (the melanin-producing organelle), suitable for targeted chemotherapy approach[2].

● Cleavable linker. To avoid melanosomal sequestration of the drug, spacers controlling its release using particular physicochemical properties (melanosomal acidity) or action of enzymes such as esterases or hydrolases are requested

Microsomal metabolites were analyzed by liquid chromatography combined with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Up to six metabolites were found in mouse liver microsomes incubations and their structures have been proposed using mass spectra and mass shifts from parent compounds. The metabolites resulted of both deiodinations and N-dealkylations (of ethyl chain and linker).

[1] *Thompson et al., Lancet 2005, 365, 687-701.*
[2] *Chezal et al., J. Med. Chem. 2008, 51, 3133-3144.*

P-095

EVALUATION OF CELLULAR DISRUPTION TECHNIQUES TO STUDY METABOLITES IN UNICELLULAR ALGAE BY LC-MS

Sandrine Cudré[1], Séverine Le Faucheur[2], Vera Slaveykova[2], Emmanuel Varesio[1], Gérard Hopfgartner[1]

1 - Life sciences mass spectrometry, University of Geneva
2 - Institute F.A. Forel, University of Geneva

Phytoplankton is often used as biological model to evaluate the impact of a pollutant in the environment. Amongst the studied species, *Chlamydomonas reinhardtii*, a unicellular alga belonging to the family *Chlorophyceae*, has been widely used notably in the "-omics" fields. Due to their rigid layered cell wall, this type of unicellular species is very difficult to lyse and harsh techniques (*e.g.*, manually with mortar and pestle) have to be used to retrieve intracellular content.

In the present study, we examined the effect of three disruptions techniques to analyze the algal metabolites content by LC-MS for metabolomic investigations. The three techniques tested were: manual lysis, mill mixing and sonication with a micro-probe. At mid-exponential growth phase, algal metabolic activity was rapidly quenched by mixing the sample aliquots with a cold (-70°C) 70% methanolic solution. Algae were centrifuged, reconstituted, or lyophilized. Then a disruption technique was applied to optimize cell lysis. The performance of the different cell disruption protocols was evaluated by flow cytometry, a technique that uses scattered laser light and fluorescence to provide information about cell size, shape and surface features of studied cells. Thus, the decrease of cell size and chlorophyll fluorescence of algae before and after the treatment allowed us to quantify the yield of disruption.

Metabolites extracts were then analyzed by LC-MS, the sample being separated using a gradient elution on a C18 reversed-phase column and detected with a high resolution mass spectrometer. The best conditions obtained for each disruption technique were compared with LC-MS analysis of targeted metabolites in order to evaluate recovery and possible degradation of the studied compounds.

DETERMINATION OF RESIDUES IN FOOD TASKING ION SEPARATION ENHANCED ANALYSIS

Gaud Dervilly-Pinel[1], Christina Da Costa Jacob[1], Sandrine Rochereau-Roulet[1], Sara Stead[2], Paul Young[2], **Fabrice Monteau**[1], Bruno Le Bizec[1]

1 - LUNAM Université, Oniris, USC 1329 Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France
2 - Waters Corporation, Atlas Park, Simonsway, Manchester, M22 5PP UK

Growth promoting practices for cattle fattening purposes are still encountered all around the world, for instance the use of the β-agonist clenbuterol in pigs, recombinant growth hormone in fish, cocktails of natural steroids in bovines, or hypothetic but realistic anabolic strategies consisting either on upstream disruption of the hypothalamo-pituitary axis (secretagogues, …) or even worse on direct gene modification (gene doping). Detection of illegal practices classically relies on residue monitoring in a targeted approach and methods based on gas- or liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry are today considered as the state-of-the-art. These strategies are however, challenged when facing new xenobiotic growth promoting agents or new ways of application, such as the administration of low dose cocktails. In this context, technological innovations in mass spectrometry combined (or not) with global approaches such as metabolomics are promising strategies to deal with the related chemical food safety issue. Amongst the latest innovations, the SYNAPT G2 HDMS is a high resolution exact mass MS/MS platform combining a breakthrough quantitative TOF technology and enhanced High Definition MS™ technologies providing a new level of performance for a large range of applications. By enabling molecules to be differentiated by size, shape, and charge — as well as mass — this additional capability allows analytical challenges to be addressed not currently possible by any other way. In that context, the most of these technological advances are under investigation to tackle, through both targeted and non-targeted (metabolomics) strategies, issues related to the chemical safety of food products from animal origin. Steroids, β-agonistic drugs and growth hormone are considered as the main compounds of interest together with their biomarkers to reveal anabolic practices in breeding animals.

P-097

GC-MS BASED METABOLOMICS ANALYSIS OF AUTISTIC CHILDREN'S URINE

Patrick Emond[1,2], Sylvie Mavel[1], Nacima Aïdoud[1], Lydie Nadal-Desbarats[1,2], Frédéric Montigny[2], Frédéric Laumonnier[1], Gabriele Tripi[1], Patrick Vourc'h[1,2], Frédérique Bonnet-Brilhault[1], Catherine Barthélémy[1], Hélène Blasco[1], Christian R. Andres[1]

1 - INSERM U930, Université François Rabelais, CHRU, 37000 Tours, France
2 - PPF Analyse des Systèmes Biologiques, Université François Rabelais, 37000 Tours, France

Background:
Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental diseases where genetic and environmental causes have been suggested. However, most cases are of unknown ethiology. Metabonomics approaches offer the possibility of measuring metabolic end points that are determined by genetic and environmental factors. Gas chromatography combined with mass spectroscopy (GC-MS) has been proven to be a useful metabolic profiling platform based on its high sensitivity, peak resolution and reproducibility. We describe here a GC-MS based metabolic study to explore the urinary chemical composition of autistic children.

Purpose:
This study evaluates the use of a GC-MS based platform to capture the most exhaustive biochemical signature of autistic individuals associated with chemometrics.

Methods:
Urinary samples were collected from autistic (n=26) and control (n=24) children. After a liquid-liquid extraction, chemical derivatization including or not an oximation step has been undertaken. Injection into a GC-MS gave a urinary profile with around 140 metabolites for the 2 studies. Multivariate analysis was then performed using Simca-P+ version 12. The quality of the models was described by R^2, as the proportion of variance in the data explained by the models and indicates goodness of fit, and Q_2 values which indicates predictability of the model.

Results:
• A first GC-MS study of urine samples, without oximation, was studied by OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis). From this, the two populations are well separated with a R^2=0.79 and a Q_2=0.34.
• A second GC-MS study, with oximation treatment of urine samples, was analyzed by OPLS-DA. A good identification was obtained from 39 metabolites with a R^2=0.83 and a Q_2=0.68.

Conclusion:
Urines screening by GC-MS (with or without oximation treatment) seems to be a promising tools to explore neurodevelopmental disorders such as autism, by an easy and not invasive method. This work reveals differences in urinary metabolites profiles between autistic and healthy children. Further works are needed to identify chemically the potential discriminant features and validate their potential in a targeted study. Further work is needed to determine if these differences are involved in the pathogenesis of ASD or are the results of metabolic and/or dietary abnormalities.

FRAGMENTATION OF OLIGOSACCHARIDES USING MALDI LTQ ORBITRAP FOR MULTI-STAGE MS

Chiara Giangrande[1], Sega Ndiaye[1], Marino Gennaro[2], Angela Amoresano[2], **Joëlle Vinh**[1]

1 - Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, (SMBP), CNRS USR3149, ESPCI ParisTech, Paris, France.
2 - Dipartimento di chimica, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Naples, Italie

Mass spectrometry, thanks to its high sensitivity and selectivity, is a powerful tool in glycomics, allowing characterization of glycopeptides as well as glycans released from them. MALDI-MS is a rather sensitive technique, presenting a high tolerance to salts contaminants frequently co-eluting with glycans during purification procedures, allowing rapid analyses without much effort. Structural information on glycans requires fragmentation procedures using tandem mass spectrometry techniques. Glycans fragmentation presents some main cleavage sites, termed glycosidic cleavages, between adjacent sugar rings. They provide much information on sequence and branching but little on linkage. Other cleavages, named cross-ring cleavages and involving two bonds cleavages are useful in the linkage determination[1].

Here we report on the structural characterization of glycans by MS^n analyses of $[M+Na]^+$ ions using an instrument, MALDI-LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific). During CID fragmentation Q-value remains constant and it is not possible to trap fragments at *m/z* lower than the 30% of the precursor. Attempts to overcome the problem of low mass cut-off were made using PQD and HCD by Karas and coworkers[2]. The absence of significant signals at low masses and the need for this information in structural elucidation of oligosaccharides sequences convinced us to explore the potential of multi-stage fragmentation.

N-glycans extracted from fetuin were analyzed using DHB as matrix. All the spectra were recorded in positive ion mode. Full scan mass spectra were carried out revealing a high mass accuracy due to Orbitrap analysis. This offered the advantage to perform a reliable glycan profiling based on full scan spectra. CID fragmentation spectra were performed using the ion trap as mass analyzer and collision energy (CE) optimization was necessary. After MS^2 further fragmentation event were performed in MS^3, showing the presence of essentially *b* and *y*-type ions, unfortunately covering a narrow mass range. A wider sequence coverage was achieved performing MS^4 experiment. Permethylation derivatization was carried out in order to improve structural characterization, trying to obtain data about branching via cross ring cleavages.

In conclusion the coupling of the high sensitivity and throughput of MALDI-MS with the extremely high accuracy of the Orbitrap analyzer opened the way for a better structural elucidation of oligosaccharides as post-translational modifications.

[1] *Domon B, Costello CE. A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FABMS/MS of Glycoconjugates., Glycoconjugate J. 1988, 5, 397-409.*
[2] *Rohmer M, Baeumlisberger D, Stahl B, Bahr U, Karas M. Fragmentation of neutral oligosaccharides using the MALDI LTQ Orbitrap. Int J Mass Spectrom 305, (2-3), 15 August 2011:199-208.*

P-099

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODE POUR L'ANALYSE DES MÉTABOLITES SÉLÉNIÉS CHEZ LA TRUITE

Simon Godin[1], Maité Bueno[1], Françoise Médale[2], Stéphanie Fontagné-Dicharry[2], Brice Bouyssière[1]

1 - Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, CNRS, UMR 5254, Hélioparc, 2 Av. Angot, 64053, Pau, France
2 - INRA, UR1067 Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, 64310, Saint-Pée-sur-Nivelle, France.

Le sélénium est un élément chimique qui présente à la fois un caractère essentiel pour les organismes vivants et une toxicité marquée pour des concentrations supérieures à celles requises. L'aspect essentiel du sélénium est porté par son fort pouvoir antioxydant, il est ainsi inclus dans des composés biologiques comme les sélénoprotéines dont l'activité est déterminante pour le fonctionnement de l'organisme[1]. Par conséquent, il y a un intérêt croissant concernant le développement d'aliments permettant une supplémentation en sélénium. Cette dernière est critique pour les populations vivant dans des zones géographiques où les apports naturels en sélénium sont particulièrement bas. Les propriétés antioxydantes du sélénium ont été mises en avant pour la préservation de composés tels que les acides gras poly-insaturés qui confèrent aux poissons ses qualités nutritionnelles. Certaines conditions d'élevage en pisciculture peuvent en effet induire un stress physique chez les poissons qui produisent alors des quantités plus importantes d'espèces réactives oxygénées (ROS). Un apport en sélénium permet de contrebalancer cette production de ROS nocive. Ainsi, l'addition de sélénium aux aliments piscicoles conduit à une meilleure croissance des poissons et à un produit fini qui constitue une nouvelle source pour la supplémentation en sélénium[2,3]. À ce jour, le métabolisme du sélénium chez le poisson n'est pas totalement élucidé, les faibles concentrations de l'ordre du ppb en espèces séléniées et la complexité de la matrice imposent un prétraitement de l'échantillon et l'utilisation de techniques sensibles telle que la spectrométrie de masse à torche plasma. Pour cette étude, il a été choisi de travailler sur des échantillons de sang et de plasma de truite. Le prétraitement de l'échantillon consiste en une précipitation des protéines, cependant cette étape demande une optimisation afin d'éviter d'éventuelles pertes des composés d'intérêt au cours de cette procédure. Dans cette optique, des échantillons seront dopés avec 3 composés enrichis isotopiquement (^{82}Se triméthylsélénonium, ^{77}Se sélénométhionine et ^{77}Se sélénite) et soumis à la procédure de déprotéinisation. Ces composés enrichis peuvent alors être utilisés en tant que traceurs afin de valider l'étape de prétraitement. Par la suite, la quantification des composés séléniés dans les échantillons sera réalisée par LC-ICPMS et une identification structurale sera menée par spectrométrie de masse moléculaire.

[1] *B'Hymer C., Caruso J. A., Journal of Chromatography A, 2006, 1114, 1-20.*
[2] *Pedrero Z., Madrid Y., Analytica Chimica Acta, 2009, 634, 135-132.*
[3] *Rider S. A., Davies S. J., Jha A. N., Fisher A. A., Knight J., Sweetman J. W., Aquaculture, 2009, 295, 282-291.*

APPORT DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE HAUTE RÉSOLUTION POUR LES ÉTUDES MÉTABONOMIQUES DES MATRICES BIOLOGIQUE COMPLEXES

Agnéta Kiss[1], Aurélie Fildier[1], Marionna Lucio[2], Corinne Buisson[3], Audrey Buleté[1], Philippe Schmitt-Kopplin[2], Cécile Cren-Olivé[1]

1 - ISA UMR 5280, Service Central d'Analyse (SCA), Chemin du Canal, Échangeur de Solaize, 69390 Solaize
2 - Agence Française de Lutte contre le Dopage (AFLD), Département des analyses, 143, avenue Roger Salengro, 92290 Châtenay-Malabry
3 - Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health , Ingolstaedter Landstrasse1 , 85764 Neuherberg

La spectrométrie de masse couplée, ou non, à des techniques de séparation est devenu un outil incontournable dans les études métabonomiques. Grâce aux performances de résolution, de sélectivité et de sensibilité inégalables, la spectrométrie de masse apporte des solutions dans l'analyse de matrices complexes. En effet, les études métabonomiques sont souvent réalisées sur des matrices biologiques, d'où le besoin d'une technique robuste capable de détecter sélectivement plusieurs composés ayant des propriétés physico-chimiques très différentes et une gamme de concentration très large.

Plusieurs études menées au laboratoire démontrent l'importance de la technique dans les deux grandes étapes d'une étude métabonomique, à savoir : l'obtention d'empreintes moléculaires riches en information (approche globale) et la confirmation des résultats (approche quantitative).

Ce poster a pour objectif de résumer les résultats obtenus dans trois études métabonomiques réalisées sur trois matrices différentes (testicules de rats, abeilles et urine) et deux plateformes analytiques : LC-QTOF et FT-ICR. Les différents outils chimiométriques et les bases de données utilisées pour l'interprétation des données seront également présentés.

Une première étude sur les effets de la vinclozoline sur le métabolisme des rats montre la possibilité de discriminer les différents groupes (rats traités et rats de contrôle). Cette étude a permis de mettre en évidence des modifications au niveau métaboliques.

La deuxième étude implique une plateforme GC-TOF et, étudie de manière globale, les effets de l'esfenvalerate sur des abeilles.

La troisième étude concerne la discrimination des athlètes dopés, et a été réalisée en collaboration avec le département BioGeoChemistry de l'Institut of Ecological Chemistry (Munich, Allemagne). Les échantillons d'urine ont été analysés sur deux plateformes analytiques (LC-TOF et FT-ICR) et les résultats obtenus ont été comparés. Grâce à l'utilisation de la haute résolution et à la précision, plusieurs potentiels biomarqueurs ont été mis en évidence.

P-101

MÉTHODE D'ANALYSE SIMULTANÉE DE DEUX FAMILLES DE COVs DANS LE MÉCONIUM PAR SPME/GC/MS

Marie Meyer-Monath[1], François Lestremau[1], Isabelle Morel[2], Karine Tack[1]

1 - INERIS, Parc Technologique ALATA BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France
2 - Laboratoire de Toxicologie Biologique et Médico-légale, CHU Pontchaillou, F-35033 Rennes, France

Le méconium se forme dans le colon du fœtus autour de la 13ème semaine de gestation et s'accumule jusqu'à la naissance. Il est expulsé par le nouveau-né généralement dans les 24 à 48 h suivant la naissance.

C'est une matrice complexe qui commence à être utilisée pour quantifier le degré d'exposition des fœtus aux xénobiotiques. Elle présente l'avantage d'intégrer les expositions sur plusieurs mois comparativement aux urines et au sang qui ne donnent des indications que sur des expositions à court terme. D'abord utilisé pour déterminer si les mères consommatrices de stupéfiants exposent leur bébé *in utero*[1], les études sur le méconium se sont étendues aux métabolites de l'alcool éthylique[2] et à certains pesticides[3].

Cette matrice est actuellement étudiée dans le cadre d'un projet PHRC : Penew ; il s'agit d'une étude cas-témoin. C'est le développement analytique réalisé par l'INERIS, pour la détection et le dosage des BTEXS (benzène, toluène, éthylbenzène, xylènes, styrène), du trichloroéthylène et du tétrachloroéthylène dans le méconium qui sera présenté. Ces substances n'ont, à ce jour, jamais été recherchées dans cette matrice biologique. Or, ces molécules, issues de la famille des COVs, sont susceptibles d'avoir un impact sur la santé. Le but de cette étude est de déterminer si elles jouent un rôle dans les malformations chez les fœtus exposés.

Le méconium est très visqueux, très difficile à manipuler et à homogénéiser. La préparation d'échantillon est rendue très complexe en raison de ces propriétés physico-chimiques très particulières. Concernant les molécules étudiées, il est apparu plus aisé de les analyser en espace de tête. La technique par SPME[4] permet d'analyser cet espace, ne nécessite pas de préparation et permet de préserver l'échantillon. Ceci permet de le réutiliser pour une autre analyse (utile lors de faibles quantités collectées).

La méthode qui sera présentée est réalisée par SPME avec une fibre CAR/PDMS 85 µm en espace de tête, couplée à une GC/MS avec une modification sur l'incubateur de l'autosampler permettant une agitation magnétique. Un plan d'expérience a été mis au point dans une solution d'eau pure dopée avec les étalons, pour déterminer les paramètres optimaux : nature de la fibre, température d'incubation, durée d'extraction... Les paramètres optimisés ont été directement transposés à l'analyse de méconium. Avec cette méthode de dosage rapide, des limites de quantification satisfaisantes ont été atteintes (≈ 1 pg/mL).

[1] *G.D. Clark, I.B. Rosenzweig, V.A. Raisys, C.M. Callahan, T.M. Grant, A.P. Streissguth, Journal of Analytical Toxicology 16 (1992) 261.*
[2] *C. Moore, J. Jones, D. Lewis, K. Buchi, Clinical Chemistry 49 (2003) 133.*
[3] *R.M. Whyatt, D.B. Barr, Environmental Health Perspectives 109 (2001) 417.*
[4] *C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Analytical Chemistry 62 (1990) 2145.*

SCREENING OF OXIDATIVE STRESS INDUCED LDL-MODIFICATIONS USING (LC-)MALDI-MS(/MS) BASED LIPOPROTEOMICS

Gerald Stübiger[1], U. Resch[1], M. Wuczkowski[2], H. Sinzinger[3], Omar Belgacem[4], **Stéphane Moreau**[5]

1 - Center of Biomolecular Medicine and Pharmacology, Medical University Vienna, Austria
2 - Technoclone GmbH, Vienna, Austria
3 - Dept. of Nuclear Medicine, Medical University Vienna, Austria
4 - Shimadzu, Manchester, UK
5 - Shimadzu France, Noisiel, France

Introduction

Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) induced by reactive oxygen species and/or elevated glucose levels is considered a major risk factor of cardiovascular disease (CVD) and atherosclerosis. Our aim is to identify the modifications of oxidized LDL (OxLDL) directly at the constituent phospholipid (PL) and amino acid (AA) sequence levels (*e.g.* of the ApoB-100 protein). For this purpose we introduce a lipoproteomics approach using (LC-)MALDI-MS/MS combined with intelligent software based screening tool.

Methods

Lipoproteins were isolated from normal human plasma by preparative ultracentrifugation and modified by diverse reactive oxygen species and lipid peroxidation products (*e.g.* MDA, HNE) in the presence or absence of sugars (*e.g.* glucose). PLs were extracted and directly analyzed by MALDI-MS. The apolipoproteins were digested with endoproteinases (*e.g.* trypsin), peptides were separated by HPLC and sequence mapping was performed based on MALDI-MS/MS. Mass spectra were recorded using MALDI-TOF-RTOF- and MALDI-QIT-TOF-MS(/MS) platforms, respectively. Data were processed and searched for specific MS/MS signatures based on a parameterizable database and software module (PTM-Finder™, Shimadzu).

Preliminary Data

LDL oxidation increased MDA levels (> 30 nmol/mg protein) and signal intensity of LPCs (*e.g.* LPC16:0) but decreased signal intensity of sn-2 PUFA containing PCs (*e.g.* PAPC, PLPC) indicating for lipid peroxidation and increased activity of lipolytic enzymes (*e.g.* Lp-PLA2). Moreover, large peptide MS/MS dataset (more than 400 MS/MS spectra per LDL type) were screened to identify the modifications at the AA level. Based on this approach distinct glycation sites located within the LDL-R binding domain of ApoB-100 were found in glycated LDL (gLDL). Furthermore, additional sets of MS/MS spectra from other OxLDL samples (*e.g.* Cu-LDL, HOCl-LDL) were screened for characteristic protein carbonylation products (*e.g.* Michael adducts).

Innovative aspects

● A comprehensive MALDI-MS(/MS) approach is introduced to elucidate oxidative stress related lipoprotein modifications on both the constituent PL and apolipoprotein (*e.g.* ApoB-100) level.
● LC-MALDI-MS/MS analysis combined with PTM-Finder™ software allowed to identify ApoB-100 modifications (*e.g.* glycation) relevant to LDL-R binding.
● Our approach shows the potential to serve as platform for clinical monitoring of lipoprotein modifications (*e.g.* in diabetic patients) in the future.

P-103

ANALYSE DES SPHINGOLIPIDES EXTRAITS D'*ARABIDOPSIS THALIANA* PAR LC-ESI-MS/MS

Frédérique Tellier[1], **Isabelle Schmitz-Afonso**[2], **Alessandra Maia-Grondard**[1]

1 - UMR1318, INRA-AgroParisTech, route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex, France
2 - Centre de recherches de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Les sphingolipides sont des composants structuraux essentiels des membranes. Ce sont des biorégulateurs de nombreux processus intra ou inter cellulaires comme la prolifération, la différentiation, la signalisation et la mort cellulaire.

Leur squelette de base est un amide, appelé céramide, obtenu entre un amino-alcool à longue chaîne (18 atomes de carbone) et un acide gras à longue chaîne (16 à 26 carbones). Chez les plantes, les céramides subissent ensuite de nombreuses réactions enzymatiques (greffage de sucres et/ou de phosphates, hydroxylation, insaturation) pour conduire à une grande diversité de composés (plus de 160 identifiés actuellement) regroupés en 4 classes : les céramides, les hydroxycéramides, les glucosylcéramides et les glycosyl inositol phosphorylcéramides.

Les sphingolipides, après hydrolyse et libération de l'amine et acide, sont généralement analysés par LC-fluorescence ou GC/MS. Afin de mieux connaître leurs voies de biosynthèse, nous avons développé, au sein de notre plate-forme de chimie du végétal, une analyse performante de ces composés dans leur intégrité. Cette analyse est effectuée par LC-ESI-MS/MS[1,2] avec un spectromètre de masse de type triple quadripôle. Comme la plupart des sphingolipides sont présents en faible quantité, nous utilisons le mode d'analyse MRM (Multiple Reaction Monitoring). Leur identification repose sur la chaîne amine qui possède 4 structures différentes, chacune donnant un ion caractéristique. La quantification est réalisée par un étalon interne spécifique pour chaque classe. Des analyses complémentaires en couplage LC avec un spectromètre hybride piège linéaire/Orbitrap ont permis de confirmer les structures proposées.

Nous avons effectué des analyses de sphingolipides sur des plantules, graines, tourteaux et huiles d'une lignée sauvage d'*Arabidopsis thaliana*. Nous vous présenterons la composition en sphingolipides ainsi obtenue dans les différents organes.

[1] *J. Markham, J. Li, E. Cahoon and J. Jaworski, J. Biol. Chem. 2006 ; 281 : 22684-22694.*
[2] *J. Markham and J. Jaworski, Rapid commun. Mass Spectrom. 2007 ; 21 : 1304-1314.*

Instrumentation, Mécanismes Réactionnels

FIELD DESORPTION : UNE TECHNIQUE D'IONISATION COMPLÉMENTAIRE POUR L'ÉTUDE DE MATÉRIAUX ORGANIQUES

Christelle Absalon[1], Claire Mouche[1], Patricia Castel[1]

1 - ISM-CESAMO-UMR5255-Université Bordeaux1-CNRS

L'analyse en spectrométrie de masse de polymères synthétiques et de macromolécules organiques et organométalliques est majoritairement réalisée à l'heure actuelle par Maldi ou ESI. Dans le cas des polymères notamment, l'analyse Maldi permet en effet d'apporter des informations cruciales aux polymeristes telles que la détermination des bouts de chaîne, la masse molaire moyenne et la distribution. Cependant, dans certaines situations : polymères ou molécules peu polaires, il s'avère délicat d'obtenir l'ionisation des composés recherchés.

Une autre technique d'ionisation : la désorption de champ (FD Field Desorption) peut alors se révéler particulièrement efficace. Cette technique a la particularité de permettre une ionisation extrêmement douce : on observe principalement des ions $M^{+\bullet}$ et peu de fragments sont formés.

Cette technique bien qu'ancienne[1] connaît à l'heure actuelle un regain d'intérêt en raison de l'adaptation de sources FD sur des systèmes Tof et FT-ICR et en raison de la mise au point d'un couplage : Lifdi (liquid injection field desorption/ionization) facilitant la mise en œuvre pratique de cette technique[2].

Cette étude porte sur la comparaison dans différents cas concrets des spectres Maldi et FD. Une attention particulière sera apportée à l'étude des polymères et la comparaison des données obtenues avec ces 2 techniques d'ionisation. Nous détaillerons également l'intérêt de la FD dans le cas de polymères peu polaires (Polystyrène, Polyethylène…).

[1] *Gomer, R ; Inghram, M.G.; Applications of Field Ionization to Mass Spectrometry. J.Am.Chem.Soc. 1955,77,500.*

[2] *Linden, H.B. Liquid Injection Field Desorption Ionization : a new tool for soft Ionization of Samples Including Air-Sensitive Catalysts and non-Polar Hydrocarbons. Eur. J. Mass Spectrom.2004, 10, 459-468.*

P-105

CHARACTERIZATION OF HIGH-VALENT IRON OXO PHTHALOCYANINES BY COLDSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY

Florian Albrieux[1], Alexander Sorokin[2], **Christian Duchamp**[1], Pavel Afanasiev[2], Evgeny Kudrik[2,3], Valérie Briois[4], Oskar Koifman[3]

1 - Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) - CNRS : UMR5246, Université Claude Bernard - Lyon I, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, École Supérieure Chimie Physique Électronique de Lyon - Bâtiment CPE 43, Bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE CEDEX - France

2 - Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon (IRCELYON) - CNRS : UMR5256, Université Claude Bernard - Lyon I - 2 avenue Albert Einstein 69226 Villeurbanne cedex - France

3 - Institute of Macroheterocyclic Compounds (IMC) - Ivanovo State University of Chemistry and Technology, 7, av. F. Engels 153000 Ivanovo – Russie

4 - Synchrotron SOLEIL (SSOLEIL) - CNRS : UMRUR1 - L'Orme des Merisiers Saint-Aubin - BP 48 91192 Gif-sur-Yvette cedex - France

Among the metal macrocyclic complexes used for bio-inspired catalytic oxidation, phthalocyanines are probably the most available in terms of the simple preparation, large accessible amounts and their low price. They are widely used as oxidation catalysts, *e.g.* in a large scale industrial Merox process. Despite the great interest in phthalocyanine complexes for catalytic oxidation including industrial applications, the mechanistic aspects of their chemistry are still under-developed, especially identification and characterization of the active species. While high-valent iron oxo species on the porphyrin, corrole, and non-heme platforms have been prepared at low temperatures and characterized, the corresponding mononuclear phthalocyanine species has often been postulated as active species, but has never been described. Here we report on the first characterization of a Fe(IV) oxo complex supported by a phthalocyanine ligand by cold spray ionization (CSI) mass spectrometry.

A 10^{-6} M ($PctBu_4$)FeCl solution was incubated with 10 equiv. *m*-CPBA in acetone at -75°C for 2 min and CSI-MS analysis was rapidly performed at -20°C in the positive detection mode. Thus, cryospray MS data agree with low temperature UV–vis and EPR data and the mechanism of formation of the Fe(IV) oxo species and its formulation can be proposed. The CSI permit to preserve thermolabile compound and to work with some organic solvents which are not compatible with electrospray ion source.

It is well established that high valent metal oxo species are amenable to exchange the oxo ligand with labeled $H_2{}^{18}O$. In order to check this possibility 20 mL of $H_2{}^{18}O$ (95.4% isotopic purity) in 80 mL of acetone were added to ($PctBu_4$)Fe=O(Cl) acetone solution (10^{-6} M, 1 mL) at -75°C. After 3 min incubation the resulting solution was analyzed under the same cryospray MS analysis conditions. The strong increase of the signal at *m/z* 810.3 indicated oxygen exchange of Fe(IV)O with labeled water.

UTILISATION D'AGRÉGATS MASSIFS D'ARGON POUR ACCROÎTRE LA SENSIBILITÉ DE L'IMAGERIE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE TOF-SIMS

Claudia Bich[1], Rasmus Havelund[2], Rudolf Moellers[3], Ian Gilmore[2], Felix Kollmer[3], David Touboul[1], Ewald Niehuis[3], **Alain Brunelle**[1]

1 - Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France
2 - National Physical Laboratory, Hampton Road, Teddington, Middlesex, TW11 0LW, United Kingdom
3 - ION-TOF GmbH, Heisenbergstrasse 15, 48149 Münster, Germany

Avec les sources d'ions à pointe liquide émettant des faisceaux intenses d'agrégats métalliques comme ceux de bismuth, la spectrométrie de masse TOF-SIMS est devenue une technique de choix pour l'imagerie à l'échelle du micron. Elle est en particulier très bien adaptée aux lipides et petites molécules sur des coupes de tissus animaux, des biopsies, ou des échantillons du patrimoine[1]. Elle souffre toutefois encore d'un manque de sensibilité, et il est par exemple assez difficile d'obtenir des images suffisamment contrastées de lipides intacts avec cette résolution. L'épaisseur très fine, moins de 10 nm, de la surface d'où proviennent les ions analysés, ainsi que le taux de fragmentation, relativement élevé, font que le nombre d'ions intacts désorbés reste limité.

Augmenter l'épaisseur analysée, voire intégrer un signal qui serait désorbé de toute l'épaisseur d'une coupe, permettrait de vaincre cette limitation en donnant ainsi accès à une plus grande quantité de molécules. Plusieurs tentatives ont été faites par le passé en appliquant une méthode dite de dual beam depth profiling, consistant à analyser la surface avec un faisceau d'agrégats de bismuth, et à renouveler couche après couche cette surface en la pulvérisant avec un second faisceau d'ions. Jusqu'à récemment les faisceaux utilisés pour la pulvérisation, comme ceux de fullerènes ($C60^+$), induisaient un endommagement non négligeable dans les couches sous-jacentes, interdisant ce type d'analyse en profondeur dans des coupes de tissus[2].

Récemment ont été développées de nouvelles sources d'agrégats massifs d'argon (Ar_n^+, n=500-2000)[3] capables de pulvériser une surface sans endommager les couches organiques sous-jacentes. Leur efficacité pour une analyse en profondeur de polymères a déjà été démontrée[4].

Un faisceau d'agrégats d'argon (Ar_{1500}^+, 10 keV) et un faisceau d'agrégats de bismuth (Bi_3^+, 25 keV) équipant un spectromètre TOF-SIMS IV (ION-TOF GmbH) ont été utilisés pour réaliser des analyses en « dual beam depth profiling » sur toute l'épaisseur (14 µm) de coupes de cerveau de rat. Il est montré que ce type d'analyse en profondeur est désormais possible, sans endommagement des couches sous-jacentes au fur et à mesure de l'analyse et de la pulvérisation. Beaucoup plus important, l'intégration du signal ionique sur une grande épaisseur permet une très grande augmentation de la sensibilité, d'un facteur 10, bien que certaines espèces lipidiques n'apparaissent concentrées qu'à la surface.

[1] *D. Touboul, O. Laprévote, A. Brunelle, Curr Opin Chem Biol 15 (2011) 725-732.*
[2] *D. Debois, A. Brunelle, O. Laprévote, Int J Mass Spectrom 260 (2007) 115-120.*
[3] *J. Matsuo, C. Okubo, T. Seki, T. Aoki, N. Toyoda, I. Yamada, Nucl Instrum Methods Phys Res B 219 (2004) 463-467.*
[4] *S. Ninomiya, K. Ichiki, H. Yamada, Y. Nakata, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo, Rapid Commun Mass Spectrom 23 (2009) 1601-1606.*

P-107

CORRÉLATION ENTRE FONCTIONS CHIMIQUES DE MOLÉCULES STANDARDS $C_XH_YN_Z$ ET FRAGMENTATIONS MS/HR-MS

Laurène Flandinet[1], Véronique Vuitton[1], Anne Milet[2], Carlos Perez del Valle[2], François-Régis Orthous-Daunay[3], Roland Thissen[1]

1 - Institut de Planétologie et d'Astrophysique de Grenoble - CNRS / Université J. Fourier - Grenoble - France
2 - Département de Chimie Moléculaire - CNRS / Université J. Fourier - Grenoble - France
3 - Laboratory for Space Sciences and the Physics Department - Washington University - St. Louis MO - USA

Les espèces azotées non oxygénées sont rencontrées dans des mélanges complexes d'intérêt astrophysique tels que les polymères de HCN ou les "tholins", analogues des aérosols de Titan. La caractérisation par spectrométrie de masse en tandem (MS/HR-MS) de la structure des molécules présentes dans ces échantillons permet d'en avoir une vision complète et cohérente[1,2].

Afin d'apporter des contraintes solides sur les attributions de structures moléculaires, nous avons effectué une étude systématique des fragmentations d'une trentaine de molécules de formules générales $C_xH_yN_z$. Ces standards ont des structures qui vont de chaînes aliphatiques à des unités polycycliques hétéroaromatiques et contiennent différentes fonctionnalités chimiques telles que amines, imines, nitriles, azines… Les MS/HR-MS ont été réalisées en mode positif et négatif à l'aide d'un LTQ-Orbitrap XL qui permet grâce à la très haute résolution une attribution en masse non ambiguë des fragments.

Cette étude a révélé un lien direct entre fonctionnalité chimique, nature et intensité des fragmentations observées dans les spectres. Ainsi, les molécules aliphatiques fragmentent davantage (en terme de nombres de fragments et de leur intensité à une énergie donnée) que les molécules cycliques ou aromatiques. Quand NH_2 est attaché à un aromatique, HCN est perdu plutôt que NH_3. La perte de CH_3CN est liée à la présence d'un groupement substitué sur un cycle hétéroaromatique et celle de NH_2CN à la présence de la guanidine[3].

Ces résultats expérimentaux sont confrontés aux résultats de calculs *ab initio* (Gaussian09 sur une base B3LYP/6-31G**) afin de déterminer (i) le ou les site(s) de protonation ou déprotonation, (ii) la géométrie d'équilibre de l'ion résultant, (iii) la hauteur de la barrière de dissociation pour les deux fragmentations de plus basse énergie et (iv) la géométrie de l'état de transition.

En parallèle, nous avons poursuivi l'approche expérimentale par la solubilisation des standards dans CD_3OD au lieu de CH_3OH, celui-ci permettant par échanges isotopiques de mieux caractériser l'origine des fragments obtenus. Finalement, nous avons développé des représentations originales de nos résultats afin d'avoir accès à une visualisation aisée des motifs de fragmentation et à la comparaison entre les ions standards et ceux provenant de nos échantillons complexes.

[1] *V. Vuitton, et al., Faraday Discuss., 147, 495 (2010).*
[2] *A. Somogyi, et al., Int. J. Mass. Spectrom., 316-318, 157 (2012).*
[3] *J.-Y. Bonnet, et al., JFSM, Clermont-Ferrand (2010).*

EVALUATION OF THE HIGHER SENSITIVE LC/MS/MS INCORPORATES NOVEL DESOLVATION TECHNOLOGIES TO ACHIEVE LOW FEMTO-GRAM LOQ

Shinjiro Fujita[1], Natsuyo Asano[1], Mikaël Levi[2], **Stéphane Moreau**[2], Kazuo Mukaibatake[1]

1 - Shimadzu corporation, Kyoto, JAPAN
2 - Shimadzu France, Noisiel, FRANCE

The triple quadrupole mass spectrometer is widely used in various application fields to quantify the trace amount of compounds in real world samples because of its excellent sensitivity and selectivity. In order to achieve lower limit of quantitation, many researchers have been developing new desolvation technologies at either ESI sprayer or MS inlet. Here, we report the higher sensitive triple quadrupole mass spectrometer equipped with novel desolvation devices such as addition of the heated gas blowing along with electrospray and the heated multi-orthogonal ion path mounted at the inlet of mass spectrometer. The combination of the heated gas at ESI and heated multi-orthogonal ion path enhanced desolvation efficiency which resulted in low femto-gram limit of quantitation. Several commercially available drug samples (Reserpine, Verapamil, Alprazolam, Carbamazepine, Cilostazol, Lidocaine, Fluticasone and Testosterone) were prepared for the sensitivity evaluation of higher sensitive triple quadrupole mass spectrometer equipped with the modified ESI source and the heated multi orthogonal ion path. All the samples were analyzed by the Multiple Reaction Monitoring (MRM). MRM parameters including MRM transitions and collision energy as well as compound dependent ion transfer voltages were optimized through automatic MRM optimization functionality incorporated in LabSolution software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The temperatures of heated gas and heated multi-orthogonal ion path were optimized for each sample. Probe position was optimized for reserpine and subsequently applied for all analytes.

Using modified ESI source and the heated multi orthogonal ion path helped to deliver a limit of quantitation for all eight drugs below 5 fg/uL. The temperature of heated gas and heated multi-orthogonal ion path were independently optimized for each sample with the range of 200 to 500°C and 150 to 300°C respectively. The ion intensity of reserpine was increased 8 times with the heated gas and 4 times with heated multi-orthogonal ion path operated at 300°C. Besides larger volume of ions was introduced into the mass spectrometer by the effective desolvation, the base line noise was maintained at reasonably low level as the noise derived from neutral droplet or unwanted ions were strongly reduced in the multi orthogonal region heated at high temperature, and resulted in excellent signal to noise ratio which achieved low femto-gram sensitivity.

ÉTUDES MÉCANISTIQUES DE RÉACTIONS PALLADOCATALYSÉES PAR ESI/MS

Dominique Harakat[1], Alexandre Vasseur[1], Jean Le Bras[1]

1 - Université de Reims Champagne Ardenne, Institut de Chimie Moléculaire de Reims, CNRS UMR 7312, UFR des Sciences exactes et naturelles, Bât 18 - Europol'Agro, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 REIMS Cedex 2

Les développements récents de la technique de spectrométrie de masse, et en particulier du mode d'ionisation électrospray ont ouvert l'accès à l'étude directe des réactions chimiques en solution. La technique permet l'identification d'intermédiaires réactionnels y compris ceux de courte durée de vie[1]. En fonction des différentes versions de spectromètres, on peut accéder aux informations telles que la MS/MS et l'HRMS. La technique permet des études qualitatives et quantitatives rendant possible, à titre d'exemple, l'appréciation des abondances d'intermédiaires dans un mélange de catalyseurs, ce ratio reflète dans certains cas leur stéréo-sélectivité intrinsèque. La spectrométrie de masse en mode d'ionisation électrospray (ESI-MS) et la version tandem ESI-MS/MS sont donc rapidement devenues des techniques de choix pour l'étude mécanistique des réactions chimiques en milieu liquide. Nous présentons l'ensemble des travaux réalisés ces dernières années au laboratoire sur l'étude mécanistique par ESI/MS de réactions palladocatalysées : mécanisme de Wacker, Mécanisme de Heck déshydrogénant…[2].

[1] *L. S. Santos Reactive Intermediates: MS Investigations in Solution, Wiley-VCH, Weinheim, 2010.*

[2] *C. Chevrin, J. Le Bras, F. Hénin, J. Muzart, A. Pla-Quintana, A. Roglans, R. Pleixats Organometallics 2004, 23, 4796. C. Chevrin, J. Le Bras, A. Roglans, D. Harakat, J. Muzart New J. Chem. 2007, 31, 121. E. Thiery, C. Chevrin, J. Le Bras, D. Harakat, J. Muzart J. Org. Chem. 2007, 72, 1859. E. Thiery, D. Harakat, J. Le Bras, J. Muzart Organometallics 2008, 27, 3996. E. Thiery, C. Aouf, J. Belloy, D. Harakat, J. Le Bras, J. Muzart J. Org. Chem. 2010, 75, 1771. D. Harakat, J. Muzart, J. Le Bras, RSC Adv. 2012, 2, 3094. A. Vasseur, D. Harakat, J. Muzart, J. Le Bras J. Org. Chem. 2012, sous presse.*

CARACTÉRISATION STRUCTURALE DES IONS A_N COUPLAGE SPECTROMÉTRIE DE MASSE ET SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Oscar Hernandez[1]

1 - Laboratoire de Chimie-Physique (LCP) - Université Paris Sud - Paris XI - Université Paris Sud 11 Bâtiment 201 91400 Orsay - France

La spectrométrie de masse est un outil important pour le séquençage des peptides. La méthode la plus couramment utilisée pour séquencer les peptides en spectrométrie est l'activation par collisions avec un gaz rare (CID : Collision Induced Dissociation). Avec ce mode d'activation, les fragments les plus utiles pour dériver la séquence sont les couples de fragments dits a_n/x_n ou b_n/y_n correspondant à la rupture de la chaîne peptidique. Le mécanisme de fragmentation n'est cependant pas bien compris, et les physico-chimistes tentent de combiner expériences et théories pour améliorer notre compréhension de la chimie de fragmentation des peptides[1].

Grâce à la spectrométrie de masse tandem (MS/MS) couplée avec des lasers infrarouge nous avons les outils nécessaires pour comprendre le mécanisme de fragmentation de ces oligopeptides. Les expériences présentées ici sont faites avec le spectromètre de masse FT-ICR 7T[2] couplé avec le laser infrarouge OPO/OPA[3] accordable dans la zone entre 3000 et 4000 cm^{-1} caractéristique des bandes d'élongation des liaisons X-H (X=O, N, C).

Les spectres de plusieurs ions fragments de type a_n seront discutés. Dans le cas des polyglycines, une étude spectroscopique dans la gamme 1000-2000 cm^{-1}[4] avait permis de mettre en évidence que la fragmentation des peptides conduisant à la formation de ces ions s'accompagne de cyclisation. Dans le cas des ions a_2 et a_3 des polyglycines, la comparaison des spectres théoriques et expérimentaux montre clairement que l'on a formation d'un et un seul isomère cyclique. La conclusion était en revanche plus ambigüe pour l'ion a_4.

Les spectres des ions a_n des polyglycines dans la gamme 3000-4000 cm^{-1} confirment les résultats obtenus précédemment pour les ions a_2 et a_3, et permet de préciser la structure dans le cas de l'ion a_4. Une bande observée à 3550 cm^{-1} est assignée à une vibration NH d'un amide $C(O)NH_2$, ce qui est cohérent avec le mécanisme de permutation de séquence proposé[4].

Le mécanisme de permutation de séquence a été étudié plus en détails dans le cas de l'ion a_2 de YGGFL. L'étape limitante de cette permutation est un transfert de proton au sein d'une forme cyclique formée intermédiairement. Nous montrons que la barrière d'activation associée à ce transfert de proton est significativement diminuée dans le cas où une chaine latérale (celle de la tyrosine (Y)) peut assister ce transfert de proton.

[1] *Paizs, B.; Suhai, S., Fragmentation pathways of protonated peptides. Mass Spectrom. Rev. 2005, 24, (4), 508-548.*

[2] *Bakker, J. M.; Besson, T.; Lemaire, J.; Scuderi, D.; Maitre, P., Gas-phase structure of a p-allyl-palladium complex: Efficient infrared Spectroscopy in a 7 T Fourier transform mass spectrometer. J. Phys. Chem. A 2007, 111, (51), 13415-13424.*

[3] *Sinha, R.; Erlekam, U.; Bythell, B.; Paizs, B.; Maître, P., Diagnosing the Protonation Site of b2 Peptide Fragment Ions using IRMPD in the X–H (X=O, N, and C) Stretching Region. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2011, 22, (9), 1645-1650.*

[4] *Bythell, B. J.; Maitre, P.; Paizs, B., Cyclization and Rearrangement Reactions of an Fragment Ions of Protonated Peptides. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, (42), 14766-14779.*

P-111

RÉACTIVITÉ DES OLÉFINES DANS LA RÉACTION DE PAUSON–KHAND : UNE ÉTUDE EN PHASE GAZEUSE DE L'APTITUDE DES OLÉFINES À SE COORDINER SUR LE MÉTAL

Denis Lesage[1], Jérôme Blu[2], Jean-Claude Tabet[1], Richard B. Cole[1], Yves Gimbert[2]

1 - Institut Parisien de Chimie Moléculaire, UMR CNRS 7201 - FR 2769 UPMC univ Paris 06, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France.
2 - Département de Chimie Moléculaire, DCM UMR 5250-ICMG FR 2607 CNRS-Université Joseph Fourier BP 53 38041 Grenoble cedex 9, France.

La réaction de Pauson-Khand a été découverte en 1973 par P. L. Pauson et I. U. Khand. Elle génère une cyclopenténone à partir d'une oléfine, d'un alcyne et d'un dicobalt octacarbonyle. Un mécanisme catalytique, proposé par P. Magnus *et al.* en 1985, fut confirmé 16 ans plus tard par M. M. Yamanaka *et al.* par DFT.

En 2003, nous avons publié la première observation d'un cobaltacycle, intermédiaire clé de cette réaction[1]. Pour se faire, nous avons réalisé une réaction ion-molécule entre un alcyne-dicobalt incorporant un ligand pontant aisément ionisable et une oléfine « tendue » très réactive, le norbornène. Une étude DFT a confirmé l'observation du cobaltacycle.

Néanmoins, dans une étude récente, la formation de cet intermédiaire a été remise en cause par J. Scott McIndoe *et al.*[2]. Dans cette étude, les auteurs réalisent en ESI-MS une réaction de Pauson-Khand en version intramoléculaire ou intermoléculaire avec des substrats organiques naturellement chargés, ce qui présente l'avantage de pouvoir observer le produit final de réaction. De la perte systématique en CID des oléfines (utilisées dans cette étude), ils concluent que la première liaison C-C nécessaire à la formation du cobaltacyle ne s'est pas faite.

Dans ce travail, nous avons repris les travaux de McIndoe mais selon une approche expérimentale différente afin de s'affranchir de la limitation liée à la nature de l'oléfine utilisable, qui devait nécessairement être très volatile. Ainsi, nous avons utilisé deux spectromètres de masse modifiés pour l'étude de multiples réactions ion-molécules en phase gazeuse : un TQ équipé de deux cellules réactives ainsi qu'un FT-ICR modifié. En réaction intermoléculaire, l'observation du produit final de réaction (la cyclopentenone chargée), confirme bien que dans le cas du norbornène, la formation du cobaltacycle est effective, et que celui-ci évolue vers le produit de cycloaddition après incorporation de CO. Par contre, les oléfines volatiles employées par McIndoe (cyclopenténe, le 2,3-dihydrofuran, et le 1-hexene), connues pour être peu réactives en solution, n'ont pas permis l'observation du produit final de réaction et ne pouvaient donc donner lieu à l'observation du cobaltacycle correspondant. De plus, l'étude de la réaction intramoléculaire d'une ényne confirme que la réaction ne peut se faire sans un apport d'énergie nécessaire à la dissociation d'un ligand CO une fois le complexe à la triple liaison ayant été réalisé avec $Co_2(CO)_8$.

[1] *On Early Events in The Pauson-Khand Reaction, Yves Gimbert, Denis Lesage, Anne Milet, Francoise Fournier, Andrew E. Greene , Jean-Claude Tabet , Organic Letters 2003, 5, 4073-4075.*
[2] *The Pauson-Khand Reaction: A Gas-Phase and Solution-Phase Examination Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Matthew A. Henderson, Jingwei Luo, Allen Oliver and J. Scott McIndoe, Organometallics 2011, 30, 5471-5479.*

STRUCTURES DE POLYGLYCINES ET POLYALANINES SODÉES : DES GLOBULES AUX HÉLICES

Jonathan K. Martens[1,2], Isabelle Compagnon[3], Edith Nicol[1], Carine Clavaguéra[1], **Gilles Ohanessian**[1]

1 - Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, École Polytechnique, CNRS, 91128 Palaiseau
2 - Department of Chemistry, University of Waterloo, Ontario N2L 3G1, Canada
3 - Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire, Université de Lyon, CNRS, 69622 Lyon

Les interactions de Na^+ avec des peptides et des protéines sont cruciales dans de nombreux processus biologiques. Dans ce travail nous avons étudié la façon dont des peptides contenant de deux à douze résidus se structurent lorsqu'ils interagissent avec Na^+. Nous avons utilisé une combinaison d'approches expérimentales et théoriques pour établir les structures de $Na^+(Gly)_n$ (n=2-8) et $Na^+(Ala)_n$ (n=2-12).

Les expériences consistent à isoler chaque ion dans un piège (FT-ICR ou trappe ionique) et à en déterminer les signatures vibrationnelles par spectroscopie IRMPD dans les gammes spectrales 1000-1800 (laser à électrons libres CLIO) et 3000-3600 cm^{-1} (laser OPO/OPA). Elles sont complétées par des expériences de cinétique d'échange H/D de chaque ion avec ND_3 en phase gazeuse.

Les calculs commencent par une exploration de chaque surface d'énergie potentielle par dynamique moléculaire avec échange de répliques, utilisant le champ de force polarisable AMOEBA. Les structures de basse énergie sont ensuite optimisées par calculs quantiques, et leurs spectres IR sont déterminés au même niveau. Ces spectres, par comparaison aux spectres IRMPD expérimentaux, permettent d'attribuer à une structure à chacun des ions.

Les peptides comportant de deux à cinq résidus se replient autour de Na^+ pour maximiser l'interaction ion-peptide. Les sites d'interaction sont tous les oxygènes des amides. Avec six résidus, le peptide peut former une boucle autour de l'ion avec une liaison hydrogène entre ses extrémités. À partir de sept résidus, une compétition a lieu entre la maximisation de l'interaction ion-peptide et la structuration interne de ce dernier par multiples liaisons hydrogène. Les structures de $Na^+(Gly)_8$ et de $Na^+(Ala)_8$ sont des globules très différents, reflétant les tendances structurales très différentes de ces résidus dans les protéines. Enfin une transition structurale a lieu entre $Na^+(Ala)_8$ et $Na^+(Ala)_9$: ce dernier adopte une structure en hélice α, qui est également observée pour les tailles supérieures $Na^+(Ala)_{10-12}$. Nous avons ainsi obtenu la première signature caractéristique d'hélice α en phase gazeuse, dans la gamme spectrale 3200-3500 cm^{-1} qui est différente et plus diagnostique que celle qui est habituellement utilisée en solution. Ces résultats ouvrent la voie à la caractérisation de structures secondaires de peptides de grande taille.

P-113

TANDEM MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF A MIXTURE OF ISOBARS USING THE SURVIVAL YIELD TECHNIQUE

Antony Memboeuf[1], Laure Jullien[2], Rémy Lartia[2], Bernard Brasme[2], Yves Gimbert[2]

1 - Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire CEMCA, Brest, FRANCE
2 - Université Joseph Fourier, Département de Chimie Moléculaire, Grenoble, FRANCE

There is a growing demand on mass spectrometric techniques for high-throughput analysis, to perform more reliably and provide more information on increasingly complex samples: the analysis of compounds in biological samples, in the field of petroleomics, to study isomers or simply for separating unresolved peaks due to technical limitations. With this respect, the identification and quantification of isobars remain challenging tasks for mass spectroscopists. The identification and, possibly, elimination of an isobar becomes essential in order to perform the structural analysis, ultimately to quantify, a compound of interest. This may require a tedious preparative work, coupling with chromatographic separation techniques or more recently ion mobility spectrometry, possibly combined with complex procedures.

Collision Induced Dissociation tandem mass spectrometry experiments were performed to unequivocally separate compounds from an isobaric mixture of two products. The Survival Yield curve was obtained and, is shown to consist in a linear combination of the curves corresponding to the two components separately. For such a mixture, a plateau appears on the diagram in lieu of the continuous decrease expected allowing for the structural study of the two components separately. The width of the plateau critically relates to the fragmentation parameters of the two molecular ions, which need to be structurally sufficiently different for the plateau to be observed. However, at constant fragmentation parameters, we have observed the width significantly increases at large *m/z*. This makes the separation more and more efficient as isobars have larger *m/z* and the technique complementary to those applicable at low *m/z* only. We have also observed the vertical position of the plateau relates linearly to the relative concentration of the two compounds that may be useful for quantification. Repeatability was estimated at 2% on a quadrupole ion trap. An advantage of using Survival Yield curves only, is that *a priori* knowledge of the respective fragmentation patterns of the two isobars becomes unnecessary. Consequently, similar performances are obtained if fragments are isobaric, which is also demonstrated in our study. Using this methodology, structural study and quantification of a compound of interest can be performed without the need for cleaning the sample from the isobaric contaminant.

STRUCTURE OF ATYPICAL ELECTRON CAPTURE DISSOCIATION PEPTIDE FRAGMENT IONS PROBED BY IRMPD ACTION SPECTROSCOPY

Edith Nicol[1], Gilles Frison[1], Julia Chamot-Rooke[1], **Guillaume van der Rest**[2]

1 - Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, École Polytechnique, 91128 Palaiseau
2 - Laboratoire de Chimie Physique, Université Paris Sud, 91405 Orsay

In its standard depiction, Electron Capture Dissociation (ECD) of peptides is considered to lead mainly to *c* and *z* series fragments, through a mechanism that is still poorly understood[1]. Focus was brought towards these ion series since they differ widely from the fragments series generally observed upon CID activation, namely the *b* and *y* series. Recent work by our group[2] has shown that ECD fragmentation can proceed with a rather large amount of fragmentation outside of the *c* and *z* series for doubly charged tryptic peptides. Furthermore these fragmentation pathways appear to evolve with peptide size, as for smaller peptides no *c* or *z* fragments are sometimes observed, whereas large *b* and *w* fragments are generally present.

It was therefore of interest to focus on the formation of the *b* and *w* ions upon ECD, which could lead to new insights into the fragmentation mechanisms. For *b* ions, that are mainly produced in the ECD fragmentation of small (< 10 residues) peptides, SwedECD database analysis[2] suggests that the most likely pathway is a three step one: reduction of the doubly charged species through electron capture, loss of $H^{\bullet}$ followed by fragmentation of the ensuing MH^+ species. In these conditions, one should expect that the fragments should be formed through a mechanism similar to that of MH^+ ions upon CID activation. Identical structures of both CID and ECD *b* type fragments of AGWLK and AHDAL[3] pentapeptides were obtained through IRMPD action spectroscopy performed using a FEL laser coupled with an FT-ICR mass spectrometer[4] located at the CLIO facility in Orsay, which confirmed this hypothesis.

For the *w* ion series, the mechanism remains to be elucidated: dependence of fragment size with peptide size as well as absence of any surviving *z* ion rules out a mechanism based on a consecutive fragmentation of *z* ions, as suggested in the literature. One has therefore to investigate alternative possible mechanisms. One key requirement is to propose a mechanism that agrees with the structure of the fragment ions. We therefore attempted to resolve the structure of *w* ions based on IRMPD spectroscopy. As no reference structure can be used for comparison, the IRMPD action spectra were compared with calculated spectra.

[1] *R. A. Zubarev, Curr. Op. Biotechnol. 15, 12-16 (2004).*
[2] *G. van der Rest, R. Hui, G. Frison, J. Chamot-Rooke, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 22, 1631-1644 (2011).*
[3] *A.C. Gucinski, J. Chamot-Rooke, E. Nicol, A. Somogyi, V.H. Wysocki, J. Phys. Chem. A 116, 4296-4304 (2012).*
[4] *J.M. Bakker, T. Besson, J. Lemaire. D. Scuderi, P. Maître, J. Phys. Chem. A 111, 13415–13424 (2007).*

P-115

LA DOUBLE-RÉSONANCE RÉSOLUE EN TEMPS UNE NOUVELLE MÉTHODE ANALYTIQUE POUR LA MESURE DES VITESSES DE DISSOCIATION PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE FT-ICR.

Marie Pérot-Taillandier[1,2], Séverine Zirah[1], Sylvie Rebuffat[1], Richard B. Cole[2], Jean-Claude Tabet[2], Carlos Afonso[2,3]

1 - Museum National d'Histoire Naturelle, Molécules de Communication et d'Adaptation des Micro-organismes, UMR 7245 CNRS - MNHN, CP 54, 57 rue Cuvier, F-75005 Paris, France
2 - Université Pierre & Marie Curie, Institut Parisien de Chimie Moléculaire, UMR 7201 CNRS - UPMC, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France
3 - Université de Rouen, UMR 6014 CNRS COBRA, INSA Rouen, 1 rue Tesnière, 76821 Mont Saint-Aignan, France

La double-résonance s'applique aux mécanismes consécutifs de décomposition, du type I0 → I1 → I2i. Réalisées sur un FT-ICR, les expériences de double-résonance consistent à éjecter en continu, de façon résonnante, un ion intermédiaire (I1) tout au long de la fragmentation de l'ion précurseur (I0)[1,2,3]. Suivant la cinétique de décomposition des ions I1, les ions produits I2i sont, soit éjectés de la cellule ICR simultanément à I1 (cinétique lente), soit conservés au sein de la cellule (cinétique rapide). En variant l'amplitude du potentiel d'excitation (V_{exc}) de l'ion I1, on modifie sa vitesse d'éjection. Suivant la cinétique des différentes voies de décomposition (I1 → I2i), l'abondance relative des ions produits I2i s'en trouve plus ou moins affectée. La conversion du potentiel (V_{exc}) en temps (t_{ej}) d'éjection permet d'accéder à la mesure des constantes de vitesse de chaque voie de dissociation[4].

Nous nous sommes intéressés aux techniques de dissociation par capture d'électron (ECD) et détachement d'électron (EDD) qui conduisent à la formation d'intermédiaires radicalaires, à l'origine des principales fragmentations observées. Nous avons vérifié la validité de cette nouvelle méthode analytique, de double-résonance résolue en temps (TR-DR), en l'appliquant à la différenciation par ECD de deux peptides topoisomères[4]. Une autre étude de TR-DR a également été réalisée sur une séquence peptidique linéaire étudiée par EDD et nous a permis de caractériser différents mécanismes de fragmentation.

[1] *Lin, C.; O'Connor, P. B.; Cournoyer, J. J. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2006, 17, 1605-1615.*
[2] *Kinet, C.; Gabelica, V.; Balbeur, D.; De Pauw, E. Int. J. Mass Spectrom. 2009, 283, 206-213.*
[3] *Nguyen, V. H.; Afonso, C.; Tabet, J.-C. Int. J. Mass Spectrom. 2011, 301, 224-233.*
[4] *Pérot-Taillandier, M.; Zirah, S.; Rebuffat, S.; Cole, R. B.; Tabet, J.-C.; Afonso, C., Anal. Chem. 2012, DOI: 10.1021/ac300607y.*

FROM MANUAL TO FULLY AUTOMATED PROTOCOL OF FAST MICROBIAL LYSIS AND PROTEIN DIGESTION PROTOCOL FOR PEPTIDES ANALYSIS

Hervé Rostaing[2], Véronique Lanet[2], **Laurent Veron**[1], Marie-Hélène Charles[1], Thibault Champion[1], Agnès Dupont-Fillard[2], Thierry Kollaroczy[2], Frédéric Mallard[1,2], Patrick Broyer[2], Yannick Charretier[1], Jean-Philippe Charrier[1], Gaspard Gervasi[1], Alain Theretz[1]

1 - bioMerieux S.A, chemin de l'Orme, Marcy L'Étoile, 69280 France
2 - bioMerieux S.A, 5 rue des Berges, Grenoble, 38 000 France

MALDI-TOF Mass Spectrometry has emerged as a new identification tool in microbiology within a few years. Several companies sell instruments and databases of microorganisms for *in vitro* Diagnostic based on this technology (Bruker, bioMerieux…). If MALDI-TOF mass spectrometry is very efficient for identification it seems to be more limited for R/T/V diagnosis (Resistance/Typing/Virulence). Other mass spectrometry technologies could offer expanded information about the microorganism's components leading to a better classification (typing) and even R/V information. LC-ESI-MS is one of these promising technologies.

After identification, R/T/V information can be obtained by searching specific peptides using LC-ESI MS in Multiple Reaction Monitoring mode. As our approach requires lysis and digestion steps, preprocessing of the sample is nevertheless much more complex for LC-ESI-MS than MALDI-TOF. Thus we developed a simplified protocol: starting from a traditional 17 hours manual protocol (overnight incubation) we reduced it to 30 minutes (that part is developed in the abstract of Laurent Veron: Fast microbial lysis and protein digestion protocol for peptides analysis by LC-ESI mass spectrometry in MRM mode). In order to increase the overall throughput of peptide detection we automated this fast protocol. Here we describe the main technical challenges and protocol modifications to switch from a manual to a fully automated protocol (from bacteria in vial to purified peptides). The system is already in use in our laboratory. Within 40 minutes it provides 30 -ready for analysis- clean peptides samples starting from microorganism pellet or suspension.

P-117

HIGH-RESOLUTION ION ISOLATION IN FOURIER TRANSFORM ION CYCLOTRON RESONANCE MASS SPECTROMETRY BY REVERSING THE PHASE OF THE RF EXCITATION PULSE

Akansha Sehgal[1], Maria A. van Agthoven[2], Geoffrey Bodenhausen[1], Christian Rolando[2]

1 - UMR 7203 Département de Chimie, École Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, Paris 75005, France
2 - USR 3290 MSAP, Université Lille 1, Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Ion isolation is the first step of any MS/MS experiment. FT-ICR instruments are equipped with a built-in quadrupole for ion isolation, which suffers from low resolution and transmission, *ca.* 30% at unit resolution. FT-ICR can also perform in-cell ion isolation using resonant or off-resonance excitation. Resonant ejection methods have the inconvenience that the ion to be selected is excited, thereby causing the ion to drift away from the center of the cell and preventing the use of IRMPD or ECD for fragmentation. To solve this problem, the COSE (also called CHEF) pulse sequence was introduced to minimize undesirable off-resonance excitation of ions by adjusting the frequency of each pulse so that the ion to be isolated is returned to its starting point at the end of the pulse[1]. A simpler technique for high-resolution ion isolation was demonstrated by Vulpius and Houriet[2]. This approach is based on reversing the phase of the RF pulse when the sweep reaches the frequency of the ion to be isolated, creating a notch in the spectrum and confining the chosen ion to the center of the ICR cell, while ejecting the rest of the ions. This approach relies on a good linearity of the excitation, which is also important for 2D FT-ICR.

We have further developed this technique on a 9.4 T FT-ICR mass spectrometer. The ejection efficiency depends on the sweep rate of the excitation pulses and on the pulse intensity. We optimized the parameters of the pulse sequence for substance P, insulin, ubiquitin, ribonuclease A and a tryptic digest of cytochrome C. For substance P, we isolated the monoisotopic $[MH_2]^{2+}$ ion and fragmented it by ECD, and succeeded in separating $[MH_2]^{\bullet+}$ from the ^{13}C isotope of MH^+. The resolution of the ejection decreases with increasing *m/z* ratio, but by optimizing the power of the excitation pulses we could isolate ions of high *m/z* ratios without loss of resolution. For insulin and ubiquitin, we isolated multicharged ions with both high and low abundance, with a resolution of nearly 10,000. For ribonuclease A, we selected monoisotopic peaks of three consecutively charged states at once. Monoisotopic peaks of various peptides in the tryptic digest of cytochrome C could also be selected.

Applications of isolation by notch ejection include high-resolution in-cell MS/MS isolation with ECD and IRMPD and selective isolation of endogenous peptides and their isotopically labeled counterparts in LC-MS for AQUA quantification, which is under investigation.

[1] *T. Vulpius and R. Houriet, Int. J. Mass Spectrom. (1989) 88,283-290.*
[2] *L.J. de Koning, N.M.M. Nibberling, S.L. van Orden and F.H. Laukien, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes (1997) 165/166 , 209-219.*

OPTIMISATION DES SÉQUENCES D'IMPULSION ET DU TRAITEMENT DES DONNÉES EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE FT-ICR BIDIMENSIONNELLE (2D) POUR L'ANALYSE DE POLYMÈRES ET DE BIOMOLÉCULES

Maria A. van Agthoven[1], Akansha Sehgal[2], Lionel Chiron[3], Marie-Aude Coutouly[4], Philippe Pelupessy[2], Geoffrey Bodenhausen[2], Marc-André Delsuc[3], Christian Rolando[1]

1 - USR Miniaturisation pour la Synthèse, l'Analyse et la Protéomique (USR MSAP 3290) - Université de Lille 1, Sciences et Technologies - bat C4 59655 Villeneuve d'Ascq cedex France - France
2 - Département de Chimie - École Normale Supérieure de Paris - ENS Paris - 4, rue Lhomond 75005 Paris - France
3 - Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) - Université de Strasbourg - 1 Rue Laurent Fries 67400 Illkirch-Graffenstaden - France
4 - nmRTEC - Bât. B - Bioparc Bd Sébastien Brandt 67400 Illkirch-Graffenstaden - France

La spectrométrie de masse FT-ICR bidimensionnelle donne des cartes représentant les profils de fragmentation d'échantillons complexes sans nécessiter d'isoler les ions précurseurs: spectre MS (droite d'autocorrélation), spectres d'ions fragments, d'ions précurseurs, et droites donnant les pertes de charges ou de neutres. Les premières expériences de FT-ICR MS bidimensionnelle ont été réalisées par Pfändler *et al.* en 1988 mais, du fait de nombreuses limitations, ne se sont pas imposées dans le champ analytique contrairement à la RMN. Depuis 2010, nous avons retravaillé cette séquence d'impulsions sur un spectromètre de masse FT-ICR à haut champ (9,4 T) ce qui nous permet de travailler entre *m/z* 100-2500 avec des modes de fragmentation sans gaz (IRMPD, ECD) qui préservent la résolution de l'ICR.

Trois problèmes principaux se posent en FT-ICR bidimensionnelle. Un premier problème logiciel et algorithmique est la taille des données, qui dépasse largement à la résolution courante en mode spectre complet une taille de 4 Go adressable par un système 32 bits. Ensuite, la fluctuation du nombre d'ions dans la cellule ICR crée du bruit de scintillation qui se traduit par des bandes verticales le long des pics de plus grande amplitude. Enfin, la modulation du rayon cyclotron des ions n'est pas sinusoïdale et cause l'apparition d'harmoniques verticales sur le spectre de masse bidimensionnel.

Nous avons développé des solutions pour résoudre ces trois problèmes. Pour accélérer le traitement et la visualisation des données de grande taille, nous avons développé un logiciel en langage Python 64-bit utilisant le Hierarchical Data Format (HDF5). Ensuite, pour réduire le niveau de bruit de scintillation, nous avons développé une version statistique de l'algorithme de débruitage de Cadzow. Nous avons enfin optimisé l'amplitude et la durée des impulsions RF pour rapprocher la modulation d'une modulation sinusoïdale et augmenter l'amplitude des pics fragments par rapport aux pics précurseurs.

Afin de démontrer les capacités analytiques de la FT-ICR MS 2D ainsi optimisée nous avons analysé des protéines intactes et en digest (ubiquitine, ribonucléase A, cytochrome C), ainsi que des triglycérides et des polymères PAMAM en IRMPD, ECD et AI ECD. Nous comparons la FT-ICR bidimensionnelle à la MS/MS en termes de rapport signal-sur-bruit, temps d'expérience, consommation d'échantillon, profil de fragmentation et recouvrement de séquence pour les peptides et les protéines.



Index des Auteurs

- A -

Abbott, T 138
Abila, A 135
Absalon, C 125, 229
Adam, K 195
Afanasiev, P 230
Afonso, C 64, 71, 76, 153, 170, 240
Aïdoud, N 220
Aït-Aïssa, S 87
Al Ali, A 136
Al Zeine, A 171
Alayi, TD 177
Albrieux, F 230
Allain, M 120
Almeida, R 211
Alpha-Bazin, B 200
Alvarez, L 161
Amar, M 92
Amoresano, A 221
Amusant, N 212
André, M 217
André, P 128
Andres, CR 220
Antignac, JP 47, 86, 120
Arakawa, K 105, 122
Argentini, M 62
Armengaud, J 63, 88, 107
Arthur, M 195
Asano, N 105, 233
Athias, A 160
Aubriet, F 48, 82, 130
Auzeil, N 144
Ayciriex, S 144
Ayoub, D 163

- B -

Ba, B 127
Bach, V 80
Badet, B 145
Baier, HU 112
Bailly-Chouriberry, L 45, 185
Barrère, C 71
Barthélémy, C 220
Bathany, K 159
Baudot, R 78, 106, 115
Baumgart, J 211
Beaufour, M 178
Beaune, P 136
Beck, A 163
Bedossa, P 61
Belgacem, O 225
Bénédetti, H 178
Berdeaux, O 160
Berger, I 90
Bernard, P 32
Berthelot, V 161
Bertile, F 203
Berton, T 80
Bertrand, M 137
Berzina, Z 211
Bhajun, R 58
Bhandari, D 50
Biacchi, M 58
Bich, C 99, 212, 231
Bichon, E 47, 86, 120
Biet, F 196
Bilgraer, R 179
Billaud, Y 108
Blanchet, S 62
Blasco, H 220
Blesbois, E 69, 180, 193
Bloomfield, N 138, 181
Blu, J 236
Bodenhausen, G ... 242, 243
Bodier, CC 196
Boeri Erba, E 90
Boeuf, A 75, 97, 204
Boitel-Conti, M 168
Bolbach, G 91
Bonnaire, Y 45, 185
Bonnel, D 213
Bonnet-Brilhault, F 220
Bosch, R 107
Bossard, N 108, 114
Bouchonnet, S 87
Boukrara, A 81
Boulanger, N 75, 97, 204
Bour, B 165
Bour, J 166
Bourcier, S 87
Bourin, MC 180, 193
Boursier-Neyret, C 83
Bouyssière, B 139, 164, 222
Boyard, F 45
Brachet, F 186
Brasme, B 238
Bray, F 55
Bretillon, L 160
Briois, C 81
Briois, V 230
Brionne, A 98, 199
Broussard, C 186, 195
Broyer, P 206, 241
Brunelle, A . 60, 92, 99, 136, 145, 212, 231
Bryce Young, J 181
Bueno, M 222
Buisson, C 223
Bulet, P 43
Buleté, A 78, 123, 223
Buré, C 85, 127
Busnel, JM 150
Busset, C 138, 181, 189

- C -

Cabaret, S 160
Cabillic, J 141
Cacas, JL 85
Cadène, M 151, 167, 178
Cadoret, V 69, 194
Cahier, K 180, 193
Califano, D 198
Callebaut, I 177
Camadro, JM 61, 197
Camilleri, J 106
Canaff, C 119
Canon, F 59
Carapito, C 67
Cariou, R 86, 120
Carrasco, N 81
Carré, V 48, 82, 130
Carrière, R 106
Carruthers, VB 177
Castel, P 229
Cazaunau, M 114
Chafey, P 186
Chahine, R 190
Chait, BT 40
Chamot-Rooke, J 41, 239
Champion, T 206, 241
Chapelle, M 61, 197
Chapuis, C 81
Chapuis, I 145
Chardon, K 80
Charles, L . 70, 72, 111, 149, 165, 166, 171
Charles, MH 206, 241
Charretier, Y 206, 241
Charrier, JP 206, 241
Chassaing, G 91
Chendo, C 149
Chéreau, S 47
Cheynier, V 59
Chezal, JM 217
Chiappetta, G 198
Chiron, L 243
Choquel, J 55
Christie-Oleza, JA 88, 107
Chuzel, O 149
Clary, G 186
Clavaguéra, C 237
Clavier, S 91
Coadou, G 153
Cochard, T 196
Coffre, A 162
Colangelo, C 138
Colas, O 163
Cole, RB 33, 236, 240
Colin, X 65
Collin, E 75, 97, 204
Colombat, M 183

Compagnon, I 237
Comte, B 135
Cormant, F 185
Cornelli, S 81
Cornu, D 62
Correia, C 66
Cossoul, C 135
Cottin, H 81
Couderc, F 44
Courant, F 47
Couret, MJ 217
Coureux, PD 56
Coutouly, MA 243
Cox, D 138, 181
Cren-Olivé, C ..78, 106, 113, 115, 126, 223
Criscuolo, F 203
Cubizolles, M 206
Cudré, S 218

- D -

Da Costa Jacob, C 219
Dacheux, JL 69
Dagher, Z 190
Dallongeville, S 182
Daniel, R 172
Dargère, D 144
Dauly, C 185
De Graeve, J 140
De Person, M 162
De Simone, V 198
De Waziers, I 136
Debaene, F 163
Debiton, É 217
Dedieu, A 63, 200
Defer, C 55
Dehon, C 110
Delatour, V 73, 140
Delépée, R 77, 129
Delhaye, S 177
Delhomme, O 48
Delsuc, MA 243
Delval, V 75, 97, 204
Demey-Thomas, E 183
Dernis, D 55
Dervilly-Pinel, G 47, 219
Desbenoit, N 50
Desprez, A 139, 164
Destandau, É ...84, 121, 128
Di Palma, S 201
Dias, M 132
Diemer, H 163
Disnar, JR 108
Doassans, N 82
Domalain, V 76
Dossmann, H 64
Druart, X 69, 192
Du, X 91
Dubost, JP 127
Duchamp, C 230
Dufour, A 82
Dufourny, L 187
Dumont, G 140
Dupont-Fillard, A ..206, 241
Durand, D 135
Durand, P 145
Durighello, E 88, 183
Duvillard, L 140

- E -

Ejsing, C 211
Elfakir, C 84, 121, 128
Emond, P 220
Enche, J 202
Engrand, C 81
Epinette, C 167
Erard, M 161

- F -

Fack, F 213
Farre, I 68
Fatou, B 68
Fenyö, D 40
Ferchaud, S 192
Fernandez, B 63
Ferrié, L 92
Fieulaine, S 154, 155
Figadère, B 92
Fildier, A 223
Fischer, L 159
Flandinet, L 232
Flinois, JP 136
Fontagné-Dicharry, S 222
Fontaine, C 184
Forest, É 57
Fornecker, L 67
Fougère, L 84, 121
Fouquet, T 165, 166
Fournier, I 51, 68, 93
Franck, J 51, 68, 93
François, YN 58, 150
Frese, C 201
Frison, G 41, 239
Fujita, S 105, 233
Fujito, Y 122
Fukuyama, H 74

- G -

Gabant, G 167
Gahoual, R 150
Gaillard, JC 63, 200
Gaji, RY 177
Galmier, MJ 217
Gantois, F 141
Garcia, C 197
Garcia, P 45, 185
Gargaros, A 69, 191, 194, 205
Garin, J 188
Garnier, N 182
Garric, J 78
Gaudin, K 127
Gaudin, M(1) 192
Gaudin, M(2) 83, 144
Gaugué, I 145
Gauthier, F 167
Gautron, J 98, 199
Geißler, M 112
Gennaro, M 221
Gennetay, D 187
Genty, C 87
Gérard, N 69, 180, 192, 193, 205
Gervasi, G 206, 241
Gevaert, K 188
Giacomoni, F 79
Giangrande, C 221
Giglione, C 154, 155
Gigmes, D 111
Gilbert, FB 196
Gillet, S 179
Gilmore, I 99, 231
Gimbert, Y 236, 238
Giroud, B 123
Giuliani, A 59, 60
Giusti, P 139, 164
Gobert, M 135
Godin, F 178
Godin, S 222
Gondelle, H 136
Gonnet, F 172
Goyallon, A 124
Grand, N 81
Grasseau, I 69, 180, 193
Grateau, G 183
Grigoras, CG 84
Grossel, M 153
Guenther, S 50
Guerif, F 194
Guérin, P 107
Guichard, G 159
Guillonneau, F 186, 195
Gust, M 78

- H -

Haddad, I 74
Haldys, V 66
Hamieh, S 119
Hamm, G 213
Hammann, P 190
Hannibal-Bach, HK 211
Harakat, D 234
Harichaux, G .. 98, 169, 180, 187, 191, 192, 196, 199
Havelund, R 99, 231
Heck, AJR 152, 188, 201
Helbert, W 38
Heninger, M 65
Hernandez, O 235
Heuillet, M 73, 140
Hilaire, D 202

Hirano, I 105, 122
Hoffmann, J 74
Holmes, E 83
Holthuis, JCM 152
Hopfgartner, G 94, 218
Houée-Levin, C 161
Hovasse, A 177
Huart, JJ 55
Hubert-Roux, M 76
Hui, R 41
Hunter, C 189
Husen, P 211

- I -

Ibrahim, M 190
Inohana, Y 122
Ivosev, G 138

- J -

Jacob, J 108, 114
Janssen, C 42
Jaquillard, L 151
Jaulhac, B 75, 97, 204
Jault, JM 57
Joly, C 135
Joubert, L 76
Jullien, L 238
Junot, C 45

- K -

Kadar, H 92
Kellenberger, C 167
Kern, A 75, 97, 204
Keunen, O 213
Khodorova, N 168
Kiss, A 106, 223
Kitano, S 112
Koifman, O 230
Kollaroczy, T 241
Kollmer, F 99, 231
Korkmaz, B 167
Kräher, S 112
Kravtzoff, A 169
Krier, G 139, 164
Kudrik, E 230
Kuhn, L 190
Kukui, A 109

- L -

Labas, V 69, 98, 169, 180, 187, 191, 192, 193, 194, 196, 199, 205
Lafay, F 126
Lahaye, M 173
Lalere, B ..73, 140, 141, 142
Lalmanach, AC 69, 169
Lalmanach, G 169
Lanet, V 206, 241
Lange, C 76, 153, 156
Langer, JD 207
Laouirem, S 61
Laprévote, O . 136, 144, 179
Lardic, L 191
Lardy-Fontan, S 141, 142
Lartia, R 238
Latappy, H 65
Latrous El Atrache, L 66
Laumonnier, F 220
Lauricella, R 171
Lavanant, H 170
Le Bizec, B . 47, 86, 120, 219
Le Bras, J 234
Le Caër, JP 136
Le Diouron, V 142
Le Douaron, G 92
Le Faouder, J 61
Le Faucheur, S 218
Le Milbeau, C 108, 114
Le Quéré, JL 131
Le Vot, C 110
Lebesgue, N 152
Leblanc, É 68
Lebreton, JP 81
Lecher, S 196
Lediouron, V 141
Leduc, M 195
Lefay, C 111
Lefrancois, LH 196
Léger, T 61, 197
Legros, V 172
Leize-Wagner, E 58, 150, 190
Lennon, S 67
Léonard, D 126
Leprovost, J 65
Lequart-Pillon, M 168
Leriche, ED 153
Lesage, D 64, 236
Lesellier, É 84
Lestremau, F 224
Lethuillier, A 81
Levi, M 105, 122, 233
Levillain, É 132
Lilley, K 188
Lippens, M 93
Liuu, S 183, 198
Locht, C 196
Loriot, MA 136
Louarn, E 110
Loutelier-Bourhis, C 71, 153, 170
Lucio, M 223
Lyan, B 79

- M -

Maia-Grondard, A 226
Maire, F 71
Major M 111
Major, Y 70
Makarov, A 81
Mallard, F 206, 241
Marcelo, P 168
Marchand, P 86
Marchetti, C 136, 200
Marcoux, J 89
Marie, P 98, 199
Marquant, R 91
Marteau, P 200
Martens, JK 237
Masselon, C 90
Massicot, F 144
Masson, É 160
Masson, P 83
Matheron, L 188, 201
Maunit, B 77, 121, 129
Mauvieux, L 67
Mavel, S 220
Mayeux, P 195
Mayhoub, F 80
Mazuet, C 202
Méchulam, Y 56
Médale, F 222
Mehmood, S 57
Meinnel, T 154, 155
Méjean, M 60
Mellouki, A 114
Memboeuf, A 238
Menet, MC 186
Meriaux, C 51
Merola, F 161
Mesplet, N 143
Mestdagh, H 65, 110
Mestivier, D 61
Mewaere, J 63
Meyer-Monath, M 224
Michel, H 207
Miguet, L 67
Milet, A 232
Milosavljevic, A 59
Miotello, G 107
Miyagawa, H 112
Mizzi, A 171
Moellers, R 99, 231
Mollica, G 70
Mongrand, S 85
Monteau, F 47, 86, 219
Montigny, F 220
Moreau, S 105, 112, 122, 225, 233
Moreira, G 111
Morel, I 224
Morgner, N 89
Morineaux, V 202
Mouche, C 125, 229
Mounetou, E 217
Moussa, F 162
Mouveaux, T 177
Mukaibatake, K 105, 233
Muller, JF 164

- N -

Nadal-Desbarats, L 220
Nahon, L 59
Namy, O 62
Ndiaye, S 221
Nicholson, JK 83
Niclou, S 213
Nicol, E 237, 239
Nicolas, C 59
Niehuis, E 99, 231
Nitsch, R 211
Nogales, B 107
Nonier, MF 125
Nozerand, N 200
Nussenzweig, MC 40
Nys, Y 98, 199

- O -

Ohanessian, G 237
Orthous-Daunay, FR 232
Ortiz, A 55
Oulyadi, H 153
Owens, N 159

- P -

Pais-de-Barros, JP 160
Paradis, V 61
Paris, A 45
Parra, J 172
Parrain, JL 149
Pasquier, L 31, 128
Peignaux, M 73, 140, 141
Pelupessy, P 243
Peng, L 72
Pennanec, X 131
Peponnet, C 206
Perez del Valle, C 232
Pérot-Taillandier, M 240
Perreau, F 124
Petiot-Bécard, S ... 154, 155
Peysson, W 113
Phan, TNT 70, 111, 165
Pilard, S 168
Pinard, L 119
Piña-Villalonga, JM 107
Pizzala, H 70
Plumbridge, J 145
Plumel, M 203
Politis, A 89
Popot, MA 45, 185
Porbeck, F 207
Porta, P 94
Pouech, C 126
Pouilloux, Y 119
Pujos-Guillot, E 79, 135
Py-Circan, C 114

- Q -

Quanico, J 68, 93
Quémener, B 173

- R -

Raijmakers, R 188
Raisman-Vozari, R 92
Raze, D 196
Rebuffat, S 240
Réfrégier, M 59
Regazzetti, A 144
Resch, U 225
Reynaud, K 205
Rhourri-Frih, B 127
Richomme, P 132
Riès-Kaut, M 186
Riffault, L 128
Rivera, F 206
Robic, D 186
Robinson, C 89
Rochereau-Roulet, S 219
Roduit, B 65
Roepstorff, P 37
Rolando, C 55, 182, 242, 243
Römpp, A 50
Rossier, J 74
Rostaing, H 206, 241
Rouden, J 76
Roussel, A 167
Rousset, JP 62
Royère, D 194
Ruch, D 165, 166
Rusconi, F 161

- S -

Sabatier, L 75, 97, 204
Sabidó, E 188
Sablier, M 87
Sacco, E 195
Sachon, E 91
Sagan, S 91
Sago, L 195
Saliou, JM 155
Salnot, V 195
Salpin, JY 66
Salvia, MV 115
Salwiński, A 77, 129
Salzet, M 51, 68, 93
Sanglier-Cianférani, S 49, 67, 154, 155, 163
Sarni-Manchado, P 59
Schaeffer-Reiss, C 177
Scheffler, JL 130
Scheid, JF 40
Schinkovitz, A 132
Schlapbach, R 188
Schmitt, E 56
Schmitter, JM . 85, 127, 159
Schmitt-Kopplin, P 223
Schmitz-Afonso, I . 136, 145, 226
Schnell, G 75, 97, 204
Schober, Y 50
Scholten, A 152
Schramm, F 97, 204
Schramm, S 130
Sehgal, A 242, 243
Sémon, É 131
Seraphin, D 132
Seymour, SL 189
Shabaz, M 201
Signor, L 90
Sinzinger, H 225
Skipor, J 187
Slaveykova, V 218
Slomianny, C 177
Sloves, PJ 177
Sorokin, A 230
Souissi, Y 87
Soutonie, K 205
Spengler, B 50
Spina, L 69
Stauber, J 213
Stead, S 219
Steinmetz, V 161
Stien, D 60, 212
Stojiljkovic, N 45
Stübiger, G 225
Szopa, C 46, 81

- T -

Tabet, JC ... 45, 64, 236, 240
Tack, K 80, 224
Tarighi, M 119
Tarrit, S 217
Tate, SA 181
Teixeira-Gomes, AP 69, 169, 180, 187, 191, 192, 193, 194, 196, 205
Tellier, F 226
Terlot, JD 180, 193
Theretz, A 241
Thiersé, D 203
Thiery, JC 187
Thirkell, L 81
Thissen, R 81, 232
Tintaru, A 72
Tognetti, V 76
Tokarski, C 55, 182
Tomavo, S 177
Toniazzo, V 165, 166
Tortajada, J 66
Touboul, D . 60, 92, 99, 136, 145, 212, 231
Touré, M 149
Tournier, M 106
Tripi, G 220
Trowitzsch, S 90
Tsague Kenfack, G 132
Tsikis, G 192
Tuccio, B 171

- U -

Ueberheide, BM 40

Uggerud, E 64
Uzbekova, S 69, 191, 194, 205

- V -

Vallée, B 178
Van Agthoven, MA 242, 243
Van der Rest, G ..41, 56, 59, 239
Van Dorsselaer, A .. 67, 154, 155, 163, 177, 203
Varesio, E 94, 218
Vaslin-Reimann, S .. 73, 140, 141, 142
Vasseur, A 234
Vauchez, A 123
Vénisseau, A 86
Verdier, Y 74
Vernex-Loset, L 164
Veron, L 206, 241
Veselkov, KA 83
Vestal, ML 39
Vinh, J 74, 183, 198, 221
Vivas de Gaulejac, N 125
Vivas, N 125
Vlak, K 207
Vogt, J 211
Vorapalawut, N 164
Vourc'h, P 220
Vuitton, V 232
Vulliet, E 106, 113, 115, 123

- W -

Wagner-Rousset, E 163
Walther, B 83
Wang, Q 72
Wang, S 89
Werkmeister, E 177
Westall, F 137
Wiest, L .. 78, 106, 115, 123, 126
Wisztorski, M 51, 68, 93
Wu, J 56
Wuczkowski, M 225

- X -

Xie, H 207

- Y -

Young, P 219

- Z -

Zenobi, R 90
Zhou, H 201
Ziarelli, F 70
Ziemianin, A 156
Zirah, S 240


cnrs
dépasser les frontières


UNIVERSITE D'ORLEANS


icoa


CBM
Centre de Biophysique Moléculaire


ICSN
Institut de Chimie
des Substances Naturelles


CHR
ORLÉANS


Institut de
Cancérologie
de l'Ouest


Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale


OSUC
Observatoire
des Sciences de
l'Univers en
région Centre


Région
Centre


ORLÉANS