



**FACULTÉ DES SCIENCES**  
**Département de chimie**

**DÉVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UNE  
MÉTHODE MALDI-MS/MS POUR L'IDENTIFICATION DE  
CYANOTOXINES**

Dissertation présentée par **Christelle Deleuze**  
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences  
Année académique 2018 – 2019

MolSys Research Unit  
Laboratoire de Spectrométrie de Masse  
Professeur Edwin De Pauw et Professeur Loïc Quinton



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Edwin De Pauw de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire ainsi que de son soutien et son optimisme tout au « très » long de ce périple que fut ma thèse.

D'autre part, je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Loïc Quinton pour son soutien professionnel et amical au cours de tout ce travail de thèse, tant pour l'aspect réalisation que pour l'aspect rédaction. Merci de ton infinie patience toutes ces années durant.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame Annick Wilmotte, Messieurs Christophe Flahaut, François Guillonnet et Gauthier Eppe d'avoir accepté de faire partie du jury de ce travail.

Merci à toute l'équipe du LSM qui m'a permis, au cours la première partie de cette thèse, de passer des moments inoubliables tant à la cafeteria du LSM, qu'en séminaire à Saint-Dié des Vosges ou lors de soirées de Noël mémorables. Merci donc à Nico, Gaby, Domi, Cath, Johan, Max, MAM, François, Léti, Kevin, Joëlle.

Merci aussi aux "nouveaux", pour leur aide et leur soutien lors de mes visites au labo....merci Emeline pour le temps passé à me familiariser à l'IMS, Michel pour ces heures passées à régler le robot..., Christopher pour m'avoir présenté ce bon Kendrick....Merci aux filles du Cart et de la protéo pour ces petits moments de papote (shopping, mojito, ciné ou bowling)!

Merci à Yannick Lara pour tout l'aspect « terrain », les discussions MALDI et microcystines et pour les échantillons environnementaux fournis tout au long de la thèse, et qui m'ont permis de clôturer ce travail par une application directe des travaux réalisés.

Je voudrais aussi remercier sincèrement Domi. Tu es l'une des personnes les plus intelligentes que je connaisse, et ton humilité n'a d'égale que ta gentillesse. Merci pour ta disponibilité depuis le premier jour et lors de chacune de mes apparitions « fugaces ».

Je remercie également du fond du cœur mes « chefs » qui, depuis mon arrivée chez Nikkiso, n'ont eu de cesse de me soutenir dans la finalisation de ce projet et m'ont donné les outils pour en venir à bout. Benoit, et surtout Damien,

merci de votre compréhension et de votre soutien sans faille ces 4 dernières années.

Merci à mes amis, anciens et nouveaux, de votre patience, de vos efforts de compréhension lorsqu'à tant de reprises à la question : tu viens boire un verre avec nous – marcher – te promener...la réponse était la même : « je travaille sur ma thèse »...Que vous soyiez « du milieu » ou pas du tout, vous avez toujours été bienveillants envers mes efforts et les choix que j'ai pu faire.

Merci à ma famille, ma belle-famille pour votre soutien et votre aide précieuse lorsque j'avais besoin de temps pour avancer sur ce travail de longue haleine. Vous ne m'avez jamais reproché quoique ce soit bien que cela dure depuis tant d'années et que « ce n'est pas encore fini en fait ? ».

Il m'est impensable de ne pas remercier mes parents. Maman, papa, merci pour ces heures passées à me faire comprendre la mécanique, ces discussions interminables, ces jours et ces nuits passés à relire et encore relire cette incompréhensible spectrométrie de masse. Mais surtout, merci à vous d'avoir compris que j'avais besoin d'aller au bout...quoique je puisse manquer en chemin.

Julie, on est si différentes mais pourtant...tu as toujours pensé que j'y arriverais...et je dois bien avouer que s'il y a bien une personne qui a cru en moi jusqu'au bout, c'est bien toi ! Tout simplement merci pour tout : ton soutien de sœur, de belle-sœur, et désormais de super « Tatie Marraine » !

Enfin, merci à Nico – mon amoureux – mon ami – mon âme sœur. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi, pour Aubane, pour Opaline. Merci de ton soutien, merci de t'être associé à 100% à moi dans mon combat ...et d'avoir partagé mon bonheur à chaque étape franchie, comme si c'était le tien.

Merci d'être un papa merveilleux pour Aubane et Opaline au quotidien, et d'avoir été un papa extraordinaire lorsque nous avons décidé ensemble, que j'irai au bout de ce travail, coûte que coûte.

Merci pour nos discussions, merci de me remonter le moral,

Merci d'être toi – ce qui nous permet d'être nous.

## **JURY ET FINANCEMENT**

### Jury de thèse

Mr Gauthier Eppe : Président (Professeur ordinaire – Université de Liège)

Mr Edwin De Pauw : Promoteur (Professeur ordinaire – Université de Liège)

Mr Loïc Quinton : Promoteur (Chargé de cours – Université de Liège)

Mme Annick Wilmotte (Docteur – Université de Liège)

Mr Christophe Flahaut (Maître de conférences – Université d'Artois)

Mr François Guillonnet (Docteur – Université Paris Descartes)

### Financement

Cette recherche a été financée en partie par une bourse de doctorat du Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (F.R.I.A.)



## ABSTRACT

Water quality monitoring is an area where miniaturization and speed are key parameters to facilitate portability. In the case of recreational water analysis, ELISA is the most widely used method, and analysis can be performed directly in the field thanks to commercially available kits. This method is robust and sensitive but suffers from a lack of specificity. Indeed, ELISA generally targets only one particular compound or family without distinction between potentially more or less toxic variants.

Cyanobacteria are one of the world's earliest groups of living organisms. If their presence is natural in waterbodies such as lakes or rivers, their abnormally important development under certain conditions is problematic. Indeed, during cell lysis, a very large quantity of toxins can disperse quickly, with potentially dazzling effects such as paralysis followed by the death of the victim in the case of ingestion of saxitoxin, for example.

One of the most widespread cyanotoxines, for which the World Health Organization (WHO) has set a limit of 1  $\mu\text{g/L}$ , is microcystin LR (MC-LR). To date, more than 200 variants of microcystins and other cyanotoxins, of variable toxicity, have been identified. It is therefore essential to include them in recreational water quality monitoring in order to prevent risks as much as possible.

This PhD has been started in that context, with the main goal being to develop new approaches for the analysis and identification of cyanotoxins.

When the identification of the composition of a sample is a must, mass spectrometry (MS) is usually the reference method. In order to improve quantification limits, mass spectrometry is used either at high resolution and/or in "tandem or MS/MS" mode.

The mixtures to be analyzed being complex, to avoid interferences, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation was developed upfront mass spectrometry analysis. When a separation technique is coupled with mass spectrometry, it can drive the choice of ion production technology. Electrospray ionization (ESI) was the method of choice. However, another source that grew up in parallel with electrospray ionization, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) can now be considered in with liquid chromatography separation. The eluent of the HPLC column is dropped onto the consecutive spots of a MALDI analysis plate. This LC-MALDI coupling offers interesting performances compared to the HPLC-ESI, especially in terms of optimal use of the sample. It is indeed deposited in its entirety on a solid support and is consumed only during LASER shots. The chromatography is somehow stored on the solid support and the analysis can be renewed later.

The final objective of this project is the development of a method for the identification and analysis of cyanotoxins by mass spectrometry coupled to HPLC separation, and more particularly HPLC-MALDI-MS/MS.

The choice of the MALDI matrix allowing the detection of a maximum of cyanotoxins was made on the basis of an exhaustive review of the literature. The

major obstacle of this part of the work was to assess the proposed solutions allowing for the detection of these toxins without interfering in the mass spectrum. The classical MALDI matrices have been evaluated and compared with the alternatives proposed by the scientific community at the beginning of this work (2006). Thus, the 2,5-DHB, HCCA and sinapinic acid matrices, in particular, were tested and compared with alternative matrices such as the DIOS (Desorption/Ionization on Silicon) system, the liquid ion matrices, the porphyrin matrices, titanium dioxide inorganic matrices and graphite carbon from pencil mines, which practical interest is obvious.

In the second part, the reductive properties of the 1,5-DAN matrix were exploited and have allowed the development of a characterization tool for microcystins. This reducing matrix, via the reduction of the C = C double bond of certain microcystins, made possible the classification of microcystins and the discrimination between the amino acids Dhb, Dha and Ser /Ala present in position 7 of the microcystin cycle.

Once the HPLC separation step was developed, we performed the HPLC-MALDI coupling via a robotic system in order to start the last part of this work, which is devoted to the analysis of environmental samples and identification of microcystins by HPLC-MS/MS by exploiting MALDI and ESI sources, high-resolution Orbitrap analyzer and Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FT-ICR-MS).

## RÉSUMÉ

Le monitoring des eaux est un domaine où la miniaturisation et la rapidité sont les maîtres mots afin de faciliter la portabilité. Dans le cas de l'analyse d'eaux de baignade, la méthode la plus utilisée est la détection immunologique ELISA, rendue possible sur le terrain via des kits commercialement accessibles. Cette méthode, robuste et sensible, souffre d'un défaut de spécificité en ne ciblant, en général, qu'une famille de composés sans permettre de distinction entre les dizaines de variants potentiellement plus ou moins toxiques.

Les cyanobactéries sont l'un des premiers groupes d'organismes vivants recensés aux origines du monde. Si leur présence est naturelle dans les étendues d'eau telles les lacs ou rivières, leur développement anormalement important dans certaines conditions est problématique. En effet, lors de la lyse cellulaire, une quantité très importante de toxines peut se disperser rapidement, avec des effets potentiellement fulgurants – comme la paralysie suivie du décès de la victime dans le cas d'une ingestion de saxitoxine par exemple.

L'une des cyanotoxines la plus répandue et pour laquelle l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fixé une limite de  $1\mu\text{g/L}$  est la microcystine LR (MC-LR). A ce jour, plus de 200 variants de microcystines et d'autres cyanotoxines, de toxicité variable, ont été recensés. Il est donc primordial de les inclure dans le monitoring des eaux de baignade afin de prévenir au maximum les risques.

C'est dans ce contexte que se situe ce travail de thèse, dont l'objectif est de mettre au point de nouvelles approches pour l'identification et l'analyse de cyanotoxines.

Lorsque l'identification des constituants d'un échantillon est souhaitée voire, requise, la spectrométrie de masse (MS) est généralement la méthode de référence. Afin d'améliorer les limites de quantification, la spectrométrie de masse est utilisée soit à haute résolution et/ou en mode "tandem ou MS/MS".

Les mélanges à analyser étant complexes, afin d'éviter les nombreuses interférences potentielles, une séparation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été mise au point en amont de la spectrométrie de masse. Le couplage d'une technique de séparation avec la spectrométrie de masse, peut imposer la technique de production d'ions dont les caractéristiques sont essentielles pour le succès de la méthode globale. L'ionisation par électrospray (ESI) était la technique de choix. Toutefois, parallèlement au développement des méthodes d'ionisation à pression atmosphérique, une autre source a également soulevé l'intérêt : la désorption-ionisation laser assistée par matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation : MALDI). Cette méthode d'ionisation peut désormais être envisagée en couplage avec la chromatographie liquide. L'éluant de la colonne HPLC est déposé goutte-à-goutte sur les plots consécutifs d'une plaque d'analyse MALDI. Ce couplage LC-MALDI offre des performances intéressantes par rapport à l'HPLC-ESI, notamment sur le plan de l'utilisation optimale de l'échantillon. Celui-ci est en effet déposé dans sa totalité sur un support solide et n'est consommé que lors des tirs LASER. La chromatographie est en quelque sorte stockée sur le support solide et l'analyse peut être renouvelée ultérieurement.

L'objectif final de ce projet est le développement d'une méthode d'identification et d'analyse de cyanotoxines par spectrométrie de masse couplée à une séparation HPLC, et plus particulièrement le couplage HPLC-MALDI-MS/MS.

Le choix de la matrice MALDI permettant la détection d'un maximum de cyanotoxines a été effectué sur base d'une revue exhaustive de la littérature. L'obstacle de taille de cette partie du travail était d'évaluer les solutions proposées qui permettent la détection de ces toxines sans interférer dans le spectre de masse. Les matrices MALDI classiques ont été évaluées et comparées avec les alternatives proposées par la communauté scientifique à l'entame de ce travail (2006). Ainsi, les matrices 2,5-DHB, HCCA et l'acide sinapinique, notamment, ont été testées et comparées aux matrices alternatives telles que le système DIOS (Desorption/Ionisation on Silicon), les matrices ioniques liquides, les matrices porphyrines, les matrices inorganiques de type dioxyde de titane et le carbone graphite issu de mines de crayon, dont l'intérêt pratique est évident.

Dans une seconde partie, les propriétés réductrices de la matrice 1,5-DAN ont été exploitées et ont permis la mise au point d'un outil de caractérisation des microcystines. Cette matrice réductrice, via la réduction de la double liaison C=C de certaines microcystines, a rendu possible la classification des microcystines et la discrimination entre les acides aminés Dhb, Dha et Ser/Ala présents en position 7 du cycle des microcystines.

Une fois l'étape de séparation HPLC mise au point, nous avons réalisé le couplage HPLC-MALDI via un système robotisé afin d'entamer la dernière partie de ce travail, laquelle est consacrée à l'analyse d'échantillons environnementaux et l'identification de microcystines par HPLC-MS/MS en exploitant les sources MALDI et ESI, et les analyseurs à haute résolution que sont l'Orbitrap et la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique et transformée de Fourier (FT-ICR-MS).

## ABRÉVIATIONS

ACN	Acétonitrile
Adda	Acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque
ADMAdda	O-acétyl-O-déméthylAdda
CAD	Collision Activated Dissociation
CID	Collision Induced Dissociation
Da	Dalton
DAD	Diode Array Detector
1,5-DAN	1,5-Diaminonaphtalène
Dha	Déhydroalanine
Dhb	Acide déhydroaminobutyrique
2,5-DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DIOS	Desorption/Ionization on Silicon
DL50	Dose létale pour 50% population
DMAdda	O-déméthylAdda
ECD	Electron Capture Dissociation
EDD	Electron Detachment Dissociation
EI	Electron Impact
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Assay
ESI	Electrospray Ionization
ETD	Electron Transfer Dissociation
EtOH	Ethanol
FA	Formic Acid - Acide Formique
FID	Free Induction Decay
FT	Fourier Transform
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
Har	Homoarginine
HCCA	Acide $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamique
HCD	Higher energy Collisional Dissociation
Hil	Homoisoleucine
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HQ	Hydroquinone
Hty	Homotyrosine
i.p.	Intrapéritonéale
ICR	Ion Cyclotron Resonance
ILM	Ionic Liquid Matrice
IMS	Ion Mobility Spectrometry
IRMPD	InfraRed MultiPhoton Dissociation
ISD	In Source Decay
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LC	Liquid Chromatography
LE	Leucine Encéphaline
Leu	Leucine
M(O)	Methionine-S-Oxyde
m/z	Rapport masse sur charge
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MC	Microcystine
MDha	N-méthyl-déhydroalanine
MDhb	Acide méthyl-déhydroaminobutyrique
MeAsp	Acide D-erythro-β-méthylaspartique
MeOH	Méthanol
MeSer	N-Méthylsérine
MNV	Mode Normal de Vibration
MS	Mass Spectrometry
MS <sup>2</sup> (MS/MS)	Tandem Mass Spectrometry
NRC	National Research Council
NRJx	Echantillon n°x provenant du lac du Ry Jaune
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAC <sup>TM</sup>	Prespotted AnchorChip <sup>TM</sup>
PEG	Polyéthylène glycol
Phe	Phénylalanine
ppb	Part per billion
PPIA	Protein Phosphatase Inhibition Assay
ppm	Part per million
PSD	Post Source Decay
Q-TOF	Hybride Quadripôle - Temps de vol
RIC	Reconstructed Ion Chromatogram
S/N	Signal/Noise
SA	Sinapinic Acid
Ser	Sérine
SI	Standard Interne
SORI	Sustained Off Resonance Irradiation
STD	Standard
SWIFT	Stored-Waveform Inverse Fourier Transform
TFA	Trifluoroacetic Acid
TIC	Total Ion Chromatogram
TOF	Time-of-Flight
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
u.a.	Unités arbitraires
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet

## TABLE DES MATIÈRES

<i>Remerciements</i> .....	<i>ii</i>
<i>Jury et financement</i> .....	<i>iv</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>v</i>
<i>Résumé</i> .....	<i>vii</i>
<i>Abréviations</i> .....	<i>ix</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>xi</i>

### **INTRODUCTION : PROBLÉMATIQUE DES CYANOBACTÉRIES ET LEURS CYANOTOXINES..... 1**

<i>Liste des figures</i> .....	<i>2</i>
--------------------------------	----------

<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>2</i>
---------------------------------	----------

#### **1. INTRODUCTION GÉNÉRALE ..... 3**

#### **2. TOXINES ENVIRONNEMENTALES ..... 6**

##### **2.1 Problématique des cyanobactéries ..... 6**

###### **2.1.1 Contexte ..... 6**

2.1.1.1 Diversité, développement et croissance.....	7
---	---

2.1.1.1.1 Diversité.....	7
--------------------------	---

2.1.1.1.2 Développement et croissance .....	8
---	---

###### **2.1.2 Cyanotoxines : Structure, mode d'action et toxicité..... 11**

2.1.2.1 Structures et modes d'action.....	11
---	----

2.1.2.2 Toxicité.....	13
-----------------------	----

###### **2.1.3 Situation à l'échelle mondiale ..... 17**

###### **2.1.4 Situation en Belgique ..... 17**

##### **2.2 Méthodes d'analyse : Etat des lieux..... 19**

###### **2.2.1 Méthodes biologiques et biochimiques..... 20**

###### **2.2.2 Méthodes physico-chimiques – HPLC..... 20**

2.2.2.1 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	20
--	----

2.2.2.2 Spectrométrie de masse.....	21
-------------------------------------	----

##### **2.3 Analyse par spectrométrie de masse..... 22**

###### **2.3.1 Sources d'ionisation ..... 22**

2.3.1.1 Electrospray .....	23
----------------------------	----

2.3.1.2 MALDI.....	24
--------------------	----

2.3.1.2.1 Principe de fonctionnement.....	24
---	----

2.3.1.2.2 Choix de la matrice MALDI.....	25
--	----

###### **2.3.2 Spectromètres de masse ..... 26**

2.3.2.1 Principe général et état des lieux .....	26
--	----

2.3.2.2 Analyseur à temps de vol.....	28
---------------------------------------	----

2.3.2.3 Analyseurs à transformée de Fourier.....	29
--	----

2.3.2.3.1 FT-ICR .....	29
------------------------	----

2.3.2.3.2 Orbitrap.....	29
-------------------------	----

2.4	<b>Spectrométrie de masse en tandem</b> .....	31
2.5	<b>Couplage HPLC-MALDI-MS(/MS) et HPLC-ESI-MS(/MS)</b> .....	33
2.5.1	<b>HPLC-MALDI-MS(/MS) et HPLC-ESI-MS(/MS)</b> .....	33
2.5.2	<b>Quantification</b> .....	34
3.	<b>OBJECTIFS ET STRATÉGIE SCIENTIFIQUE</b> .....	36
3.1	<b>Objectifs</b> .....	36
3.1.1	<b>Détection et ionisation</b> .....	36
3.1.2	<b>Caractérisation et identification</b> .....	36
3.1.3	<b>Séparation</b> .....	36
3.1.4	<b>Application environnementale</b> .....	37
3.2	<b>Stratégie scientifique</b> .....	37
<b>CHAPITRE I : OPTIMISATION DE LA DÉTECTION DE CYANOTOXINES PAR MALDI-MS</b> .....		<b>39</b>
<i>Liste des figures</i> .....		40
<i>Liste des tableaux</i> .....		41
1.	<b>OBJECTIFS ET STRATEGIE</b> .....	42
2.	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	44
2.1.1	<b>Matériel</b> .....	44
2.1.2	<b>Préparation d'échantillon</b> .....	44
2.1.3	<b>Paramètres MS (et MS/MS)</b> .....	44
3.	<b>MATRICES CONVENTIONNELLES</b> .....	45
3.1	<b>Introduction</b> .....	45
3.2	<b>Résultats et discussion</b> .....	45
3.2.1	<b>Ionisation</b> .....	45
3.2.2	<b>Quantification</b> .....	48
3.2.2.1	Préparation d'échantillon .....	49
3.2.2.2	Résultats et discussion .....	50
3.2.3	<b>Conclusion</b> .....	52
4.	<b>MATRICES ALTERNATIVES</b> .....	53
4.1	<b>Matrices à haut poids moléculaire</b> .....	53
4.1.1	<b>Introduction</b> .....	53
4.1.2	<b>Matériel et méthodes</b> .....	54
4.1.2.1	Matériel .....	54
4.1.2.2	Préparation d'échantillon .....	55
4.1.3	<b>Résultats et discussion</b> .....	55
4.1.4	<b>Conclusion</b> .....	56
4.2	<b>Matrices « transparentes »</b> .....	57
4.2.1	<b>Introduction</b> .....	57
4.2.2	<b>Matériel et méthodes</b> .....	57
4.2.2.1	Matériel .....	57
4.2.2.1.1	Solutions de matrices .....	57
4.2.2.1.2	Solutions de toxines .....	58
4.2.3	<b>Résultats et discussion</b> .....	58

4.2.4	<b>Conclusion</b>	58
4.3	<b>Ionisation DIOS</b>	59
4.3.1	<b>Introduction</b>	59
4.3.2	<b>Matériel et méthodes</b>	59
4.3.2.1	Préparation d'échantillon et paramètres MS	59
4.3.3	<b>Résultats et discussion</b>	60
4.3.4	<b>Conclusion</b>	63
4.4	<b>Matrices inorganiques</b>	64
4.4.1	<b>Introduction</b>	64
4.4.2	<b>Matériel et méthodes</b>	64
4.4.2.1	Préparation d'échantillon et paramètres MS	64
4.4.3	<b>Résultats et discussion</b>	64
4.4.4	<b>Conclusion</b>	66
4.5	<b>Matrices Carbone graphite</b>	66
4.5.1	<b>Introduction</b>	66
4.5.2	<b>Matériel et méthodes</b>	66
4.5.2.1	Préparation d'échantillon et paramètres MS	66
4.5.3	<b>Résultats et discussion</b>	67
4.5.4	<b>Conclusion</b>	67
4.6	<b>Matrices ioniques liquides</b>	68
4.6.1	<b>Introduction</b>	68
4.6.1.1	Généralités	68
4.6.1.2	Description des points évalués	69
4.6.2	<b>Evaluation de dix matrices ioniques liquides</b>	70
4.6.2.1	Préparation d'échantillon	70
4.6.2.2	Résultats et discussion	70
4.6.3	<b>Adduits de cation</b>	75
4.6.3.1	Préparation d'échantillon	75
4.6.3.2	Résultats et discussion	75
4.6.4	<b>MS/MS en matrices ioniques liquides</b>	77
4.6.4.1	Préparation d'échantillon	77
4.6.4.2	Résultats et discussion	77
5.	<b>MATRICES RÉDUCTRICES</b>	80
5.1	<b>Introduction</b>	80
5.2	<b>Préparation d'échantillon</b>	80
5.3	<b>Résultats et discussion</b>	81
5.3.1	<b>Fragmentation ISD</b>	81
5.3.2	<b>Vérification du pouvoir réducteur de 1,5-DAN</b>	83
5.3.2.1	Hypothèse	83
5.3.2.2	Analyse de peptides synthétiques par MALDI-MS dans 1,5-DAN et 2,5-DHB	84
5.3.2.3	Analyse de peptides synthétiques par MALDI-MS/MS dans 1,5-DAN et 2,5-DHB	85
6.	<b>CONCLUSIONS</b>	89

**CHAPITRE II : OPTIMISATION DE LA SÉPARATION HPLC DE  
CYANOTOXINES ..... 92**

*Liste des figures ..... 93*

*Liste des tableaux ..... 93*

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>95</b>
<b>2. OPTIMISATION DE LA SÉPARATION HPLC .....</b>	<b>97</b>
<b>2.1 Matériel et méthodes.....</b>	<b>97</b>
<b>2.1.1 Chemicals.....</b>	<b>97</b>
<b>2.1.2 Préparation d'échantillon .....</b>	<b>97</b>
<b>2.1.3 Paramètres HPLC et MS (/MS) .....</b>	<b>97</b>
<b>2.2 Résultats et discussion.....</b>	<b>98</b>
<b>2.2.1 Evaluation des colonnes monolithiques et C18.....</b>	<b>98</b>
<b>2.2.2 Evaluation d'une colonne HILIC .....</b>	<b>104</b>
<b>2.2.3 Choix de la colonne HPLC.....</b>	<b>107</b>
<b>2.2.4 Optimisation du débit du gradient d'élution .....</b>	<b>109</b>

**CHAPITRE III : APPLICATION ENVIRONNEMENTALE..... 115**

*Liste des figures ..... 116*

*Liste des tableaux ..... 117*

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>118</b>
<b>2. ETUDE ENVIRONNEMENTALE .....</b>	<b>118</b>
<b>2.1 Objectifs de l'étude.....</b>	<b>118</b>
<b>3. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>119</b>
<b>3.1 Chemicals .....</b>	<b>119</b>
<b>3.2 Préparation d'échantillon .....</b>	<b>120</b>
<b>3.2.1 Extraction .....</b>	<b>120</b>
<b>3.2.2 Purification .....</b>	<b>120</b>
<b>3.3 Paramètres HPLC et robot .....</b>	<b>122</b>
<b>3.4 Paramètres MS (et MS/MS) .....</b>	<b>123</b>
<b>4. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>124</b>
<b>4.1 Nettoyage et préparation des échantillons     environnementaux .....</b>	<b>124</b>
<b>4.1.1 Extraction .....</b>	<b>124</b>
<b>4.2 Screening par MALDI-TOF .....</b>	<b>124</b>
<b>4.2.1 Purification via Zip-tip .....</b>	<b>127</b>
<b>4.3 Analyse par HPLC-MS et MS/MS.....</b>	<b>128</b>
<b>4.3.1 Caractérisation des microcystines par HPLC-MS(/MS) .....</b>	<b>135</b>
<b>4.4 Identification de microcystines environnementales .....</b>	<b>139</b>
<b>4.4.1 Préambule et stratégie analytique .....</b>	<b>139</b>
<b>4.4.2 Identification des microcystines MC-LR et apparentées ....</b>	<b>141</b>
4.4.2.1 Composés de masse MW:966.52.....	141
4.4.2.1.1 Identification M <sub>966a</sub> .....	143
4.4.2.1.2 Identification M <sub>966e</sub> et M <sub>966f</sub> .....	149

4.4.2.1.3	Profil de fragmentation de M <sub>966b</sub> , M <sub>966c</sub> et M <sub>966d</sub> .....	150
4.4.2.2	Composés de masse MW:980.53 et 994.55.....	150
4.4.2.2.1	Identification M <sub>980</sub> et M <sub>994</sub> .....	152
4.4.2.3	Comparaison de profils de fragmentation ESI-HCD-MS/MS et MALDI-CID-MS/MS.....	157
<b>4.4.3</b>	<b>Identification des microcystines MC-RR et apparentées ...</b>	<b>165</b>
4.4.3.1	Identification M <sub>1009</sub> et M <sub>1023</sub> .....	165
4.4.3.2	Caractérisation de M <sub>1037</sub> , M <sub>1039</sub> et M <sub>1041</sub> .....	170
<b>4.4.4</b>	<b>Identification des microcystines MC-YR et apparentées ...</b>	<b>172</b>
4.4.4.1	Identification de M <sub>1016</sub> et M <sub>1030</sub> et M <sub>1044</sub> .....	172
<b>4.4.5</b>	<b>Identification des microcystines MC-XR et apparentées ...</b>	<b>176</b>
4.4.5.1	Identification de M <sub>1014(1)</sub> et M <sub>1014(2)</sub> .....	176
4.4.5.2	Identification M <sub>1053</sub> .....	178
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>185</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>190</b>	
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>194</b>	
<b>ANNEXES .....</b>	<b>214</b>	
<i>Liste des figures .....</i>	<i>215</i>	
<b>1.</b>	<b>ANNEXE I : BIOLOGIE DES CYANOBACTÉRIES .....</b>	<b>217</b>
<b>1.1</b>	<b>Origine et propriétés biochimiques et photochimiques .....</b>	<b>217</b>
<b>2.</b>	<b>ANNEXE II : MÉTHODES D'ANALYSE DE CYANOTOXINES .....</b>	<b>222</b>
<b>2.1</b>	<b>Méthodes biologiques et biochimiques.....</b>	<b>222</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Mouse bioassay.....</b>	<b>222</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Protein phosphatase inhibition assay (PPIA) .....</b>	<b>222</b>
<b>2.1.3</b>	<b>ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay .....</b>	<b>223</b>
<b>2.2</b>	<b>Méthodes physico-chimiques.....</b>	<b>226</b>
<b>2.2.1</b>	<b>HPLC .....</b>	<b>226</b>
2.2.1.1	Chromatographie liquide de partage et HPLC .....	226
2.2.1.2	Gradient d'élution.....	227
2.2.1.3	Détecteur HPLC-DAD .....	227
<b>2.2.2</b>	<b>Spectrométrie de masse .....</b>	<b>229</b>
2.2.2.1	Sources d'ionisation : Electrospray.....	229
2.2.2.1.1	Mécanisme de l'électrospray.....	229
2.2.2.1.2	La source Z-Spray.....	232
2.2.2.1.3	Source nanospray .....	233
2.2.2.2	Sources d'ionisation : MALDI.....	234
2.2.2.2.1	Mécanisme MALDI : Modèle « Two step framework » ...	234
2.2.2.2.1.1	Ionisation primaire.....	235
2.2.2.2.1.2	Ionisation secondaire.....	235
2.2.2.2.2	Mécanisme MALDI : Modèle du Lucky survivor .....	236
2.2.2.2.3	Préparation du dépôt MALDI.....	237
2.2.2.2.3.1	Goutte séchée (Dried Droplet - DD).....	237
2.2.2.2.3.2	Couche mince (Thin layer - TL).....	237
2.2.2.3	Spectromètres de masse .....	237

2.2.2.3.1	Analyseur à temps de vol .....	237
2.2.2.3.2	Analyseur à transformée de Fourier .....	240
2.2.2.3.2.1	<i>Principe de la FT-ICR</i> .....	240
2.2.2.3.2.2	<i>Piégeage des ions</i> .....	241
2.2.2.3.2.3	<i>Excitation des ions</i> .....	242
2.2.2.3.2.4	<i>Détection des ions</i> .....	243
2.2.2.3.2.5	<i>La cellule ICR</i> .....	244
2.2.2.3.3	Analyseur Orbitrap .....	246
2.2.2.3.3.1	<i>Injection des ions</i> .....	246
2.2.2.3.3.2	<i>Piégeage des ions</i> .....	246
2.2.2.3.3.3	<i>Détection des ions</i> .....	247
2.2.2.3.3.4	<i>Hybridation : Quadripôle-Orbitrap</i> .....	248
2.2.2.3.4	Détecteurs.....	248
<b>2.2.3</b>	<b>Spectrométrie de masse en tandem .....</b>	<b>250</b>
2.2.3.1	Nomenclature de la fragmentation peptidique.....	250
2.2.3.2	Méthodes d'activation collisionnelle .....	250
2.2.3.2.1	Fragmentation dans le FT-ICR par Sustained Off Resonance Irradiation – Collision Activated Dissociation (SORI-CAD) .....	252
2.2.3.2.2	Fragmentation dans l'Orbitrap par Collision Induced Dissociation.....	253
2.2.3.2.3	Fragmentation dans le TOF par Post Source Decay (PSD) et PSD-CID.....	254
2.2.3.2.3.1	<i>Principe de la décroissance PSD</i> .....	254
2.2.3.2.3.2	<i>Matrices favorisant le PSD</i> .....	257
2.2.3.3	Méthodes d'activation alternatives .....	257
2.2.3.3.1	Activation photochimique.....	258
2.2.3.3.2	Activation radicalaire .....	259
2.2.3.3.2.1	<i>ECD, ETD et EDD</i> .....	259
2.2.3.3.2.2	<i>ISD</i> .....	260
<b>3.</b>	<b>ANNEXE III : TABLEAU DES FRAGMENTS .....</b>	<b>265</b>

**INTRODUCTION : PROBLÉMATIQUE DES  
CYANOBACTÉRIES ET LEURS CYANOTOXINES**



## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Efflorescence de cyanobactéries dans une zone récréative entraînant un risque d'intoxication <sup>(10)</sup> .....	6
Figure 2 : Bloom toxique dans le lac d'Erie en novembre 2015.....	7
Figure 3 : Schéma de la structure générale d'une microcystine <sup>(55)</sup> .....	12
Figure 4 : Structure des acides aminés déhydroalanine Dha (a) et acide déhydrobutyrique Dhb (b) .....	13
Figure 5 : Spectre de masse de fragmentation de la 1-phényl-2-propanone dont la masse molaire moyenne = 134,18 g/mol.....	21
Figure 6 : Représentation schématique de la source MALDI (adapté de la référence <sup>86)</sup> .....	25
Figure 7 : Schéma du spectromètre de masse Ultraflex II (Bruker Daltonics) <sup>92</sup> .....	28
Figure 8 : Schéma de l'Orbitrap constitué de l'électrode fuseau (a), l'électrode externe (b) et le petit intervalle (c) ( <sup>98</sup> ) .....	30
Figure 9 : Schéma et géométrie de l'Orbitrap Q Exactive (Thermo Fischer).....	31
Figure 10 : Schéma du principe général de la spectrométrie de masse en tandem <sup>(101)</sup> .....	32

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Liste des familles de cyanotoxines, structure, toxicité, mode d'action et genre des cyanobactéries productrices .....	14
---	----



# 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

On appelle toxine toute substance, synthétisée par un organisme vivant et pouvant être pathogène pour un ou plusieurs types d'organismes. Les toxines peuvent être produites par des bactéries, des champignons ou des organismes élaborés tels les araignées, serpents et cônes marins. Le point commun entre toutes ces substances actives est qu'elles peuvent provoquer une réaction, généralement nocive, à l'organisme exposé. Elles peuvent être très spécifiques ou présenter un mode d'action très large.

Les toxines les plus connues du grand public sont les toxines produites par les bactéries, dont l'exemple le plus célèbre est la toxine botulique. Cette toxine a été découverte au 19<sup>ème</sup> siècle, dans le sud de l'Allemagne suite à un nombre important d'intoxications alimentaires résultant de l'ingestion de charcuteries artisanales, dont le boudin noir. La pathologie provoquée est dénommée « botulisme », du latin « botulinus » (boyau). La bactérie responsable de cette pathologie fut identifiée quelques années plus tard comme étant *Clostridium botulinum*.

Après avoir fait l'objet de recherches pour son utilisation en tant qu'arme biologique, son intérêt médical a été développé et exploité à des fins thérapeutiques mais surtout esthétiques, via son appellation mieux connue de « Botox ». En effet, la toxine botulique est une protéine qui provoque un relâchement temporaire du tissu traité – d'où son efficacité dans le traitement des rides notamment<sup>1</sup>.

Autrefois appelées « algues bleu-vert », les cyanobactéries sont des procaryotes capables de réaliser la photosynthèse et qui produisent une grande variété de toxines puissantes<sup>2</sup>. Si leur présence est naturelle dans les étendues d'eau telles les lacs ou rivières, leur développement anormalement important dans certaines conditions (températures élevées, stratification thermique prolongée, ensoleillement)<sup>3,4</sup> est problématique. En effet, lors de la lyse des cellules, une concentration très importante de toxines peut apparaître rapidement dans les eaux, avec des effets potentiellement fulgurants comme les effets paralysants provoqués une toxine produite par *Anabaena* (saxitoxine) par exemple<sup>5,6</sup>.

Afin de prévenir et réduire les risques de pollution des eaux de baignade d'une part, et d'informer la population au sujet du degré de pollution de leurs eaux récréatives d'autre part, une directive européenne est d'application depuis 2006. En Région wallonne, les concentrations en cyanobactéries de plus de 30 zones officielles de baignade, sont, depuis lors, contrôlées à une fréquence au minimum bimensuelle, entre juin et septembre.

Les méthodes en place sont basées sur la recherche de cyanobactéries par observation au microscope et/ou la détection immunologique des cyanotoxines, particulièrement les microcystines (MC) par la technique Enzyme-Linked Immuno Assay (ELISA)<sup>7,8</sup>. Ces méthodes ne ciblent en général, qu'une cyanotoxine particulière, à savoir la microcystine LR. Cependant, à ce jour, plus de 200 variants de la microcystine et d'autres cyanotoxines, de toxicité variable, ont été recensés.

Afin de prévenir au maximum les risques sanitaires, il devient primordial d'inclure la recherche de toutes ces molécules dans le monitoring des eaux de baignade.

C'est dans ce contexte que se situe ce travail de thèse, dont l'objectif était de mettre au point de nouvelles approches pour l'analyse et l'*identification* de cyanotoxines par spectrométrie de masse (MS) couplée à une séparation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), et plus particulièrement le couplage HPLC-MALDI-MS/MS.



## 2. TOXINES ENVIRONNEMENTALES

### 2.1 Problématique des cyanobactéries

#### 2.1.1 Contexte

Depuis quelques années, il devient de plus en plus fréquent, de voir certains lacs et étendues d'eau, fermer ponctuellement au cours de la saison d'été. Par exemple, à l'été 2010, le Vif relatait la fermeture des étangs d'Ixelles en raison de la présence de toxines potentiellement très dangereuses<sup>9</sup>.



*Figure 1 : Efflorescence de cyanobactéries dans une zone récréative entraînant un risque d'intoxication (10)*

En Belgique, certaines zones touristiques, comme les lacs de l'Eau d'Heure, ont également, fréquemment, été sujets à des proliférations de cyanobactéries potentiellement toxiques, obligeant les autorités à interdire l'accès aux lacs pour protéger la population des risques. Ainsi, les symptômes d'une exposition à ces toxines peuvent être une irritation cutanée simple ou majeure, des symptômes de type gastro entérite pouvant dégénérer en atteinte hépatique, des céphalées ou des symptômes de paralysie musculaire pouvant, s'ils atteignent les muscles respiratoires, provoquer le décès de la victime<sup>5</sup>.

Cette problématique n'est pas limitée à la Belgique puisque des cas de mortalité d'oiseaux, de chiens, et d'empoisonnement humains ont été décrits à proximité de zones contaminées, en Australie et au Royaume Uni notamment. A l'été 2015, un épisode toxique de grande ampleur a été rapporté dans le lac Erie situé entre le Canada et l'Ohio. La surface concernée est la plus grande jamais recensée, à savoir la taille de la ville de New York! La vue satellite de ce lac (Figure 2) illustre l'ampleur de la contamination<sup>11</sup>.

Enfin, un cas dramatique d'empoisonnement mortel est à déplorer à Caruaru, une ville de l'est du Brésil. Après un épisode de sécheresse, en février 1996, 120 patients d'une unité de dialyse ont été intoxiqués suite à l'utilisation

d'une eau chargée en toxines. Plus de 50 d'entre eux ont perdu la vie suite à cette intoxication<sup>4,10,12-14</sup>.

Les responsables de ces épisodes toxiques sont les cyanobactéries, procaryotes photosynthétiques ancestraux qui, au même titre que les plantes, exploitent l'énergie solaire pour vivre. Dans certaines conditions d'ensoleillement, de richesse en nutriments, de température et stabilité de la colonne d'eau, les cyanobactéries peuvent se développer de manière extrêmement importante, donnant lieu à un phénomène appelé une efflorescence ou bloom. La fréquence de ces épisodes tend à augmenter, en raison notamment, du réchauffement climatique de la planète<sup>3,4</sup>.

Les aspects biologiques, biochimiques et biophysiques des cyanobactéries sont développés en Annexe I de ce manuscrit.



Figure 2 : Bloom toxique dans le lac d'Erie en novembre 2015

### 2.1.1.1 Diversité, développement et croissance

#### 2.1.1.1.1 Diversité

Les cyanobactéries contribuent, par leur activité photosynthétique dans les sols, les eaux douces et les océans, à maintenir l'équilibre entre le gaz carbonique et l'oxygène. Elles sont parmi les organismes les plus prometteurs en matière de capture de CO<sub>2</sub> atmosphérique, d'autant plus important que l'activité humaine a, au cours des cinquante dernières années, augmenté de manière exponentielle la production de gaz à effet de serre<sup>15-18</sup>

Le rôle des cyanobactéries dans l'évolution est capital car elles seraient à l'origine du mécanisme de la photosynthèse ainsi que de l'enrichissement de l'atmosphère en oxygène après saturation des mers (Great Oxidation Event - GEO

2,15,19,20). Ce phénomène remonte, selon les études, à 2,4 milliards d'années. Jusqu'alors, les organismes photosynthétiques libéraient le dioxygène lors de la photosynthèse. Cet oxygène était rapidement consommé par les métaux présents dans l'environnement, tels le Fer ou le Nickel par exemple, pour former des oxydes qui précipitaient dans l'océan. Il y a 2.4 milliards d'années, la disponibilité des métaux a chuté, empêchant l'élimination de l'oxygène. Celui-ci s'est alors accumulé dans les océans jusqu'à saturation avant de se répandre au sein de l'atmosphère<sup>2,15,20</sup>.

Les études s'accordent par ailleurs désormais quant au fait que le chloroplaste présent au sein des végétaux serait issu de l'ingestion d'une cyanobactérie ancestrale par un ancêtre des eucaryotes. Ce phénomène est qualifié d'endosymbiose car l'hôte acquiert, grâce à la cyanobactérie, une fonction nouvelle lui étant bénéfique. Dans le cas des chloroplastes, la propriété transférée par la cyanobactérie est la capacité de capture du dioxyde de carbone de l'air et sa conversion, grâce à l'énergie lumineuse, en sucre avec production d'oxygène, c'est-à-dire la capacité d'être le siège de la photosynthèse<sup>15-17,21</sup>.

Les cyanobactéries vivent et se développent en présence d'eau, lumière, air et de nutriments, tant dans les océans et les mers, que dans les eaux douces voire dans les zones terrestres telles les rochers par exemple. Elles ont une capacité impressionnante de colonisation de substrats hostiles dans des conditions extrêmes : ainsi elles ont été retrouvées dans des roches volcaniques, des déserts de sable et même de pierres<sup>4,15</sup> !

Les cyanobactéries regroupent quelques 2.000 espèces réparties en 150 genres<sup>22</sup>. Une grande partie de leur diversité morphologique s'est développée il y a plus de 2 milliards d'années. En milieu aquatique, les cyanobactéries sont dites planctoniques ou pélagiques si elles prolifèrent en suspension dans la colonne d'eau, ou benthiques si elles sont attachées à un substrat<sup>23</sup>.

Outre l'aspect morphologique, une autre différenciation des cyanobactéries concerne la capacité de certains genres appartenant à l'ordre des Nostocales tels *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Gloetrichia*, *Nostoc* et *Nodularia* de fixer enzymatiquement l'azote atmosphérique dissout dans l'eau en l'absence d'autres sources d'azote, dans des cellules spécialisées nommées hétérocystes. Au sein de cet ordre, elles produisent aussi des cellules différenciées nommées akinètes (spores), qui leur permettent de survivre dans des conditions très dures comme par grand froid ou en période de sécheresse<sup>12,23</sup>.

Dans ce travail, nous nous intéressons plus particulièrement aux cyanobactéries se développant en eaux douces.

#### 2.1.1.1.2 Développement et croissance

Lorsque des conditions hydrodynamiques particulières sont rencontrées (stabilité de la colonne d'eau, milieux riches en nutriments), certaines espèces phytoplanctoniques toxiques, dont les cyanobactéries, peuvent se développer de façon inhabituelle. Ces efflorescences particulières, appelées « blooms », perturbent le fonctionnement des écosystèmes, interfèrent avec les activités humaines (pêche,

aquaculture, tourisme, activités récréatives) et menacent sérieusement la santé publique si de l'eau ou des produits chargés en toxines d'origine phytoplanctonique sont consommés.

En quelques jours, un épisode de bloom peut transformer une eau claire en une eau écumeuse, trouble et bleue, verte, brune ou rouge. Par ailleurs, on associe fréquemment une modification organoleptique de l'eau où a lieu le bloom, avec un dégagement d'odeurs pouvant être très fortes. Outre l'aspect repoussant que les blooms peuvent provoquer dans les étendues d'eau où ils ont lieu, le véritable problème est constitué par la présence de toxines, produites par les cyanobactéries. Celles-ci sont en effet libérées dans l'eau lors de la lyse des cellules<sup>24,25</sup> et leur toxicité, pouvant être très élevée, constitue une véritable menace pour la santé publique, d'autant que ces toxines peuvent perdurer longtemps après la disparition du bloom<sup>3,26,27</sup>.

Dans les eaux douces, les cyanobactéries peuvent se multiplier dans les eaux stagnantes, les eaux usées mais aussi dans les réservoirs d'eau potable. L'accumulation de cyanobactéries planctoniques est facilitée par la présence de vésicules gazeuses qui leur permettent de se positionner dans la colonne d'eau<sup>4,15,28</sup>. Les principales voies d'exposition de la population aux cyanotoxines sont le contact cutané (baignade) et l'ingestion d'eau. Selon les concentrations en toxines présentes dans l'eau, la durée et la fréquence des expositions, les risques sanitaires se caractérisent par des irritations cutanées, des troubles gastro-intestinaux ou des empoisonnements létaux<sup>29,30</sup>.

Afin de contrôler et prévoir les épisodes de blooms, les conditions de développement des cyanobactéries font l'objet de nombreuses études. Ainsi, il a été observé que la prolifération des cyanobactéries est favorisée lorsque le ratio azote/phosphore est faible (inférieur à 20 :1 en masse)<sup>15,31,32</sup>, et lorsque le pH est élevé, à savoir de l'ordre de 7.5-9 (faible accessibilité au CO<sub>2</sub>)<sup>33-35</sup>. La température élevée (25-35°C) influence également le développement massif de cyanobactéries<sup>35</sup>, de même que l'absence de prédateurs : en effet, le zooplancton digérant mal les phytoplanctons, celui-ci peut se développer d'autant plus rapidement. Enfin, la luminosité joue également un rôle très important. Ainsi, un plan d'eau eutrophisé, ensoleillé, chaud et calme est un milieu idéal pour la prolifération des cyanobactéries<sup>28</sup>.

Si les conditions de prolifération des cyanobactéries sont de mieux en mieux comprises, il n'en n'est pas de même pour la production des toxines de cyanobactéries. En effet, toutes les cyanobactéries ne produisent pas de toxines et deux cyanobactéries de morphologies identiques ne produisent pas nécessairement la même toxine au même moment. Une même toxine peut être produite par des espèces différentes et une même espèce peut produire différentes toxines<sup>10,23,36,37</sup>. En outre, la problématique des cyanotoxines est assez méconnue du grand public, par opposition avec les problèmes de modification organoleptique des eaux (odeur, goût et aspect), qui sont, elles, parfaitement tangibles. En l'absence de cyanobactéries, les cyanotoxines n'ont en effet ni couleur, ni goût ou odeur caractéristique. Elles sont pourtant extrêmement toxiques, à tel point que certaines d'entre elles font partie de la liste des armes (bio)chimiques<sup>38</sup>.

Actuellement, les cyanobactéries sont l'objet de nombreux intérêts bioindustriels et elles sont même considérées comme le groupe de microorganismes photosynthétiques le plus prometteur pour la production à l'échelle industrielle d'un grand nombre de produits naturels. Ainsi, elles sont à la source de biocarburants<sup>18,39</sup> et sont surtout un réservoir immense de composés biologiquement actifs pouvant être utilisés en agriculture et dans la recherche biomédicale et pharmaceutique<sup>33,40,41</sup>.

En agriculture, les cyanobactéries sont surtout utilisées en tant qu'engrais biologique, c'est-à-dire toute substance contenant des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont appliqués dans les cultures (semences, terres, ...) boostent la croissance de ces dernières en augmentant l'accessibilité de nutriments primaires tels que l'azote ou le phosphore. Typiquement, cette application exploite la capacité de fixation d'azote très importante des cyanobactéries – en moyenne 30 kg d'azote par hectare et par an. L'intérêt de cette utilisation en tant qu'engrais biologique est naturellement de réduire l'utilisation d'engrais chimiques. Cette propriété des cyanobactéries est principalement exploitée dans les rizières<sup>15,42-44</sup>.

Plus anecdotique, les cyanobactéries auraient également de multiples propriétés thermales et elles sont le constituant principal des boues de Dax, utilisées en cures thermales dans de nombreux centres sur le territoire français notamment<sup>45</sup>.

Enfin, la recherche biomédicale et pharmaceutique considère les cyanobactéries, et plus exactement, leurs métabolites, comme un réservoir potentiel de substances actives au niveau médical<sup>46</sup>. En effet, les cyanobactéries sont connues depuis longtemps pour leur capacité de production de métabolites dont certains seraient un moyen de protection contre d'autres organismes prédateurs ou compétiteurs. Ainsi, ces composés ont montré de nombreuses activités biologiques incluant des propriétés d'antidépresseur, anti cancer, antivirales, antibactériennes, antimycotiques et antiparasites notamment<sup>41,46</sup>. Par ailleurs, les cyanobactéries sont également évaluées pour leur potentiel de production de composés photoprotecteurs - en vue d'application en tant que protection solaire et antioxydant notamment. Cette possible application a été notamment étudiée par le groupe de Rastogi *et al*, lequel a publié récemment les résultats de ses recherches sur un pigment produit par la cyanobactérie, la scytonémine, dont le rôle dans la réduction des dommages cellulaires causés par les radiations ultra-violettes (UV) a été démontré<sup>40</sup>.

Enfin, une protéine de la cyanobactérie *Oscillatoria agardhii*, une agglutinine de la famille des lectines, a été étudiée et les résultats montrent une activité biologique anti-VIH réelle (par inactivation de la réplication et de la transmission du HIV) et donc un potentiel très important dans le cadre de la recherche contre le SIDA<sup>47</sup>.

Cette liste d'exemples, non exhaustive, de l'intérêt croissant pour les cyanobactéries souligne l'importance de poursuivre les recherches dans ce domaine.

## **2.1.2 Cyanotoxines : Structure, mode d'action et toxicité**

### *2.1.2.1 Structures et modes d'action*

Les cyanotoxines sont des substances produites par les cyanobactéries auxquelles elles confèrent leur pouvoir pathogène.

Les effets des cyanotoxines répertoriés sur le genre humain sont très divers : gastro-entérites, nausées, vomissements, fièvres, état grippal, toux, bouche sèche, irritation des yeux et oreilles, douleurs abdominales, rashes, dommages rénaux et au niveau du foie pour ne citer qu'une partie des symptômes recensés. Notons également que certaines cyanotoxines, en exposition chronique, seraient responsables d'une augmentation des cancers, du foie principalement<sup>29</sup>.

Les cyanobactéries peuvent produire une grande variété de toxines, lesquelles sont généralement classées soit selon leur mode d'action, soit selon leur structure chimique. Ainsi, d'un point de vue fonctionnel, les cyanotoxines sont classifiées en trois groupes, à savoir:

- Les hépatotoxines, parmi lesquelles les microcystines, les nodularines et la cylindrospermopsine. Elles portent atteinte au foie et en fonction du type d'exposition (chronique ou aiguë), elles peuvent provoquer la mort en quelques heures par hémorragie hépatique. La toxicité résulte de la capacité de ces cyanotoxines de pénétrer au sein des hépatocytes où elles causent ensuite une hyperphosphorylation des protéines, une réorganisation irréversible des microfilaments cellulaires et une destruction des cellules hépatiques<sup>48-50</sup>. Ce sont les cyanotoxines les plus étudiées et les plus représentées, et à ce jour, plus de 200 variants ont été décrits (248 variants en 2017<sup>51</sup>). La plus connue est la microcystine LR.
- Les neurotoxines parmi lesquelles la saxitoxine, la néosaxitoxine, l'anatoxine-a et l'anatoxine-a(s). La cible de ce groupe de toxines est le système neuromusculaire. Les saxitoxines inhibent l'influx nerveux en bloquant les canaux sodium des cellules. Elle peuvent provoquer une paralysie des muscles squelettiques et respiratoires pouvant conduire à la mort par arrêt respiratoire en quelques minutes <sup>22,38</sup> ;
- Les toxines irritantes (dermatotoxines, lipopolysaccharides) qui provoquent irritations, eczéma, gastro-entérites etc. Ces toxines sont moins répandues en Belgique et alentours immédiats car les bactéries productrices de toxines irritantes se développent exclusivement dans des eaux marines salées<sup>52</sup> ;

Par ailleurs, les cyanotoxines peuvent également être différenciées sur base de leur structure chimique à savoir les peptides cycliques (microcystines et nodularines), les alcaloïdes (anatoxines, cylindrospermopsine, saxitoxines, aplysiatoxine...) et les lipopolysaccharides (LPS)<sup>4</sup>.

En Belgique, les toxines les plus répandues sont les hépatotoxines, majoritairement représentées par les microcystines. Une grande part de la littérature relative aux cyanotoxines se focalise sur les microcystines, en raison du nombre important de variants rapportés (248<sup>51,53</sup>) ainsi que du fait qu'il s'agit des toxines les plus fréquemment rencontrées dans les blooms.

Au niveau moléculaire, les microcystines sont un groupe d'heptapeptides cycliques non-ribosomiaux dont la séquence est constituée d'un mélange d'acides aminés classiques et atypiques, ayant subi des modifications post-traductionnelles<sup>54</sup>.

Ainsi, la structure générale des microcystines, illustrée sur la Figure 3 est la suivante : cyclo(-D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-MDha), où MeAsp est l'acide D-érythro-b-méthylaspartique, MDha est la N-méthyl-déhydroalanine, Adda est l'acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque et X et Z sont des acides aminés variables aux positions 2 et 4 du cycle. Ces deux acides aminés variables sont spécifiés dans le nom de la microcystine (microcystine XZ). Ainsi, par exemple, une microcystine contenant une leucine (L) en position 2 et une arginine (R) en position 4 sera dénommée microcystine-LR.

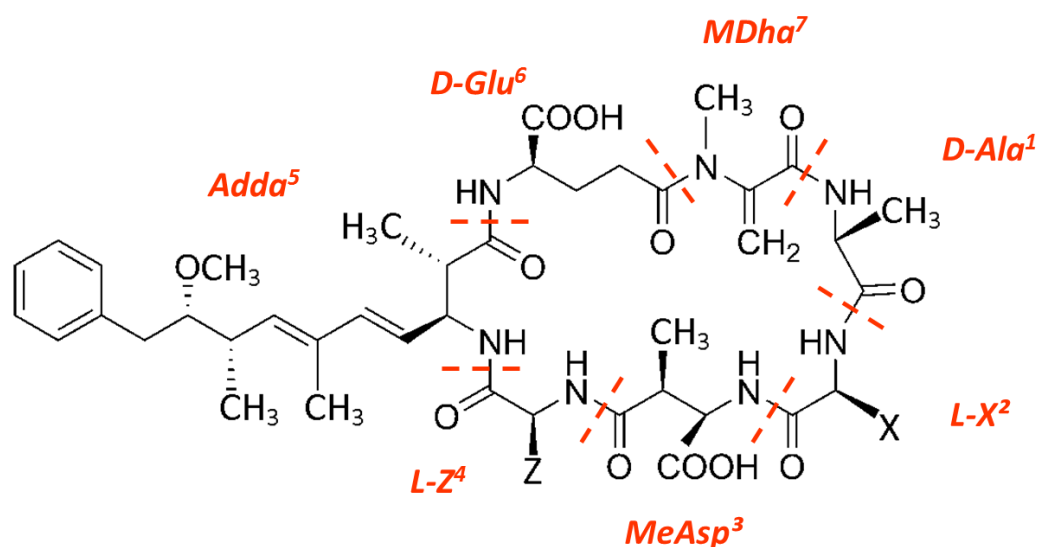


Figure 3 : Schéma de la structure générale d'une microcystine (55)

Ces modifications structurales sont d'une importance cruciale car le métabolisme *in vivo* des différentes microcystines semble intimement lié aux variations de structures de certains acides aminés du cycle heptapeptidique. Ainsi, la toxicité au sein des microcystines peut varier de manière très importante, en fonction de différences structurales pouvant être très mineures<sup>56-61</sup>.

Le métabolisme *in vivo* des cyanotoxines, et à fortiori des microcystines, semble donc être fortement dépendant de variations mineures au niveau structurel. Ainsi de nombreuses études ont par exemple montré que le remplacement de l'acide aminé MDha (Méthyldéhydroalanine) par le groupement MDhb (Acide Méthyldéhydroaminobutyrique) en position 7 de la structure générale d'une microcystine, conduisait à d'importantes variations au niveau mécanisme métabolique<sup>56-61</sup> (voir Figure 4).

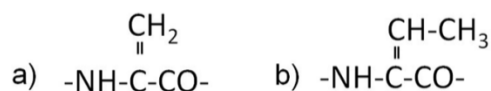


Figure 4 : Structure des acides aminés déhydroalanine Dha (a) et acide déhydrobutyrique Dhb (b)

Outre l'aspect purement biologique, ces variations de comportement peuvent avoir d'importantes conséquences, notamment lorsqu'il est question de screening lors d'épisodes de blooms et de quantification. Ainsi, Hoeger *et al.* ont montré que le test d'inhibition de l'enzyme phosphatase conduisait à une sous-estimation de la concentration de microcystines lorsque celles-ci contenaient le groupement Dhb en position 7 du cycle heptaptidique<sup>61</sup>. Une conséquence inévitable de cette observation serait que les tests classiques risquent de mener à une sous-estimation de la toxicité d'un phénomène toxique ainsi qu'une minimisation, à tort, du risque.

### 2.1.2.2 Toxicité

Le monitoring des cas d'intoxications par les cyanotoxines est particulièrement important dans le cadre de l'établissement de la classification de la toxicité des cyanotoxines. L'exposition aux cyanotoxines peut toutefois rarement être quantifiée avec précision et difficilement extrapolée à des populations humaines. Les tests de toxicité, pratiqués sur des animaux de tailles différentes ont toutefois permis l'obtention d'informations importantes relatives à la toxicité de nombreuses cyanotoxines, et ont fourni un outil comparatif indispensable pour l'étude des différentes cyanotoxines<sup>4</sup>.

Avant toute étude comparative, le degré de toxicité doit être déterminé. Ainsi, deux degrés de toxicité différents sont définis, à savoir la toxicité aiguë et la toxicité chronique<sup>62</sup>.

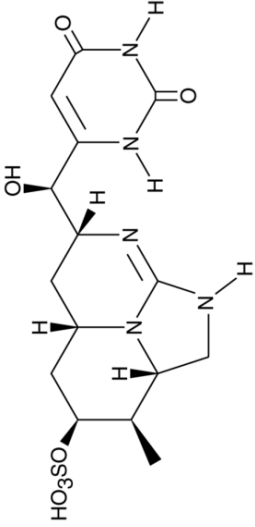
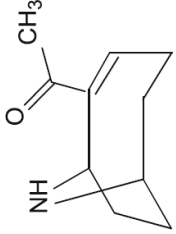
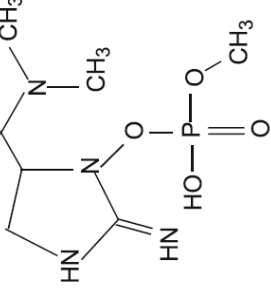
La toxicité létale ou aiguë est la mesure de la capacité d'un composé à engendrer la mort de l'organisme soumis à une exposition brève. Parallèlement, on définit la dose létale DL50 comme étant la quantité de substance par kilogramme d'individu qui provoque la mort de cinquante pour-cent de la population exposée.

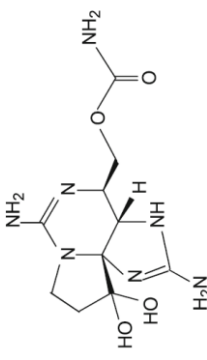
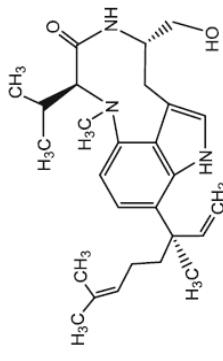
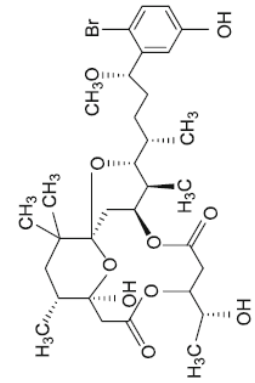
La toxicité sublétale ou chronique est la mesure de la capacité d'une toxine à altérer les performances d'organismes soumis à une exposition longue, voire continue, sans pour autant entraîner leur mort.

Le Tableau 1 présente, de manière non-exhaustive, les principaux groupes de cyanotoxines, leur mode d'action, leur structure chimique ainsi que leurs sources et leur dose létale - par absorption orale - DL50<sup>10,29,33,36</sup>.

Tableau 1 : Liste des familles de cyanotoxines, structure, toxicité, mode d'action et genre des cyanobactéries productrices

Toxines	Structure	Nombre de variants structuraux	DL50 (i.p. souris - µg/kg)	Mode d'action	Genre
<b>Hepatotoxines</b>					
<b>Microcystines</b>	<p>Heptapeptides cycliques</p>	248	<p>45-1000</p> <p>MC-LR : 25-125</p> <p>MC-YR : 70</p> <p>MC-RR : 300-600</p>	<p>Inhibition de la protéine phosphatase, destruction de la membrane et de sa conductance, promoteur de tumeurs</p>	<p><i>Microcystis</i>, <i>Anabaena</i>, <i>Aphanocapsa</i>, <i>Fischerella</i>, <i>Cylindrospermopsis</i>, <i>Rivularia</i>, <i>Synechococcus</i>, <i>Phormidium Nostoc</i>, <i>Anabaenopsis</i>, <i>Planktothrix</i>, <i>Oscillatoria</i>, <i>Hapalosiphon</i></p>
<b>Nodularines</b>	<p>Pentapeptides cycliques</p>	10	30-50	<p>Inhibition de la protéine phosphatase, destruction de la membrane et de sa conductance, promoteur de tumeurs</p>	<p><i>Nodularia</i>, <i>Theonella</i></p>

Toxines	Structure	Nombre de variants structuraux	DL50 (i.p. souris - µg/kg)	Mode d'action	Genre
<b>Hepatotoxines</b>					
Cylindrospermopsine	Alcaloïde 	3	2100 (1 jour) 200 en 5-6 jours	Inhibition irréversible de la synthèse protéique provoquant la mort cellulaire. Toxicité fœtale, initiation tumorale.	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Umekakia</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Raphidiopsis</i>
<b>Neurotoxines</b>					
Anatoxines-a	Alcaloïde 	5	250	Stimulation des récepteurs de l'acétylcholine. Mort par arrêt respiratoire suite à une surstimulation et paralysie des muscles (dont respiratoires)	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i>
Anatoxine-a (s)	Organophosphate 	1	40	Inhibition de l'acétylcholinestérase. Mort par arrêt respiratoire suite à une surstimulation et paralysie des muscles (dont respiratoires)	<i>Anabaena</i>

Toxines	Structure	Nombre de variants structuraux	DL50 (i.p. souris - µg/kg)	Mode d'action	Genre
<b>Neurotoxines</b>					
Saxitoxines	Alcaloïde 	20	10-30	Blocage des canaux sodium. Paralyse et mort par arrêt respiratoire en cas d'intoxication aigue.	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Planktothrix</i>
<b>Toxines irritantes (endotoxines, dermatotoxines,...)</b>					
Lyngbyatoxines-a	Alcaloïde 	1	NA	Activation de la protéine kinase C, agent inflammatoire	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Oscillatoria</i>
Aplysiatoxines	Alcaloïdes 	2	NA	Activation de la protéine kinase C, agent inflammatoire	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Oscillatoria</i>
Lipopolysaccharides	Lipopolysaccharides	NA	NA	Agents inflammatoires, irritants gastro-intestinaux	Toutes les cyanobactéries

### **2.1.3 Situation à l'échelle mondiale**

Les intoxications animales par les cyanotoxines sont connues depuis 1882 aux États-Unis mais c'est seulement en 1978, en Australie, qu'elles ont été scientifiquement mises en relation avec des efflorescences de cyanobactéries toxiques. Les épisodes de mortalité ont concerné des animaux domestiques, en particulier du bétail<sup>63</sup>. De nombreux événements similaires ont, depuis, été décrits. Les conséquences de la présence des cyanobactéries sont à la fois économiques et sanitaires. Les cyanobactéries ont ainsi des répercussions sur la production et la distribution de l'eau de boisson et sur la qualité des eaux de baignade, et donc sur le tourisme.

Malgré les problèmes de plus en plus récurrents, aucun pays au monde n'a mis en place de dispositif de surveillance épidémiologique spécifique de ce type d'intoxication<sup>64</sup>. De plus en plus de pays adoptent toutefois des recommandations qui concernent la surveillance des ressources aquatiques destinées à produire des eaux potables, l'exploitation de ces ressources et la qualité des traitements appliqués à l'eau<sup>65-67</sup>.

A l'heure actuelle, deux limites ont été recommandées par les experts de l'OMS : le seuil de 20.000 cellules par millilitre d'eau et de 20 µg/L de microcystine LR pour les eaux récréatives et de baignade et une limite de 1 µg/L de microcystine LR dans l'eau potable. Ces seuils sont, depuis près de 20 ans, la seule valeur de référence pour les cyanotoxines<sup>65,68,69</sup>. Entre le début de ce travail et la fin, aucune avancée majeure concernant la législation n'a été observée.

### **2.1.4 Situation en Belgique**

La Belgique n'échappe pas aux problèmes des blooms de cyanobactéries. Les zones d'apparitions étant principalement des zones de baignade, le risque de mortalité par ingestion pour l'être humain en bonne santé est faible. Cependant ce risque existe pour les oiseaux et les chiens par exemple.

Plus récemment, des épisodes de blooms toxiques ont été signalés à Bruxelles, très tôt dans la saison, en raison d'un printemps 2011 particulièrement chaud<sup>70</sup>. Ce phénomène a soulevé un double problème à savoir :

- L'absence de monitoring en dehors des périodes « estivales » ;
- La sous-estimation des dangers liés à ces blooms : en effet, les échantillons analysés contenaient la microcystine en concentration très importante, à savoir plus de 70 fois la limite suggérée par l'OMS pour les eaux de baignade (20 µg/L) ; le danger dans ce cas est principalement l'intoxication par contact cutané lors de l'utilisation des fontaines dans les étangs.

Si les phénomènes de blooms existent depuis toujours, en Belgique les premiers cas de détection de cyanotoxines ont été rapportés en 1994 par l'équipe de Van Hoof<sup>71</sup>. Aucune identification n'avait à l'époque pu être menée, et ce n'est

qu'en 1998 que la microcystine LR a formellement été identifiée<sup>72</sup>. Un épisode de bloom dans les douves du château de Jehay (province de Liège), avait été particulièrement meurtrier puisqu'au moins une trentaine d'oiseaux – différentes espèces de canards et des hérons - avaient perdu la vie suite à l'ingestion d'eau contaminée par la microcystine LR. En conclusion de cette publication, l'auteur faisait appel à la mise en place d'études plus rigoureuses.

Une étude, publiée en 2005<sup>34</sup>, a permis d'obtenir la distribution des blooms toxiques en Belgique et au Luxembourg, entre 1997 et 2001. La conclusion de cette étude est que plus de 50% des échantillons de blooms, analysés via HPLC couplée à une détection par barrette de diodes (HPLC-DAD), contenaient des microcystines. L'étude a par ailleurs mis en évidence le fait que d'autres variants de la microcystine étaient également présents, en proportions très significatives par rapport à la MC-LR, soulignant l'importance du fait qu'il faille développer des méthodes de screening adaptées à l'ensemble des cyanotoxines. Ainsi, à côté de la MC-LR, présente dans 64 % des blooms analysés, la MC-YR a été retrouvée dans 55 % des blooms. Les microcystines MC-LW, MC-RR, la MC-RR déméthylée (dm-MC-RR) ainsi qu'un variant non identifié ont également été recensés, en proportions non négligeables.

Depuis 2006, une directive européenne est d'application dans le cadre de la gestion de la qualité des eaux de baignade (Directive 2006/7/CE)<sup>73</sup>. Cette directive a pour objectif la réduction et la prévention des risques de pollution des eaux de baignade d'une part, et l'information de la population au sujet du degré de pollution de leurs eaux récréatives d'autre part. En région wallonne, plus de 30 zones de baignade officielles sont, depuis, contrôlées à une fréquence au minimum bimensuelle, entre juin et septembre (15 semaines de périodes de contrôle). Outre les paramètres réglementés, tels *E.coli* et les entérocoques intestinaux, les cyanobactéries sont suivies via comptage de la chlorophylle a, observation au microscope et screening des microcystines par ELISA<sup>7,8</sup>. Ce monitoring constitue une avancée très nette dans la prévention des risques liés aux cyanobactéries. Toutefois, ainsi que la communauté scientifique le souligne régulièrement, ces méthodes ne détectent que la microcystine LR, or plus de 200 variants de la microcystine et d'autres cyanotoxines, de toxicité variable mais pouvant être supérieure, ont été à ce jour recensés<sup>51,53</sup>. Il est donc primordial de les inclure dans le monitoring des eaux de baignade afin de prévenir au maximum les risques.

Dans ce cadre, et afin de répondre aux questions soulevées, le projet B-BLOOMS, prolongé par B-BLOOMS2, a été initié en Belgique, en 2003, avec le soutien de la Politique Scientifique Fédérale (BELSPO). Les objectifs de B-BLOOMS2 étaient principalement de développer les connaissances et les outils nécessaires pour l'établissement d'un réseau national de monitoring et de détection précoce des blooms de cyanobactéries. Après huit ans de recherche et de travaux multidisciplinaires, les projets B-BLOOMS ont permis, notamment, de développer des modèles prédictifs pour les plans d'eau de Bruxelles, permettant de calculer la probabilité d'apparition de blooms. Cette approche permet d'identifier les plans d'eau sujets à des blooms de cyanobactéries et peut ainsi aider les gestionnaires dans la mise au point des programmes de monitoring des plans d'eau les plus

problématiques<sup>74,75</sup>. D'autre part, les mesures réalisées dans les plans d'eau de l'étude, en Belgique, ont mis en évidence la présence de toxines dans chacun d'entre eux. Dans de nombreux cas, les concentrations mesurées dépassaient les valeurs guide de l'OMS<sup>68,69,74</sup>. Ceci confirme la nécessité de prendre des mesures pour réduire les blooms d'une part, via une action globale contre le réchauffement climatique<sup>3</sup>, et d'augmenter le monitoring afin de prévenir l'exposition de la population à ces blooms d'autre part.

Il est à noter que lors du projet B-BLOOMS2, les seules méthodes de détection et quantification utilisées pour les toxines ont été le test ELISA et la détection par HPLC-DAD. Ces deux méthodes, bien que très robustes, présentent l'inconvénient majeur de ne pas permettre une identification précise et spécifique de(s) toxine(s) présente(s). En effet, les anticorps de l'ELISA ciblent la microcystine LR mais la plupart des autres variants sont également détectés, les résultats des analyses étant donc exprimés en « équivalent MC-LR »<sup>76</sup>. En ce qui concerne la détection par HPLC-DAD, la discrimination de deux composés co-éluants ne peut être réalisée en l'état.

Nous avons vu qu'un nombre très important de variants de la microcystine LR était observé dans une majorité de blooms de cyanobactéries, ces variants étant souvent même prédominants par rapport à MC-LR. Nous ne pouvons donc que souligner le besoin important d'une méthode de screening et d'identification de tous les variants connus *et* inconnus de la microcystine, voire de toutes les cyanotoxines. Afin de fiabiliser le monitoring de nos eaux de baignade, et donc de limiter les risques d'intoxication par les cyanotoxines, le screening doit être étendu, et de nouvelles méthodes proposées.

## **2.2 Méthodes d'analyse : Etat des lieux**

Actuellement, en dépit du fait que la communauté scientifique tente de sensibiliser les autorités sanitaires à propos de la menace que constituent les cyanotoxines, aucune réglementation précise n'est en place tant au niveau mondial, qu'au niveau belge. Une méthode de screening, d'identification rapide et de quantification standardisée serait pourtant particulièrement intéressante, afin de proposer une réaction rapide en cas de suspicion de blooms, ou simplement dans le cadre d'un monitoring de contrôle régulier. Nous l'avons vu, la connaissance de la diversité des cyanotoxines s'étend chaque année, avec des toxicités spécifiques importantes à connaître. Dans ce cadre, une méthode permettant de séquencer et donc d'identifier la toxine, est un premier pas pour la compréhension, le monitoring et l'enregistrement de sa toxicité<sup>10</sup>.

Comme il n'est pas possible d'estimer la toxicité d'un bloom uniquement en observant son apparence ou les espèces responsables du bloom, de nombreuses méthodes biologiques et physicochimiques ont été développées. Ces méthodes, soit basées sur une réaction biologique de type immunologique, par exemple, soit physico-chimiques, ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients<sup>36,77</sup>. Nous

présentons les méthodes les plus répandues pour l'analyse de cyanotoxines dans le paragraphe suivant.

### **2.2.1 Méthodes biologiques et biochimiques**

D'un point de vue analytique, les tests biologiques, sont actuellement les plus exploités. Ils ne permettent cependant pas l'identification absolue des toxines car bien que certains soient particulièrement sensibles, ils manquent généralement de spécificité.

Ils sont toutefois très aboutis, et présentent l'avantage non négligeable de coûts d'utilisation bien moindre que les méthodes physicochimiques. En vue de monitoring de masse, ils constituent donc un compromis tout à fait acceptable.

Trois types de tests biologiques tiennent actuellement le haut du pavé dans le monitoring des cyanotoxines. Le premier est le « mouse bioassay », qui comme son nom l'indique, implique l'utilisation *in vivo* de souris de laboratoire dont on évalue le taux de mortalité et/ou d'intoxication. Posant de plus en plus question d'un point de vue éthique, ils sont massivement remplacés par des tests *in vitro*. Ainsi, deux méthodes sont utilisées, principalement pour la détection des microcystines et nodularines.

La première technique est basée sur la mesure de l'activité biologique des toxines, en lien avec leur mécanisme de toxicité : le Protein Phosphatase Inhibition Assay (PPIA), un test enzymatique<sup>36,77</sup>. La deuxième méthode d'analyse, la plus souvent rencontrée, exploite l'immunologie via les tests de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)<sup>36,77</sup>. Ces méthodes sont décrites en Annexe II.

### **2.2.2 Méthodes physico-chimiques – HPLC**

#### *2.2.2.1 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)*

Le nombre d'analogues au sein d'une famille de cyanotoxines peut, nous l'avons mentionné en ce qui concerne les microcystines, être très important. Si ceux-ci sont présents en nombre lors d'un bloom, il est capital que la technique de séparation soit hautement résolue et présente une très bonne sélectivité. Dans cette situation, la chromatographie liquide à haute (et ultra haute) performance est une méthode de choix.

En effet, cette séparation, qui repose sur les différences d'affinité d'un composé entre une phase mobile et une phase stationnaire, est très efficace pour la séparation de mélanges complexes.

Le principe de fonctionnement de la HPLC est décrit en détail en Annexe II.

Nous l'avons vu, les microcystines et les nodularines font partie d'une famille de peptides dont le nombre d'analogues est très élevé. En conséquence, la

séparation de ces analogues requiert une sélectivité et une résolution très importantes. L'analyse par HPLC-UV, bien que très performante en termes de séparation des composants d'un mélange, ne permet toutefois pas l'identification non ambiguë des toxines analysées. En effet, lors d'une détection UV, les composés présents dans l'échantillon, non séparés par la colonne HPLC (qui élue donc au même moment de la colonne – on dit qu'ils co-éluent) ne peuvent être distingués. Dans cette situation, la détection par spectrométrie de masse, bien que techniquement plus compliquée, devient, en couplage avec la HPLC, la technique de choix pour l'identification des composants d'un mélange complexe.

Il est toutefois à noter que tant l'HPLC-DAD, qu'à fortiori le couplage avec la spectrométrie de masse, requiert, en comparaison avec les tests immunologiques ou enzymatiques, un matériel plus performant, encombrant et onéreux, un personnel technique qualifié et une préparation d'échantillon plus élaborée. Ceci se répercute naturellement en termes de coût d'analyse et de temps et c'est la raison pour laquelle ces méthodes HPLC-DAD, HPLC-MS ou HPLC-DAD-MS sont peu utilisées en première approche, lors de screening. Lorsqu'une confirmation est nécessaire, l'HPLC en couplage avec la spectrométrie de masse devient la méthode de choix pour obtenir les informations inaccessibles par les autres méthodes.

### 2.2.2.2 Spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse est un appareil de mesure du rapport masse sur charge ( $m/z$ ) de particules chargées (ions) formées à partir d'un échantillon solide, liquide ou gazeux. Le résultat est présenté sous la forme d'un graphe, le spectre de masse, qui présente le rapport masse sur charge des composés en fonction de leur abondance.

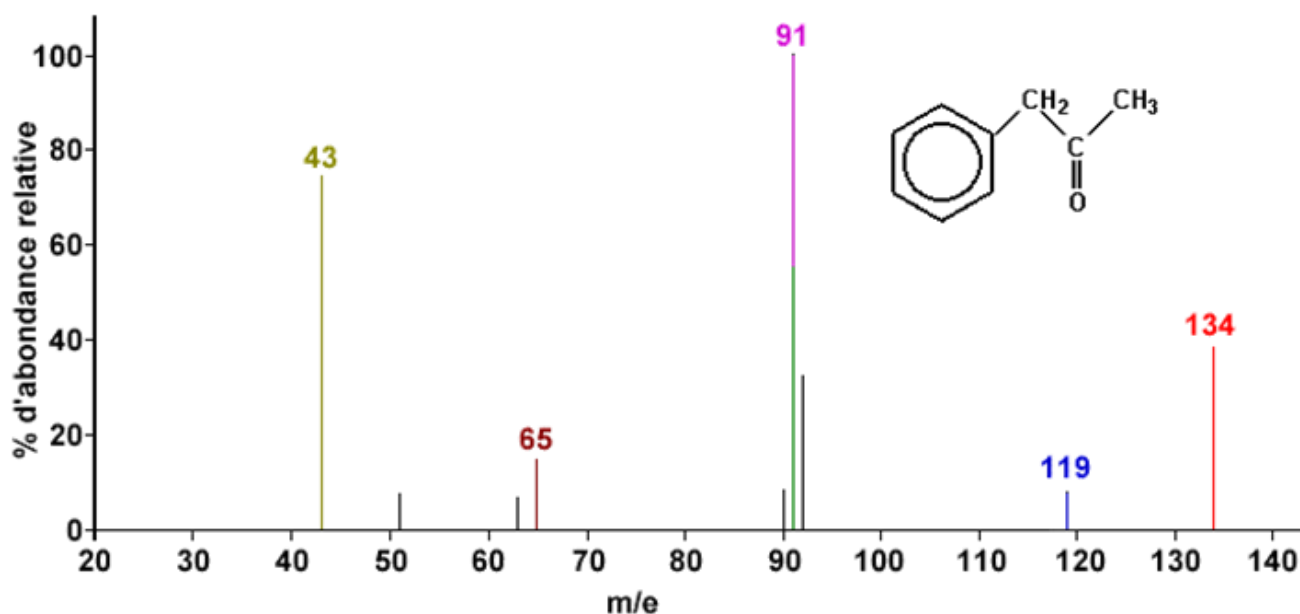


Figure 5 : Spectre de masse de fragmentation de la 1-phényl-2-propanone dont la masse molaire moyenne = 134,18 g/mol

Un spectromètre de masse est constitué de quatre éléments :

- un dispositif d'introduction de l'échantillon,
- une source productrice d'ions,
- un analyseur,
- un détecteur.

Le principe de fonctionnement général d'un spectromètre de masse est le suivant : un échantillon est introduit dans la source productrice d'ions du spectromètre. Les analytes sont alors ionisés en phase gazeuse, selon des mécanismes propres à chaque source, avant leur entrée dans l'analyseur. Soumis à l'action d'un champ électromagnétique et/ou électrique, les ions décrivent une trajectoire variable au sein de l'analyseur. Cette trajectoire, ou le temps mis pour la parcourir, dépend du rapport masse sur charge de l'ion, ce qui permet sa mesure. Plusieurs étapes de spectrométrie de masse peuvent être effectuées consécutivement, suite à l'activation d'ions précurseurs. On parle alors de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ou, plus généralement, de spectrométrie de masse multidimensionnelle (MS<sup>n</sup>).

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse est une technique de choix grâce, notamment, à une sélectivité inégalée. En effet, l'identification non ambiguë des analytes connus est rendue possible, soit par mesure de leur masse exacte, soit par la spécificité de leurs transitions – c'est-à-dire les réactions de fragmentations spécifiques d'un ion - lors de la fragmentation en MS/MS. Chaque critère d'identification apporte une sélectivité supplémentaire à la méthode. Par exemple, s'il existe un grand nombre de composés de masse nominale donnée, le nombre de composés de même masse nominale, mais précise à moins de 5 ppm, est beaucoup plus restreint. De même, la probabilité que plusieurs composés de même masse présentent deux transitions identiques est très faible. Enfin, lors de l'analyse de mélanges, il est possible de joindre une étape de sélection supplémentaire sous la forme d'une séparation chromatographique des divers constituants.

## **2.3 Analyse par spectrométrie de masse**

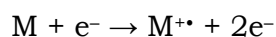
### **2.3.1 Sources d'ionisation**

L'analyse par spectrométrie de masse nécessite, dans un premier temps, la production en phase gazeuse d'ions de la substance d'intérêt. Les ions obtenus sont ensuite séparés, selon leur rapport masse sur charge et détectés.

La technique la plus utilisée aux débuts de la spectrométrie de masse, fut la source à « impact » électronique – ou, plus exactement, la source à ionisation électronique<sup>78</sup>. Le principe de cette source est basé sur le bombardement d'un gaz neutre d'analytes par un flux d'électrons très énergétiques, de l'ordre de plusieurs dizaines d'électronvolts (70 eV). Le passage de ces électrons très énergétiques à proximité de l'échantillon gazeux à basse pression ( $10^{-5}$ - $10^{-6}$  torr) provoque

d'importantes fluctuations du champ électrique entourant les molécules d'échantillon et induit leur ionisation.

L'ionisation se traduit par éjection d'un électron, conduisant à une espèce chargée positivement : l'ion moléculaire ou l'ion radicalaire. Bien que la formation d'ions di- et tri-chargés ait été rapportée, l'ionisation électronique conduit principalement à la formation d'ions monochargés selon :



Le principal inconvénient de cette source est qu'elle ne s'applique globalement qu'aux petites molécules volatiles. S'agissant de molécules non volatiles, de nombreux travaux ont été réalisés afin d'obtenir la formation, en phase gazeuse, d'ions de molécules complexes intacts, comme les peptides et protéines.

Parmi ces différentes sources, les sources d'ionisation via électro-nébulisation (Electrospray Ionisation – ESI) et via ionisation assistée par photons (Laser Desorption Ionisation – LDI) sont celles qui ont permis l'obtention des meilleurs résultats dans le cadre de l'analyse de biomolécules et macromolécules principalement.

Le choix de la méthode d'ionisation dépend majoritairement du type d'information nécessaire. De nombreux développements ont été réalisés autour de la source électrospray, qui présente beaucoup d'avantages et notamment son couplage aisé avec l'HPLC. Toutefois, la source ESI présente quelques limitations, principalement au niveau du choix des solvants utilisés en amont, lesquels peuvent, s'ils sont mal choisis, mener à une extinction totale du signal dans certains cas<sup>79,80</sup>.

### 2.3.1.1 *Electrospray*

Dans le cadre du développement de méthodes d'ionisation à pression atmosphérique, applicables aux analytes en solution après nébulisation, l'ionisation via électrospray a rapidement permis l'obtention de résultats très intéressants, principalement dans le domaine de l'analyse de macromolécules. Initialement en effet, cette source était dédiée à l'analyse de protéines, car elle a rendu possible la mesure de leur masse moléculaire via l'obtention d'ions multichargés intacts en phase gazeuse. Globalement, les mécanismes entrant en jeu sont principalement liés à des phénomènes de désolvation peu énergétiques qui induisent très peu de fragmentation. L'utilisation a rapidement été étendue à l'analyse de polymères, peptides ainsi que de petites molécules polaires<sup>81,82</sup>.

Le mécanisme de fonctionnement d'une source ESI ainsi que sa miniaturisation via le nanospray sont décrits en détail en Annexe II de ce manuscrit.

## 2.3.1.2 MALDI

### 2.3.1.2.1 Principe de fonctionnement

Les prémices de l'ionisation assistée par laser (LDI) remontent à la fin des années 60, où de petites molécules, comme des sels organiques ou des molécules absorbant naturellement dans le domaine de l'UV, ont pu être ionisées par LDI. Une évolution de la technique a vu le jour, à la seconde moitié des années 70, avec l'utilisation de la désorption laser depuis des échantillons solides, pour produire des ions de peptides en phase gazeuse en vue de leur analyse par spectrométrie de masse<sup>83</sup>. Toutefois, aucun peptide de masse supérieure à 1000 Da n'avait pu être ionisé en l'état et intact.

La vraie révolution, permettant l'ionisation douce de macromolécules, via l'adjonction d'une matrice absorbant en UV et favorisant l'ionisation, fut apportée une dizaine d'années plus tard par le groupe de Karas et Hillenkamp<sup>84</sup>. Ils ont montré que cette matrice « assistant » l'ionisation, ajoutée en très large excès à l'échantillon d'intérêt, favorisait l'ionisation de l'analyte tout en le protégeant de l'impact direct du LASER – le MALDI était né<sup>83,85</sup>.

La mise en œuvre pratique est illustrée dans la Figure 6. En comparaison avec d'autres sources d'ionisation, la préparation d'un échantillon à une analyse MALDI est relativement simple et rapide. L'échantillon d'intérêt, en solution, est ainsi déposé sur une plaque, le plus souvent métallique. L'échantillon cristallise avec une matrice en large excès. Après cristallisation, la plaque MALDI est introduite dans la source MALDI en tant que telle, au sein de laquelle règne un vide poussé. La plaque MALDI est ensuite soumise à des tirs LASER, lesquels provoquent la désorption-ionisation de la matrice et des analytes, sous la forme d'une phase gazeuse très dense, la plume MALDI. Ces ions, une fois formés, sont ensuite accélérés et détectés au sein d'un analyseur de masse de type temps de vol (TOF), hybride couplant un quadripôle à un TOF (Q-TOF) ou à résonance cyclotronique ionique et transformée de Fourier (FT-ICR-MS) par exemple.

Le mécanisme détaillé de l'ionisation MALDI est décrit en Annexe II de ce manuscrit.

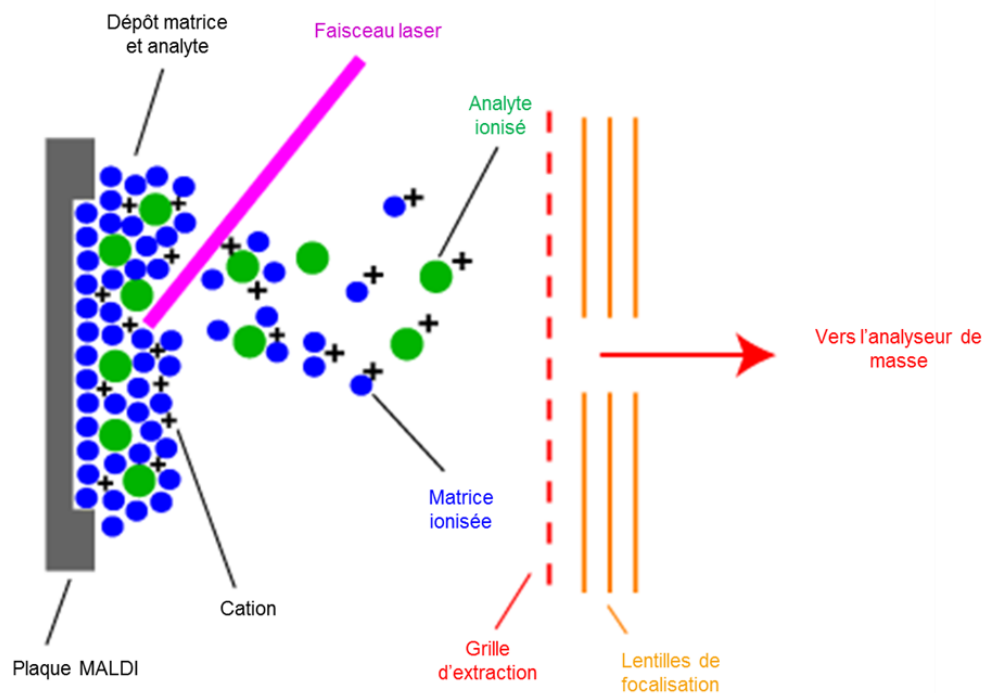


Figure 6 : Représentation schématique de la source MALDI (adapté de la référence 86)

### 2.3.1.2.2 Choix de la matrice MALDI

Nombre de molécules peuvent être analysées par MALDI-MS, sur une gamme de masse permettant l'analyse de molécules de faible poids moléculaire (de l'ordre de 500 Da) jusqu'aux macromolécules, biologiques ou synthétiques, tels les peptides, oligonucléotides, l'acide désoxyribonucléique (ADN), les protéines et les polymères synthétiques avec des masses pouvant atteindre 100 kDa<sup>84,87,88</sup>.

Une matrice MALDI adéquate doit favoriser le passage des analytes en phase gazeuse et assurer leur ionisation tout en les préservant de fragmentations excessives. Pour cela, l'énergie interne transférée sous forme vibrationnelle doit être minimale. Les matrices présentent un chromophore absorbant le rayonnement LASER. Celui-ci est transformé en vibration de l'ensemble des molécules dans un volume restreint. Comme nous l'avons décrit, il s'ensuit la formation d'un panache de matière dense (plume), riche en énergie et contenant des espèces chargées. Les réactions ion-molécule en phase gazeuse interviennent de manière déterminante dans les processus menant aux ions finalement observés. Les paramètres permettant de moduler ces phénomènes sont, entre autres:

- la nature de la matrice (propriétés photophysiques et photochimiques) ;
- le mode de cristallisation ;
- la présence d'additifs ;
- l'optimisation de l'intensité LASER ;
- le temps de séjour des ions dans la source.

Le choix de la matrice est également un paramètre d'extrême importance et il dépend, en général, notamment du type de LASER utilisé, puisque les molécules de la matrice doivent présenter une forte absorption à la longueur d'onde du LASER. Il dépend également de la nature des molécules à ioniser, puisque la formation finale d'ions requiert une co-cristallisation préalable de l'échantillon sur la plaque d'analyse MALDI.

Plusieurs composés ont été décrits comme matrices potentielles en ionisation MALDI. En général, on s'appuie également sur les données publiées dans la littérature lorsque les conditions de l'ionisation MALDI de l'échantillon étudié ont été décrites. L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et l'acide sinapinique (SA) sont les matrices les plus répandues.

Certains critères sont indispensables : la matrice doit pouvoir former des cristaux dopés avec l'analyte et ne doit pas sublimer dans les conditions de vide poussé qui règnent dans la source du spectromètre de masse.

L'analyse MALDI inclut donc la préparation d'un dépôt cristallin. Le mode de préparation de ce dépôt présente généralement une importance capitale. Les deux modes de dépôt matrice-échantillon les plus répandus, à savoir le dépôt en goutte séchée et le dépôt en couche mince, sont détaillés en Annexe II.

## **2.3.2 Spectromètres de masse**

### *2.3.2.1 Principe général et état des lieux*

Il existe différents types d'analyseurs parmi lesquels les spectromètres de masse à secteurs magnétiques, à temps de vol, quadripolaires et hybrides quadripôle-temps de vol, les analyseurs de type piège à ion (ion trap) ou à résonance cyclotronique et transformée de Fourier (FT-ICR) et enfin les analyseurs de type Orbitrap.

Chaque analyseur possède ses propres spécifications, avantages et inconvénients mais tous peuvent être caractérisés par les critères de performance suivants<sup>83</sup> :

- La *gamme de rapport masse sur charge* qui correspond à l'intervalle de  $m/z$  que le spectromètre est capable de détecter. Il s'agit plus exactement de la limite de  $m/z$  mesurable par l'analyseur. La masse la plus élevée dépendra donc du nombre de charges porté par l'ion ;
- La *résolution* qui est la capacité de l'analyseur à distinguer deux composés de  $m/z$  très proches. Lorsque deux masses voisines sont considérées, la résolution correspond au rapport  $M/\Delta m$  où  $M$  est la masse de l'ion considéré et  $\Delta m$  la différence minimale entre le pic considéré et son voisin le plus proche dont il peut être distingué. Dans le cas d'un spectre de masse en mode gaussien, plus les pics sont étroits plus la distinction de deux pics adjacents sera facilitée et

plus la résolution sera importante. De cette notion, on définit également le *pouvoir de résolution* d'un analyseur, comme étant le rapport de la masse  $M$  d'un ion considéré sur la largeur du pic mesuré à mi-hauteur.

- La *sensibilité* qui correspond à la capacité d'un spectromètre de masse à détecter les concentrations (nombre de particules) les plus faibles possibles. Elle peut être exprimée en termes de limite de détection et limite de quantification.

A ces critères de base s'ajoutent la précision et l'exactitude des mesures effectuées au sein de l'analyseur. La précision correspond à la capacité du spectromètre de masse à mesurer la masse d'un analyte avec une variabilité la plus faible possible tandis que l'exactitude se définit par la capacité d'une méthode à fournir un résultat le plus proche possible de la valeur communément admise comme étant « vraie ».

Les spectromètres de masse peuvent être caractérisés par leur manière, continue ou pulsée, de traiter le faisceau d'ions. Dans le premier cas, les ions sont continuellement injectés dans l'analyseur, dont le réglage permet les passages successifs de rapports  $m/z$ , en général, croissants. Ce type d'acquisition est appelé balayage (scan en anglais). Les ions produits lorsque le spectromètre n'est pas réglé sur leur rapport  $m/z$  sont perdus. Dans ce cas, l'enregistrement de spectres complets est peu sensible, car le temps consacré à la détection d'un ion particulier est faible. Pour compenser ce point faible, les acquisitions peuvent être limitées au suivi d'un ou de plusieurs ions particuliers (mode Selected Ion Monitoring – SIM ou mode Multiple Reaction Monitoring - MRM). Ce mode a cependant pour conséquence une perte de l'information spectrale susceptible de permettre l'identification formelle des composés ainsi que la limitation de la méthode à la recherche d'analytes prédéfinis.

Le deuxième type d'analyseur travaille de manière pulsée. Les ions sont injectés par « paquets » dont l'analyse doit être complète avant l'injection du paquet suivant. Ce sont les détecteurs les plus adaptés pour des sources pulsées (comme la source MALDI par exemple). Tous les ions produits sont détectés et les limites de détection sont très basses (1/10 de femtomole voire moins). Dans le cas des analyseurs à temps de vol il n'y a pas de limite à la gamme de masse sinon l'efficacité du détecteur. La résolution dépend du trajet parcouru et de la vitesse des ions. Un compromis doit être trouvé pour assurer un cycle utile adapté au type d'échantillon. Dans le cas d'une source continue, un dispositif pulse le faisceau d'ions entrant dans l'analyseur (pusher).

Enfin, les appareils hybrides tentent de combiner les avantages et de limiter les inconvénients de plusieurs types d'analyseurs. En effet, dans le cas de l'analyseur hybride Q-TOF par exemple, le quadripôle permet la sélection d'un ou plusieurs ions de  $m/z$  déterminés, lesquels peuvent être ensuite fragmentés et détectés en intégralité par l'analyseur à temps de vol. Cette hybridation permet d'exploiter la capacité de de sélection d'ion du quadripôle ainsi que la rapidité et la sensibilité de l'analyseur à temps de vol.

### 2.3.2.2 Analyseur à temps de vol

Le concept d'analyseur à temps de vol a été décrit par Stephens en 1946 et 1953<sup>89,90</sup> et en 1955, le design du premier spectromètre de masse linéaire à temps de vol est publié. C'est ce modèle qui sera ensuite commercialisé<sup>91</sup>.

Le principe fondamental de l'analyseur à temps de vol repose sur la relation existant entre la masse et la vitesse des ions. Le détail du mode de fonctionnement de l'analyseur est décrit en Annexe II.

La première génération d'analyseurs TOF a principalement été exploitée en couplage avec la chromatographie gazeuse. Le principal avantage par rapport aux appareils à secteur électromagnétiques de l'époque était la vitesse d'acquisition très importante permise par les analyseurs à temps de vol. Cette technique a cependant été supplantée, de nombreuses années durant, par les quadripôles de type linéaire avant qu'un regain d'intérêt, créé par le développement de la source MALDI, ne lui rende un second souffle. En effet, le temps de vol étant un analyseur de type pulsé et permettant la transmission d'ions de masses très importantes, son couplage avec une source de MALDI, où l'ionisation est typiquement séquentielle, s'est imposé rapidement.

A l'heure actuelle, les analyseurs de ce type, couplés à des sources douces telles les sources MALDI et ESI, ont totalement dépassé les secteurs magnétiques et les quadripôles linéaires dans une grande majorité d'applications, principalement liées aux biomolécules et superstructures moléculaires<sup>83</sup>.

L'analyseur à temps de vol utilisé dans ce travail, dont le mode de fonctionnement est présenté dans la Figure 7, est l'Ultraflex II (Bruker Daltonics). Il s'agit d'un analyseur à temps de vol précédé d'une source d'ionisation MALDI. L'Ultraflex II peut fonctionner en mode MS simple linéaire, MS simple avec l'utilisation du réflectron ainsi qu'en mode tandem MS, lequel sera décrit plus en détail dans le paragraphe consacré à la spectrométrie de masse en tandem (Annexe II).

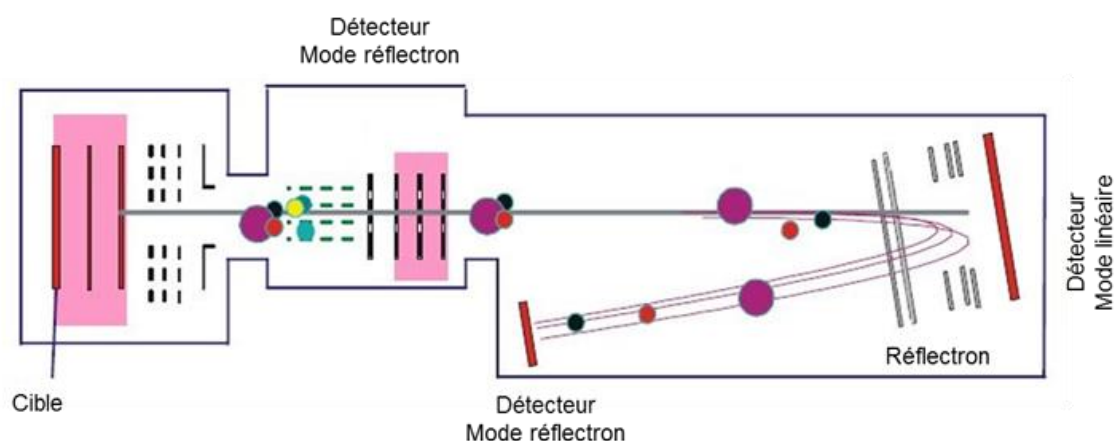


Figure 7 : Schéma du spectromètre de masse Ultraflex II (Bruker Daltonics)<sup>92</sup>

### 2.3.2.3 *Analyseurs à transformée de Fourier*

#### 2.3.2.3.1 FT-ICR

La spectrométrie de masse FT-MS est une technique décrite pour la première fois par Comisarow et Marshal en 1974 mais son application a surtout vu un développement important à la fin des années 1990<sup>87,93-95</sup>.

Le principe de base de la spectrométrie de masse FT-MS ou FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) repose sur la mesure de la fréquence du mouvement cyclotronique - c'est à dire le mouvement circulaire - de particules chargées au sein d'un champ magnétique très intense. Après une étape d'excitation, permettant aux ions de décrire des trajectoires telles qu'ils peuvent être détectés par mesure du courant induit, le détecteur reçoit un signal permettant de mesurer la fréquence cyclotronique des ions. Une transformation mathématique, appelée la transformée de Fourier, permet ensuite l'obtention de la fréquence cyclotronique des ions de même  $m/z$  et, après étalonnage, leur spectre de masse.

En effet, la fréquence du mouvement cyclotronique est indirectement proportionnelle au rapport masse sur charge des ions. Une mesure de la fréquence cyclotronique permet donc de mesurer simultanément le  $m/z$  d'un ou plusieurs ions au sein de la cellule ICR. Le mode de fonctionnement détaillé de l'analyseur FT-ICR-MS est décrit en détail en Annexe II.

Les appareils FT-MS actuels présentent des performances très élevées. Ainsi, leur pouvoir de résolution peut atteindre plusieurs millions, l'exactitude est de l'ordre  $10^{-4}$ - $10^{-3}$ , les limites de détections sont de l'ordre de l'attomole et la gamme de  $m/z$  est toujours plus étendue<sup>83</sup>.

Par ailleurs, notons que les cellules cubiques, disparaissent petit à petit au profit de cellules ICR cylindriques. Cette configuration est en effet bien mieux adaptée à la géométrie d'un aimant supraconducteur et elle permet une meilleure harmonisation des mouvements des ions lorsque les rayons cyclotroniques augmentent. Les cellules ICR nouvelle génération permettent ainsi d'atteindre des pouvoirs de résolution de l'ordre de 20 millions pour une molécule telle que la réserpine ( $m/z = 609,28066$  Da) et supérieure à 1 million pour les ions chargés 49 fois de l'albumine de sérum bovin (BSA)<sup>96</sup>.

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse hybride quadripôle FT-ICR commercialisé par Bruker. Il s'agit du Solarix 9.4T lequel peut être précédé soit d'une source ESI soit d'une source MALDI. Son schéma de conception est présenté en Annexe II.

#### 2.3.2.3.2 Orbitrap

L'Orbitrap est l'un des analyseurs les plus récents, développé et breveté par Makarov en 1999<sup>97-99</sup>. Il a été commercialisé pour la première fois en 2005, par Thermo Fisher Scientific. Pour un coût nettement inférieur à celui d'un FT-ICR,

l'Orbitrap permet l'obtention de spectres de masse présentant un pouvoir de résolution et une précision en masse qui rivalisent avec les résultats obtenus par FT-ICR.

En effet, à la différence d'un FT-ICR, qui nécessite l'utilisation de champs magnétiques extrêmement intenses et dont la mise en œuvre est coûteuse, l'Orbitrap n'utilise aucun champ magnétique.

L'Orbitrap, comme son nom l'indique, est un analyseur de type trappe ionique, mais à la différence du FT-ICR, le piégeage des ions n'est pas réalisé par l'action d'un champ magnétique ou de radiofréquences. Seul un champ électrostatique complexe, résultant de la forme particulière des électrodes, maintient les ions piégés au centre de la trappe<sup>83,87,97-100</sup>.

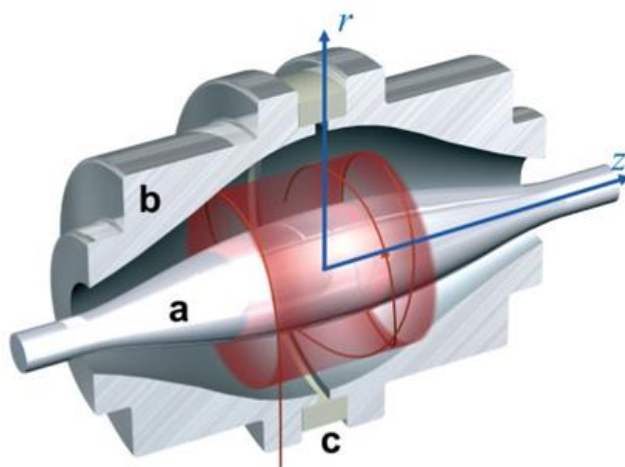


Figure 8 : Schéma de l'Orbitrap constitué de l'électrode fuseau (a), l'électrode externe (b) et le petit intervalle (c) (<sup>98</sup>)

Comme illustré sur la Figure 8, les électrodes formant la trappe à ions sont imbriquées l'une dans l'autre. L'électrode centrale a une forme de fuseau tandis que l'électrode externe a la forme d'un canon, coupé en deux parts égales par un petit intervalle. Après injection, les ions décrivent des trajectoires circulaires et d'avant en arrière à l'intérieur de l'espace libre entre les deux électrodes. Le principe de fonctionnement de cet analyseur est décrit en Annexe II de ce manuscrit.

La Figure 9 illustre la géométrie du Q Exactive (Thermo Fischer). Après ionisation, les ions formés passent au travers des lentilles de focalisation. En mode MS simple, le quadripôle fait juste office de guide d'ions, sans sélection. Les ions pénètrent ensuite dans la C-Trap, laquelle permet le refroidissement et l'injection pulsée des ions dans l'Orbitrap. Les ions sont ensuite détectés selon le mécanisme général décrit ci-dessous. Le schéma illustre également la présence d'une cellule de collision, nommée Higher Energy Collisional Dissociation cell (HCD cell). Il s'agit d'une cellule au sein de laquelle la fragmentation des molécules (mode MS/MS) peut être réalisée.

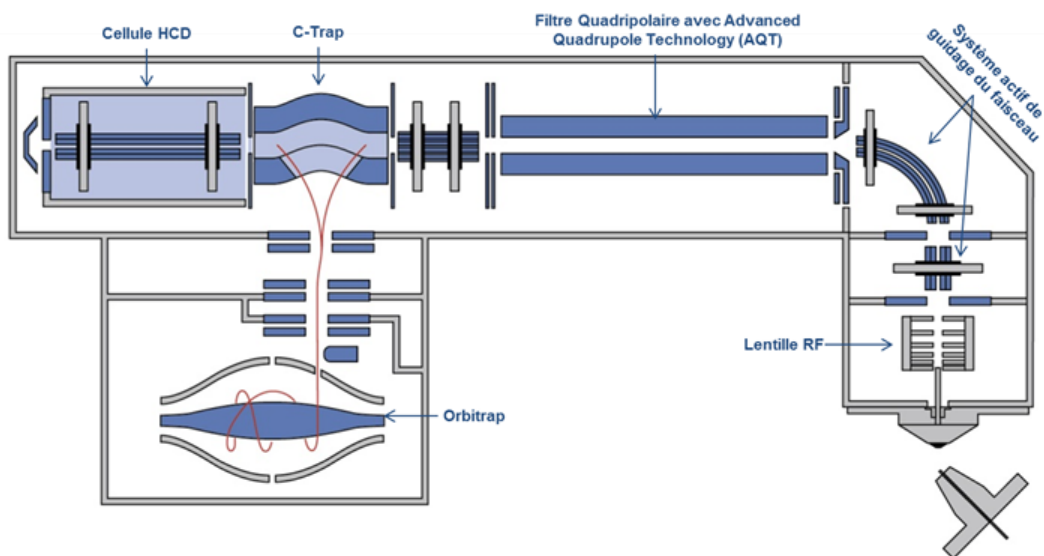


Figure 9 : Schéma et géométrie de l'Orbitrap Q Exactive (Thermo Fischer)

## 2.4 Spectrométrie de masse en tandem

Afin d'augmenter les performances en termes d'identification ou de quantification, la spectrométrie de masse peut être utilisée soit à haute résolution soit en mode "tandem ou MS/MS". Cette spectrométrie à deux étapes, voire plus ( $MS^n$ ) introduit une nouvelle dynamique dans l'analyse de mélanges complexes. La MS/MS permet, en effet, la sélection d'un ion particulier, suivie de sa fragmentation spécifique et l'enregistrement de deux ou plusieurs fragments dont les intensités relatives peuvent être utilisées pour l'identification du composé cible. Il en résulte un gain appréciable de rapport signal sur bruit ainsi qu'une augmentation de la sélectivité.

L'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) repose sur l'isolement d'ions d'intérêt – les ions parents ou précurseurs, suivie de leur fragmentation, spontanée ou consécutive à une activation spécifique. Par exemple, l'activation collisionnelle consiste à isoler un même ensemble d'ions précurseurs déterminés et à augmenter leur énergie interne par des collisions, de manière à lui permettre de se fragmenter dans une fenêtre de temps adéquate.

La Figure 10 représente le principe général de la fragmentation MS/MS. Un échantillon, sous forme solide ou liquide, est ionisé au moyen d'une source productrice d'ions. Les ions précurseurs sont ensuite sélectionnés et fragmentés après avoir été activés. Les fragments produits par la dissociation des ions précurseurs sont ensuite analysés et détectés. L'output de cette expérience est un spectre de masse d'ions produits par fragmentation d'ions parents et caractéristique de ces ions parents.

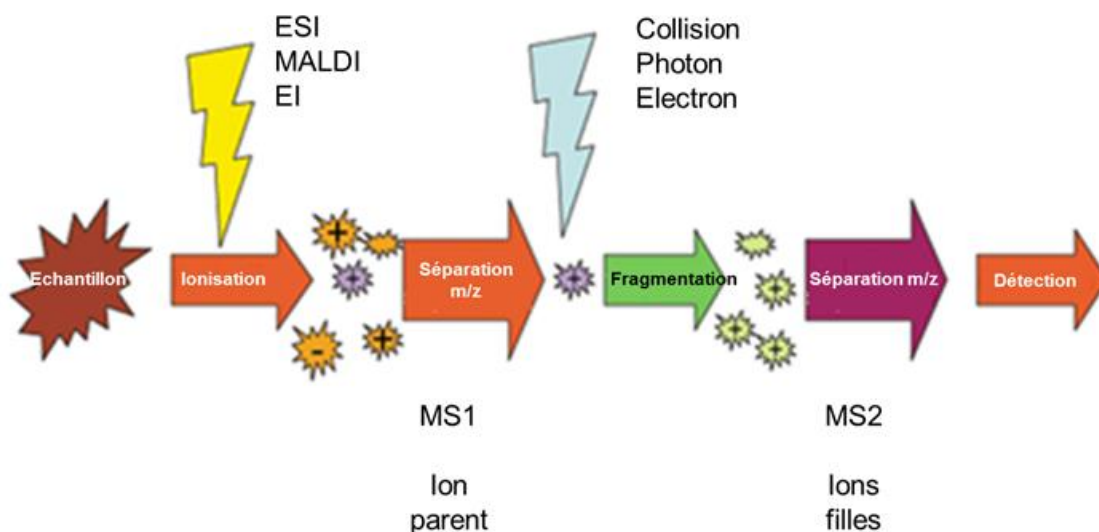


Figure 10 : Schéma du principe général de la spectrométrie de masse en tandem <sup>(101)</sup>

La spectrométrie de masse en tandem peut se présenter sous deux formes, à savoir le tandem dans l'espace ou dans le temps. La MS/MS dans l'espace consistera au couplage de deux ou trois cellules physiquement distinctes, la première permettant la sélection de des ions d'intérêt et la seconde, leur fragmentation et/ou leur détection. Les appareils fonctionnant en tandem dans l'espace sont typiquement les analyseurs de type quadripôles, en couplage avec un appareil à temps de vol ou un autre quadripôle.

La MS/MS temporelle quant à elle, résulte de la suite de séquences spécifiques permettant l'isolement, la fragmentation et l'analyse au sein d'un seul dispositif physique d'analyse. Les analyseurs permettant ce type de MS/MS sont typiquement les spectromètres de type piège, tels la trappe d'ions ou le spectromètre de masse FT-ICR.

A l'heure actuelle, les sources les plus utilisées en couplage avec la spectrométrie de masse sont les sources douces, telles les sources MALDI ou ESI. Elles permettent effectivement l'ionisation de biomolécules complexes, intactes mais dont l'énergie interne est insuffisante pour provoquer une fragmentation. L'apport d'énergie doit donc être externe au système, et il peut prendre forme via différents mécanismes, à savoir notamment : via collision avec un gaz inerte (fragmentation de haute ou basse énergie), via réaction radicalaire, irradiation par des photons infrarouges ou par des électrons. On parle dès lors de fragmentation avec activation radicalaire, photochimique ou collisionnelle. Soulignons également le fait qu'il existe un lien étroit entre le type d'analyseur, le type de source et la méthode d'activation pouvant être mise en œuvre.

Le détail des méthodes d'activation est développé et consultable en Annexe II. Nous mentionnerons néanmoins qu'au cours de ce travail, les différentes méthodes d'activation seront exploitées au sein des trois analyseurs que sont le FT-ICR, l'Orbitrap et l'analyseur à temps de vol.

Le spectre de fragmentation étant fonction de la méthode d'activation, notre travail exploitera plusieurs méthodes afin, en bout de ligne, d'obtenir un maximum d'informations structurales concernant les analytes d'intérêt. En particulier, la comparaison de spectres de fragmentation avec activation collisionnelle via Post Source Decay (PSD) en MALDI et Collision Induced Dissociation (CID) avec leur analogue activé par une méthode radicalaire permettra l'obtention d'informations cruciales d'un point de vue de la structure moléculaire. Cette complémentarité des méthodes d'activation sera l'outil principal de ce travail, avec à terme, la possibilité d'une application à l'échelle environnementale.

## **2.5 Couplage HPLC-MALDI-MS(/MS) et HPLC-ESI-MS(/MS)**

Nous l'avons vu, la chromatographie HPLC, en couplage avec une détection UV, est une technique très répandue pour l'analyse d'échantillons biologiques, y compris les cyanotoxines. Par ailleurs, les progrès dans le domaine de l'analyse de traces contaminant des matrices complexes résultent, en grande partie, du développement rapide des techniques de couplage d'une (ou plusieurs) séparations HPLC avec une détection par la spectrométrie de masse.

Lors du couplage d'une séparation chromatographique en phase liquide avec un spectromètre de masse, il existe certaines exigences quant au choix des solvants, des modifiants organiques ou des tampons utilisés en amont ou pendant l'analyse. En effet, en fonction du type d'analyseur, et plus particulièrement du type de source productrice d'ions avant introduction dans le spectromètre de masse, certains constituants de la phase mobile peuvent avoir des effets néfastes, telle la suppression d'ionisation par exemple. L'étape d'extraction précédant l'introduction dans le dispositif est donc également déterminante pour obtenir un signal le plus optimal possible.

### **2.5.1 HPLC-MALDI-MS(/MS) et HPLC-ESI-MS(/MS)**

Pour le couplage HPLC avec la spectrométrie de masse, le type de source revêt une importance capitale. L'ionisation par électrospray est rapidement devenue la technique de choix<sup>102</sup>.

Toutefois, parallèlement au développement de l'électrospray, la source MALDI a également vu une croissance rapide de son utilisation en raison de son applicabilité à l'analyse de macromolécules biologiques ou synthétiques. Nous l'avons décrit dans le paragraphe relatif aux sources d'ionisation, chacune présente ses avantages et ses inconvénients mais d'un point de vue couplage avec une séparation par HPLC, l'ESI a longtemps été la seule option possible.

Depuis quelques années, la source MALDI peut être couplée avec la chromatographie liquide. L'éluant de la colonne HPLC est déposé goutte-à-goutte sur les plots consécutifs d'une plaque d'analyse MALDI. Ce couplage LC-MALDI offre des performances intéressantes par rapport à l'HPLC-ESI, notamment sur le plan de l'utilisation optimale de l'échantillon. Celui-ci est en effet déposé dans sa totalité sur un support solide et n'est consommé que lors des tirs LASER. La séparation chromatographique des molécules est en quelque sorte stockée (figée

pour un temps plus long) sur le support solide et l'analyse peut être renouvelée ultérieurement, et à plusieurs reprises.

Dans le cadre de l'analyse de cyanotoxines par des méthodes physico-chimiques, on peut recenser l'utilisation des couplages HPLC-UV, HPLC-DAD et HPLC avec détection par fluorescence (FLD), ainsi que HPLC-MS. Une analyse plus approfondie de l'utilisation actuelle de la spectrométrie de masse pour l'analyse de cyanotoxines permet de voir qu'en général, la spectrométrie de masse MALDI-TOF est utilisée comme étape de screening ou pour la constitution de bases de données de spectres de masses (empreintes digitales de blooms = fingerprint)<sup>103,104</sup>. En méthode de confirmation, le couplage HPLC-ESI-MS/MS est le plus répandu, exploitant tous les avantages de la technique à savoir :

- Une séparation efficace et une sélectivité apportée par l'HPLC
- Une ionisation douce et adaptée aux molécules de type peptidiques et/ou biologiques par électrospray
- L'élucidation structurale partielle ou l'identification par confrontation des données MS/MS à une base de données
- La possibilité de quantification réelle, accompagnée en MS/MS de l'utilisation d'un standard et de la construction de courbes d'étalonnages.

Si la méthode HPLC-ESI-MS/MS permet une identification, voire une quantification d'une toxine cible, elle ne permet pas de détecter ou identifier un composé inconnu ou dont le suivi n'était pas programmé. L'approche MALDI-TOF-MS en revanche, permet de détecter la présence de composés inconnus, mais ni leur élucidation structurale, ni leur quantification ne sont aisément accessibles sans l'apport de la spectrométrie de masse en tandem. Le couplage HPLC-MALDI-MS/MS permettrait de rassembler de nombreux avantages liés à la technique de screening par MALDI-TOF-MS avec ceux inhérents à l'identification par HPLC-ESI-MS/MS.

### **2.5.2 Quantification**

Nous l'avons évoqué, les méthodes quantitatives requièrent souvent l'utilisation de standards. Dans le cas de cyanotoxines telles les microcystines, dont le nombre de variants dépasse les 240<sup>51,53</sup>, le nombre de standards commercialement accessibles est très faible (de l'ordre d'une vingtaine). En couplage avec la spectrométrie de masse, il est même d'usage d'utiliser des standards marqués isotopiquement afin de pouvoir les ajouter en début d'analyse à l'échantillon et afin qu'ils subissent toutes les étapes précédant l'analyse et la quantification. Ce type de standard n'est pas accessible pour l'instant dans le cas des microcystines, principalement car leur synthèse artificielle est actuellement impossible. Toutefois, bien qu'encore peu répandue, la technique de la dilution isotopique, puisque c'est de cette méthode quantitative qu'il s'agit, a été appliquée en 2009 pour la quantification de saxitoxines, par l'équipe de Johnson<sup>105</sup>. En effet, la structure chimique des analogues de la famille des saxitoxines est plus simple et

accessible par voie synthétique, rendant la substitution par un isotope lourd possible.

En conclusion, aucune technologie ne permet simultanément un screening rapide, l'identification et la quantification des composés toxiques émis lors d'un bloom.

### **3. OBJECTIFS ET STRATÉGIE SCIENTIFIQUE**

#### **3.1 Objectifs**

L'objectif global de ce travail de thèse est de proposer un outil physicochimique permettant l'obtention d'informations inaccessibles par les techniques actuelles. Ainsi, nous proposons de développer une méthode de caractérisation de cyanotoxines par HPLC-MALDI-MS(/MS).

##### **3.1.1 Détection et ionisation**

Bien que la majorité des études par approche MALDI-TOF-MS s'appliquent aux macromolécules biologiques (peptides, protéines, ADN), les perspectives d'application aux molécules de plus faible poids moléculaire sont nombreuses. En effet, de nombreuses publications font état d'une rapidité accrue par rapport aux méthodes classiques ESI-MS/MS ainsi que de la diminution de l'effet de suppression d'ionisation consécutif à la présence de sels ou de tampons lors de l'ionisation électrospray, la source d'ionisation MALDI étant de manière générale plus tolérante aux impuretés<sup>106,107</sup>. Par définition, l'ionisation par MALDI exploite une matrice qui co-cristallise avec l'analyte et permet le transfert de l'énergie LASER à l'analyte, ainsi que son ionisation. Ces matrices, classiquement, présentent des poids moléculaires compris entre 130 et 300 Daltons, résultant en une surcharge du spectre de masse aux masses inférieures à 1000 voire 500 Da. Si l'on souhaite appliquer la méthode, tant aux petites cyanotoxines qu'aux toxines peptidiques de type microcystines, le premier objectif sera de mettre au point une matrice qui permette l'ionisation efficace d'un ensemble de cyanotoxines potentiellement présentes dans un échantillon, tout en minimisant les interférences aux faibles masses moléculaires.

##### **3.1.2 Caractérisation et identification**

Nous souhaitons ensuite axer le travail sur l'obtention d'informations structurales permettant la *caractérisation* de différentes cyanotoxines via la fragmentation en source (In Source Decay - ISD) ou la fragmentation Post Source Decay (PSD). La caractérisation des cyanotoxines, en utilisant les dernières avancées technologiques et chimiques (1,5-DAN), devait être développée.

##### **3.1.3 Séparation**

Notre souhait était de démontrer, par une approche LC-MALDI-MS/MS, la possibilité d'un screening rapide de prélèvements environnementaux issus de blooms, suivi d'une identification de l'agent pathogène à partir de ce même échantillon. En effet la technique du LC-MALDI permet de conserver la séparation chromatographique et de l'analyser de manière séquentielle, au besoin.

### **3.1.4 Application environnementale**

L'objectif de ce travail consistait finalement à développer cette méthode HPLC-MALDI-MS et MS/MS (le cas échéant sur un spectromètre de masse de type TOF ou piège FT-MS) permettant un screening rapide d'échantillons environnementaux. La séparation chromatographique étant stockée sur un support physique transportable, celle-ci pourrait également être analysée au sein d'autres appareils, rendant accessibles la caractérisation précise et l'identification d'un grand nombre de toxines. En parallèle, nous proposons le couplage HPLC-ESI-MS sur un détecteur de masse de type Orbitrap, lequel pourra être utilisé à titre de confirmation ou au titre de méthode complémentaire<sup>108</sup>.

En conclusion, l'avantage supplémentaire de notre méthode LC-MALDI-MS/MS sera de permettre la détection et l'identification d'analytes dont le suivi n'était pas initialement programmé. En effet, l'analyse des spectres de première dimension (MS) permet la détection, sans a priori, de tous les composés présents. Une fois détectés, les composés présentant un intérêt pourront être analysés, par MS/MS, sans qu'une nouvelle séparation chromatographique soit nécessaire.

## **3.2 Stratégie scientifique**

Le premier point d'action de ce travail a été la sélection de matrices adéquates, minimisant les interférences entre analytes et ions matriciels, assurant un rendement d'ionisation maximum et permettant le contrôle de l'énergie interne des ions. Cette sélection devait permettre l'obtention de spectres reproductibles. La littérature sur le sujet permettait, au démarrage de ce projet, un réel optimisme quant au développement de telles matrices, ou simplement l'analyse en l'absence de matrice (DIOS)<sup>109,110</sup>. En outre, nous avons souligné dans cette introduction l'importance de disposer d'une méthode permettant l'identification de toxines émergentes, ainsi que de toxines dont on ne dispose pas de standard permettant l'identification par les méthodes classiques. Nous détaillons dès lors la caractérisation de ces toxines, par différentes techniques de fragmentation permettant, chacune, l'obtention d'informations spécifiques. L'évaluation de matrices ainsi que l'exploitation, principalement, des propriétés réductrices de la matrice 1,5-DAN en MALDI, sont présentées dans le chapitre 1 de ce manuscrit. En effet, nous avons pu mettre en lumière une variante très prometteuse de l'ISD, via l'exploitation des propriétés réductrices de la matrice MALDI 1,5-DAN. L'ion formé est très caractéristique et nous proposons une explication ainsi qu'une validation de l'hypothèse grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem, sur différents analyseurs. L'hypothèse sera vérifiée par MS/MS dans un appareil à temps de vol (Ultraflex II) et également dans un spectromètre de masse FT-ICR. Ce dernier présentant l'avantage de permettre l'analyse d'un même échantillon, soit par MALDI soit par ESI.

Nous détaillons ensuite, au chapitre 2, la mise au point de la séparation HPLC d'un mélange de toxines en préambule à une ionisation soit par ESI (Orbitrap) soit par MALDI (FT-ICR).

Enfin, le chapitre 3 présente une application environnementale de notre méthode. Les apports et les limitations de la méthode proposée sont discutés au travers de l'étude d'un cas très concret. En effet, le Centre d'Ingénierie des Protéines de l'Université de Liège a, au cours de l'année 2009, effectué un échantillonnage, chaque semaine durant la saison chaude, dans un des lacs de l'Eau d'Heure, le lac du Ry Jaune. Nous avons reçu et analysé ces échantillons, en ce compris l'étape d'extraction/purification et nous les avons analysé de manière comparative par HPLC-ESI-Orbitrap et HPLC-MALDI-FT-ICR (MS et MS/MS). Les résultats obtenus permettent d'identifier une majorité de toxines présentes dans les échantillons et d'illustrer la valeur ajoutée qu'apporte cette approche combinatoire par rapport à la technique de référence utilisée dans l'étude, à savoir dans ce cas, la méthode ELISA.

Nous clôturons ce travail en discutant des limitations et points positifs de notre méthode ainsi que des perspectives à moyen et plus long terme. Par exemple, les résultats préliminaires relatifs aux perspectives de quantification en MALDI, sont présentés et discutés.

**CHAPITRE I : OPTIMISATION DE LA DÉTECTION DE  
CYANOTOXINES PAR MALDI-MS**



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Comparaison du spectre de la microcystine LR ionisée à l'aide de la matrice 2,5-DHB (B) avec le spectre de la matrice 2,5-DHB seule (A) .....	45
Figure 2 : Comparaison du spectre de la microcystine LR ionisée à l'aide de la matrice HCCA (B) avec le spectre de la matrice HCCA seule (A) .....	46
Figure 3 : Spectres de la microcystine LR co-cristallisée avec les matrices MALDI 2,5-DHB (A), HCCA (B), HQ (C) et PA/HQ 90/10 (D) et analysée au seuil d'ionisation relatif à chaque matrice .....	47
Figure 4 : Structures chimiques des molécules évaluées en tant que standards interne : la réserpine (A), la leucine encéphaline (B) et la microcystine LR (C) et de l'analyte test, la nodularine (D) .....	50
Figure 5 : Courbes d'étalonnage pour la nodularine en MALDI-TOF-MS à l'aide des matrices 2,5-DHB (Haut) et HCCA (Bas) et en fonction du standard interne (Bleu : Réserpine, Rouge : Leucine encéphaline, Vert : MC-LR).....	51
Figure 6 : Structure générale d'une porphyrine .....	53
Figure 7 : Agrandissement du spectre de la nodularine sur matrice F20TPP et de la matrice F20TPP seule.....	56
Figure 8 : Spectres TOF-MS du mélange de calibrants « PEG+Na <sup>+</sup> et PEG+Rb <sup>+</sup> » enregistrés par DIOS-TOF-MS (haut) et MALDI-TOF-MS sur une plaque présptottée PAC <sup>TM</sup> (bas) .....	61
Figure 9 : Spectre DIOS de la réserpine (6 µg/mL dans H <sub>2</sub> O/ACN 50/50).....	62
Figure 10 : Mélange de cinq toxines MELTOX5 analysées par DIOS vs matrice HCCA (sur plaque présptottée PAC <sup>TM</sup> Bruker Daltonics).....	63
Figure 11 : Spectres MALDI-MS d'un mélange de 7 toxines en matrice TiO <sub>2</sub> .....	65
Figure 12 : Spectre MALDI-TOF-MS de la réserpine (6 ng déposés) obtenu à l'aide d'une matrice à base de 'mines de crayon'.....	68
Figure 13 : Spectres MALDI-TOF-MS de la microcystine LR sur la matrice classique 2,5-DHB (A) et les matrices ioniques liquides ILM1-ILM5 (B-F).....	71
Figure 14 : Spectres MALDI-TOF-MS de la microcystine LR sur la matrice classique HCCA (A) et les matrices ioniques liquides ILM6-ILM10 (B-E).....	72
Figure 15 : Spectres de la MC-LR analysée par MALDI-TOF-MS/MS à l'aide de matrices classiques et ILM, et enregistrés en mode LIFT <sup>TM</sup> sur l'Ultraflex II .....	78
Figure 16 : Comparaison des profils « isotopiques » des microcystines LR, RR et YR et de la nodularine analysées par MALDI-TOF dans les matrices 2,5-DHB et 1,5-DAN .....	82
Figure 17 : Comparaison des profils isotopiques des peptides P1-Ala, P2-Dha et P3-Dhb analysés par MALDI-TOF dans les matrices 2,5-DHB et 1,5-DAN.....	84
Figure 18 : Spectre PSD MS/MS du peptide P2-Dha obtenu avec la matrice MALDI 1,5-DAN .....	86

Figure 19 : Agrandissements du spectre MS/MS de P2-Ala obtenu à l'aide de la matrice 1,5-DAN : exemples de pics présentant une distribution "normale", observée pour les fragments  $a_2$ ,  $b_2-17$  et  $b_2$  (A) et une distribution "réduite" avec les ions  $b_6$  et  $b_6+18$  (B)..... 88

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Coefficients de détermination des courbes d'étalonnage pour la quantification de la nodularine par MALDI-TOF-MS, calculés sur base des aires absolues et relatives (corrigées par rapport aux standards internes réserpine, leucine encéphaline ou microcystine LR) et enregistrés dans les matrices 2,5-DHB et HCCA.....	52
Tableau 2 : Structure, formule brute et masse moléculaire des porphyrines testées .....	54
Tableau 3 : Combinaisons de solutions de matrices transparentes.....	58
Tableau 4 : Matrices ioniques liquides évaluées .....	70
Tableau 5 : Capacités d'ionisation d'une sélection de toxines par 10 matrices ioniques liquides .....	73
Tableau 6 : Classement des matrices ioniques liquides pour la microcystine LR ...	74
Tableau 7 : Classement des matrices ioniques liquides pour l'ensemble des toxines .....	74
Tableau 8 : Masses monoisotopiques théoriques pour chaque adduit toxine + cation potentiellement détecté lors de l'ionisation par MALDI-TOF-MS au moyen d'ILMs.	76
Tableau 9 : Résumé des adduits de cation observés pour les 6 toxines évaluées ...	76
Tableau 10 : Ions identifiés en MS/MS.....	87

## 1. OBJECTIFS ET STRATEGIE

L'analyse de cyanotoxines par MALDI-MS fait l'objet de ce travail. Les matrices MALDI conventionnelles, de faibles masses moléculaires, conduisent à un grand nombre d'ions pouvant interférer avec les analytes de basses masses (< 1000 Da). Ces ions sont principalement des clusters de matrices et des adduits échantillon-matrice. Ce chapitre exposera les recherches effectuées en vue de déterminer les matrices les plus adéquates pour la réalisation du projet, c'est-à-dire celles qui tout en minimisant les interférences entre toxines et ions matriciels, assurent un rendement d'ionisation optimal. Ces essais sont réalisés sur base d'une revue de la littérature.

Le problème de l'utilisation du MALDI pour l'analyse de petites molécules a été soulevé par de nombreux groupes, bien qu'aucune solution universelle n'ait émergé. Ainsi, plusieurs méthodes alternatives se sont développées en parallèle, dont notamment l'ionisation via des matrices polymériques<sup>111</sup> ou des matrices à haut poids moléculaire, telles les porphyrines<sup>112</sup>. L'intérêt de ces matrices est qu'elles ne produisent pas d'interférences dans la zone de masses 100-1000 Da, tout en permettant, sur papier, l'ionisation de petites molécules.

Une autre alternative, envisagée afin de résoudre cette difficulté, est l'utilisation de matrices fragiles qui se décomposent en molécules neutres et volatiles. Ces matrices « transparentes » ont par le passé été étudiées au laboratoire et on a montré qu'elles peuvent également mener à une désorption d'ions<sup>113</sup>.

Les matrices classiques, c'est-à-dire les matrices MALDI ayant permis l'essor de la technique et utilisées dans l'immense majorité des applications MALDI, ont été évaluées ainsi que les matrices alternatives les plus pertinentes par rapport à notre projet.

Ce chapitre détaillera l'évaluation pratique de solutions qui étaient, sur base de la littérature au commencement et au cours de ce travail, adéquates pour l'ionisation et la quantification efficace de petites molécules d'origine environnementales telles les cyanotoxines.

Notons que l'obtention de certaines cyanotoxines, considérées comme armes bactériologiques dans certains pays (la saxitoxine par exemple), a parfois été longue et fastidieuse. Par ailleurs, les toxines de cyanobactéries étant particulièrement onéreuses, nous avons été confrontés, à certains moments de ce travail, à différentes pénuries temporaires ou définitives de standards. Enfin, l'objectif initial du travail était le développement d'une méthode d'analyse MALDI de petites molécules biologiques sans précision initiale sur le type de molécules. Ces différents points permettent d'expliquer les raisons pour lesquelles, au fil des résultats de ce travail, nous aurons :

- De nombreuses variantes de mélanges de toxines utilisés pour effectuer les tests (composition, concentration, solvant)
- L'utilisation de petites toxines biologiques n'étant pas des cyanotoxines (les mycotoxines)

- L'évolution progressive d'un mélange de cyanotoxines marines et d'eau douce (toxines majoritairement marines : saxitoxines, gonyautoxines, acide domoïque et toxines majoritairement d'eaux douces : microcystines, nodularine) vers un mélange de toxines se développant principalement en eaux douces uniquement (microcystines, nodularines et certaines cyanopeptolines telles la microginine)

## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1.1 Matériel**

Le dioxyde de titane, l'aflatoxine B1, la patuline, l'iodure de lithium, l'iodure de sodium, le chlorure de potassium et le sulfate d'ammonium, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), l'acide picolinique (PA), l'hydroquinone (HQ), l'acide trifluoroacétique (TFA), l'acide formique (FA), la leucine encéphaline, la cylindrospermopsine, les microcystines LR, RR et YR et la nodularine ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Steinheim et Taufkirchen, Allemagne et Bornem, Belgique).

Les sels  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  et  $\text{NaNO}_3$  ont été achetées chez Fluka Chemie AG (Buch, Suisse).

La matrice 1,5-diaminonaphtalène a été achetée chez Acros Organic bvba (Geel, Belgique).

La saxitoxine, la néosaxitoxine, la cylindrospermopsine et la pectenotoxine-2 provenaient du NRC (National Research Council) Canada.

La pyridine, l'aniline, le méthylimidazole, la n-butylamine, la triéthylamine ont été fournis par le préparateur du service de Chimie Organique de l'Université de Liège (A. Bouillez).

Le mélange de calibrants MassPrep Calibration Mix – DIOS Low Mass™ provenait de chez Waters (Milfort, USA) et le mélange de calibrants Peptide Calibration Standard II provenait de Bruker Daltonics (Bremen, Allemagne).

La réserpine provenait de chez Ciba-Geigy (St. Louis, MO, USA).

Les trois peptides synthétiques RFEAALD (P1-Ala), RFEDhaALD (P2-Dha), où Dha est l'acide amine déhydroalanine et RFEDhbALD (P3-Dhb) où Dhb est l'acide déhydroaminobutyrique ont été synthétisés « sur mesure », avec une pureté supérieure à 95 %, par Xaia Custom Peptides (Göteborg, Suède).

Le crayon utilisé était un crayon à mine grasse de type 6B et provenant de chez England Derwent Graphic.

Tous les solvants utilisés étaient de qualité HPLC, l'eau était de l'eau Milli-Q.

### **2.1.2 Préparation d'échantillon**

Sauf mention contraire, 1  $\mu\text{L}$  de chaque solution est déposée, après dépôt et cristallisation de la solution de matrice, sur la plaque MALDI (AnchorChip 600). Les matrices sont préparées par dissolution d'une masse adéquate de poudre telle que la concentration finale soit de 20 mg/mL dans ACN :  $\text{H}_2\text{O}$  (1:1).

### **2.1.3 Paramètres MS (et MS/MS)**

L'analyse MALDI a été réalisée à l'aide d'un Ultraflex II (Bruker Daltonics), en mode réflectron positif. Chaque spectre est enregistré à la puissance LASER seuil afin de minimiser le bruit et de maximiser la résolution.

### 3. MATRICES CONVENTIONNELLES

#### 3.1 Introduction

L'objectif de ce chapitre étant l'obtention d'un spectre de masse de cyanotoxines par MALDI-MS avec un bruit de fond minimisé, la première étape était de tester les matrices conventionnelles.

#### 3.2 Résultats et discussion

##### 3.2.1 Ionisation

La Figure 1 présente le spectre MALDI de la microcystine LR, co-cristallisée à 1 pmol par dépôt en utilisant la matrice de 2,5-DHB et le compare avec le spectre MS de la matrice seule. La microcystine est ionisée et le spectre présente peu d'interférences matricielles. En effet, ainsi qu'il apparaît sur la Figure 1, la zone des ions de matrice est concentrée sur la gamme de  $m/z$  de 100 à 700 Da. Il s'agit principalement de clusters de matrices ainsi que d'adduits de sodium et de potassium. Ainsi par exemple, les ions de  $m/z = 154.0$  Da correspondent aux ions de matrice 2,5-DHB protonés, tandis que les ions de  $m/z = 177.0$  Da correspondent aux adduits de sodium et les ions de  $m/z = 193.0$  Da correspondent aux adduits de potassium.

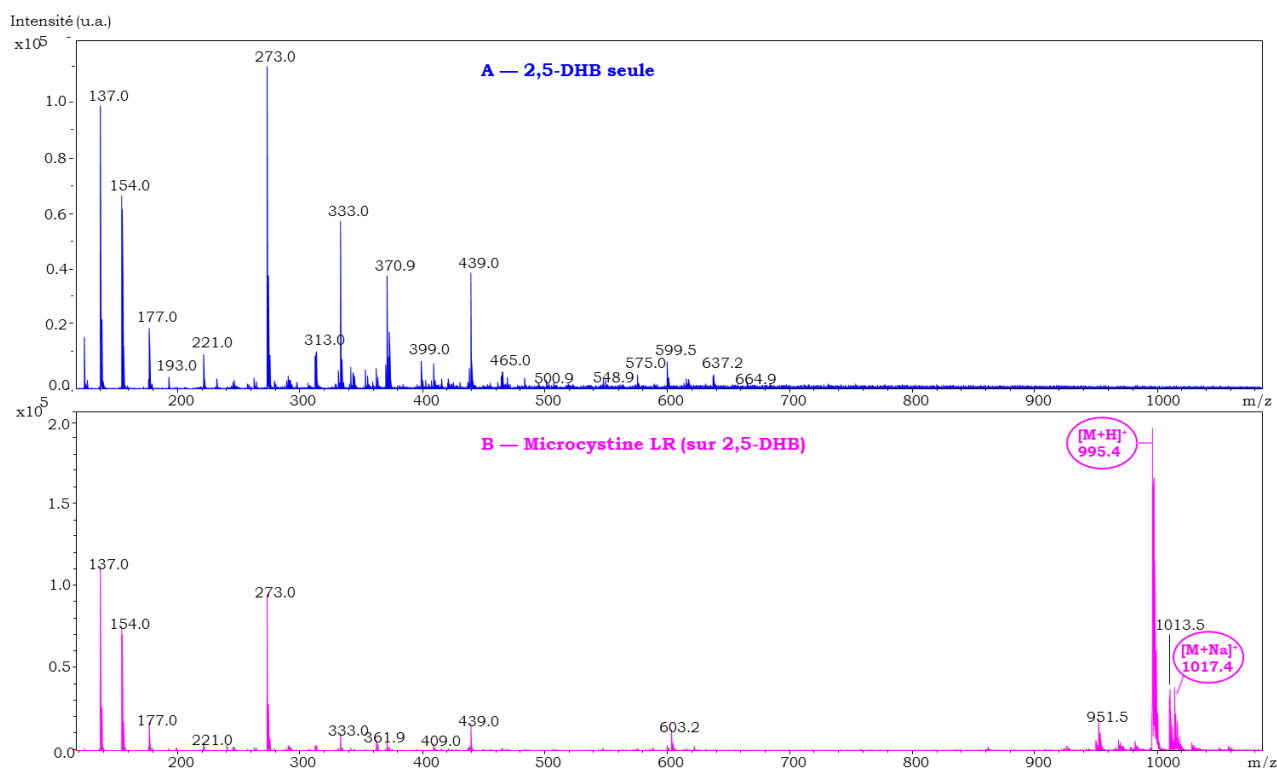


Figure 1 : Comparaison du spectre de la microcystine LR ionisée à l'aide de la matrice 2,5-DHB (B) avec le spectre de la matrice 2,5-DHB seule (A)

La gamme de  $m/z$  de la microcystine LR est centrée sur le  $m/z = 995.4$  Da qui correspond à la microcystine LR protonée  $[M+H]^+$ . L'ionisation MALDI donne majoritairement lieu à des ions monochargés, et cela a été confirmé dans le spectre de microcystine LR ( $m/z = 995.4$  Da). Les adduits de sels, bien que détectés, sont minoritaires par rapport aux ions  $[M+H]^+$ . En effet, l'adduit de sodium de  $m/z = 1017.4$  Da est détecté avec une intensité correspondant à moins 20 % de l'intensité du pic de base – tandis que l'adduit de potassium  $[M+K]^+$  est détecté avec une intensité de 0.3% par rapport aux ions  $[M+H]^+$ . Les ions de  $m/z = 951.5$  Da et 1013.5 Da n'ont pas pu être identifiés. Il s'agit très vraisemblablement d'impuretés n'ayant pas été résolues par la chromatographie préparative ayant permis de préparer le standard de MC-LR. En effet, les microcystines sont des molécules complexes dont la synthèse par voie chimique n'est pas possible à ce jour. Les standards sont donc préparés par dilution d'un extrait purifié de microcystines produite par une cyanobactérie – *Microcystis spp.* dans le cas de ce travail.

Une autre matrice traditionnelle, HCCA, a également été testée, et le spectre de la MC-LR est présenté dans la Figure 2. Cette matrice présente l'avantage, par rapport à la matrice 2,5-DHB, de cristalliser de façon plus homogène, facilitant dès lors la mise en œuvre d'une méthode quantitative – voire automatisée. Néanmoins, ainsi qu'il apparaît sur la Figure 2, l'intensité des ions de matrices dans la gamme de masse [100-600] au seuil d'ionisation de la MC-LR, est nettement plus importante.

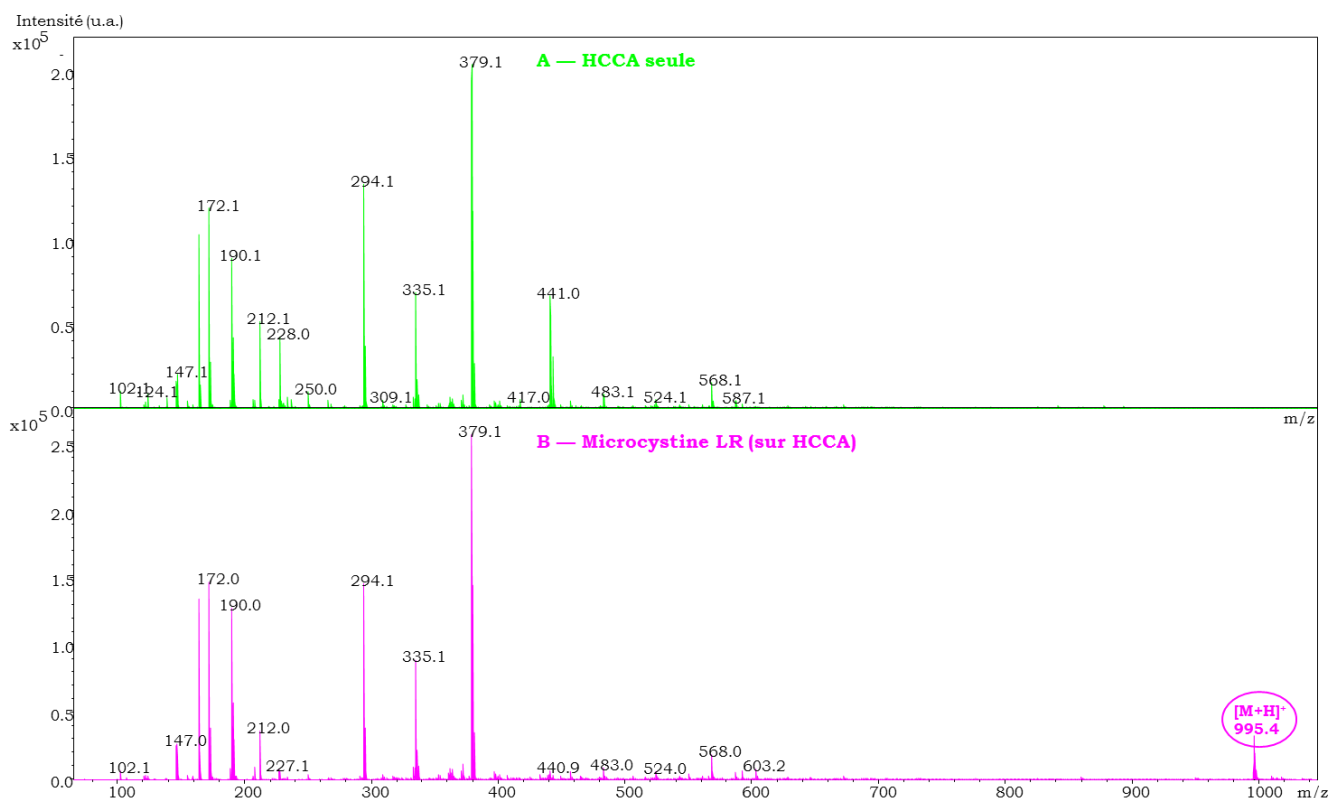


Figure 2 : Comparaison du spectre de la microcystine LR ionisée à l'aide de la matrice HCCA (B) avec le spectre de la matrice HCCA seule (A)

En effet, le pic de base, à la puissance seuil de la MC-LR, correspond aux ions de matrice HCCA ( $m/z = 379.1$  Da). L'ionisation de la MC-LR à l'aide de la matrice HCCA semble moins bonne qu'en présence de la matrice MALDI 2,5-DHB. Par ailleurs, les ions protonés sont toujours majoritaires, bien que les adduits de sodium et de potassium soient également détectés avec des intensités relatives respectivement de l'ordre de 7% et 4% par rapport à celle des ions  $[M+H]^+$ . Enfin, les ions, attribués à des impuretés dans le standard de la MC-LR, sont également présents dans le spectre aux  $m/z = 951.5$  Da et  $1013.5$  Da, avec toutefois des intensités relatives plus faibles par rapport aux ions  $[M+H]^+$  de la MC-LR.

Nous avons également évalué les capacités d'ionisation d'autres matrices classiques, à savoir l'hydroquinone, l'acide sinapinique et un mélange d'acide picolinique et d'hydroquinone. Nos tests ont été réalisés avec les toxines nodularine et microcystine LR afin de pouvoir apprécier la capacité d'ionisation sans risquer d'être confrontés aux interférences des basses masses.

L'efficacité d'ionisation des deux cyanotoxines par les matrices acide sinapinique, hydroquinone et le mélange avec l'acide picolinique est assez faible. La Figure 3 présente les spectres MALDI-TOF de la microcystine LR, déposée à raison d'1pmol par dépôt, sur les matrices 2,5-DHB, HCCA, hydroquinone et acide picolinique/hydroquinone 90/10.

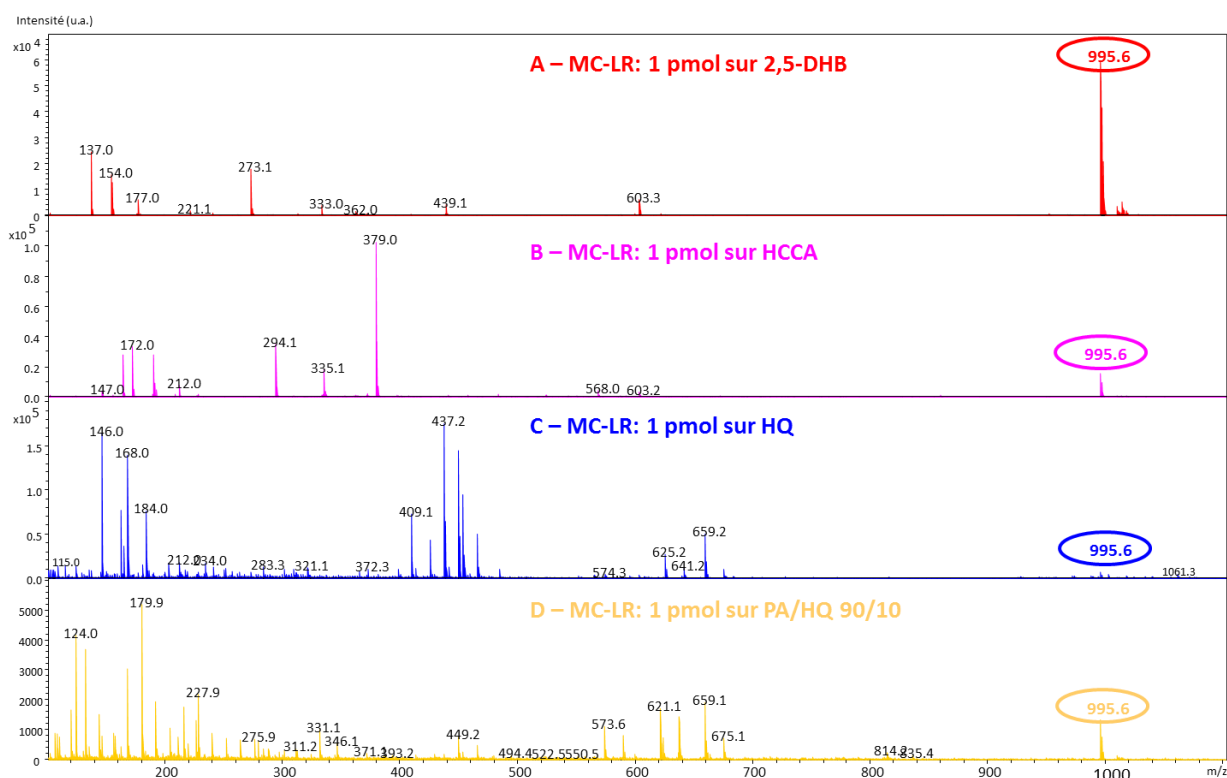


Figure 3 : Spectres de la microcystine LR co-cristallisée avec les matrices MALDI 2,5-DHB (A), HCCA (B), HQ (C) et PA/HQ 90/10 (D) et analysée au seuil d'ionisation relatif à chaque matrice

En travaillant au seuil d'ionisation de la toxine, pour chaque matrice, on peut apprécier qualitativement les matrices ayant un bon rendement pour l'ionisation de la microcystine LR. Ainsi, comme illustré sur les spectres, la matrice 2,5-DHB est celle qui offre le meilleur rapport signal sur bruit (S/N) puisque la microcystine LR est, au seuil, le pic de base du spectre MS. Les résultats sur les matrices HQ et PA/HQ 90/10 sont plus décevants, tant en termes de rapport S/N qu'en termes d'interférences aux faibles masses moléculaires. Ce comportement de la 2,5-DHB peut en partie s'expliquer par la présence de « hot spots » au sein des cristaux, qui concentrent l'analyte et se traduisent, lors de l'ionisation, par un spectre au rapport S/N très élevé. En outre, le pKa de la matrice joue également un rôle dans l'efficacité d'ionisation. L'HCCA est en général la matrice de choix pour l'analyse de peptides et petites protéines, cependant le spectre obtenu est plus riche en interférences dans la zone [100-400 Da].

### **3.2.2 Quantification**

L'une des problématiques de l'utilisation d'un spectromètre de masse MALDI-TOF-MS, avec les matrices conventionnelles, est la difficulté d'obtenir une quantification, en raison principalement d'un manque de reproductibilité des dépôts. Nous avons évalué les possibilités de quantification d'une cyanotoxine, la nodularine, par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS. La construction de courbes d'étalonnage a été entreprise, en modifiant plusieurs conditions. La linéarité a été estimée via les coefficients de détermination des droites de régression linéaire.

Par ailleurs, pour corriger les fluctuations d'un spectromètre de masse lors d'une analyse, il est d'usage courant d'intégrer un standard interne (SI) à l'échantillon analysé. Celui-ci doit être une molécule non présente naturellement dans l'échantillon, avec une structure similaire à l'analyte d'intérêt (car il doit refléter le comportement de l'ion recherché). Ce standard est alors ajouté en quantité constante dans tous les échantillons et, une fois l'analyse effectuée, les résultats peuvent être exprimés en termes de rapports des aires.

Nous avons effectué les différentes manipulations avec et sans standard interne, sur deux matrices dans un premier temps (2,5-DHB et HCCA). Nous avons également choisi de modifier le standard interne afin de pouvoir estimer l'importance d'une similarité de structure. La toxine choisie est la nodularine.

Parmi les standards internes évalués, la réserpine est une petite molécule organique fréquemment utilisée lors de la mise au point de spectromètres de masse tant son ionisation est bonne, tant en ESI qu'en MALDI. Nous avons également testé la leucine encéphaline qui est un petit peptide linéaire. En vue d'approcher au maximum le comportement des toxines, nous avons évalué la microcystine LR (dans un échantillon exempt de microcystine bien entendu), car sa structure peptidique cyclique suggère un comportement similaire à la toxine nodularine et donc nous pouvions supposer une bonne efficacité en tant que standard interne.

La linéarité de signal des toxines choisies pour l'évaluation de chaque standard interne (ou mélange de standards internes) a ainsi été estimée, par

construction de courbes sur minimum huit points. Chaque courbe a été construite sur base des aires, avec et sans le standard interne.

### 3.2.2.1 Préparation d'échantillon

La nodularine est préparée à une concentration de 1.2  $\mu\text{M}$  en solution dans un mélange ACN:H<sub>2</sub>O:TFA 0.1 % (2:1).

Chaque solution de point de courbe a été dopée par une concentration constante de standard interne, à savoir la réserpine, la leucine encéphaline ou la microcystine LR.

Les standards internes ont été ajoutés à chaque solution de point de courbe, à la concentration constante et arbitraire de 0.5  $\mu\text{M}$ . Cette valeur de concentration a été choisie afin d'être équivalente à la valeur de la concentration de l'analyte au point milieu de la courbe d'étalonnage, celle-ci s'échelonnant de [0-1]  $\mu\text{M}$ .

Les solutions de points de courbe ont ensuite été préparées par dilution de la solution mère de nodularine (incluant l'ajout des solutions de standard interne). Les concentrations finales, par pas de 0.1, sont comprises entre 0 et 1  $\mu\text{M}$  en solution dans ACN:H<sub>2</sub>O:TFA 0.1 % (2:1).

S'agissant d'un test préliminaire, afin de s'affranchir de tout risque d'interférences, chaque standard interne a été ajouté pur aux solutions de points de courbe – donnant d'office lieu à trois courbes par matrice MALDI.

Les matrices évaluées sont le 2,5-DHB et l'HCCA, chacune à la concentration de 25 mM en solution dans ACN:H<sub>2</sub>O:TFA 0.1 % (2:1) et préparées par dissolution d'une masse adéquate de poudre.

Les dépôts ont été réalisés sur une plaque AnchorChip™ 600  $\mu\text{m}$ . Après dépôt de 1  $\mu\text{L}$  de matrice et évaporation du solvant, 1  $\mu\text{L}$  de la solution de point de courbe était déposée.

Afin de se placer dans des conditions permettant une comparaison fiable, tous les spectres sont constitués de 2000 tirs LASER enregistrés en mode réflectron positif, à la puissance LASER seuil du premier point de courbe (0.1  $\mu\text{M}$ ).

### 3.2.2.2 Résultats et discussion

La Figure 4 présente les structures chimiques des trois molécules choisies en tant que standards internes – à savoir la réserpine, la leucine encéphaline et la microcystine LR ainsi que de la toxine choisie comme analyte test, c'est-à-dire la nodularine.

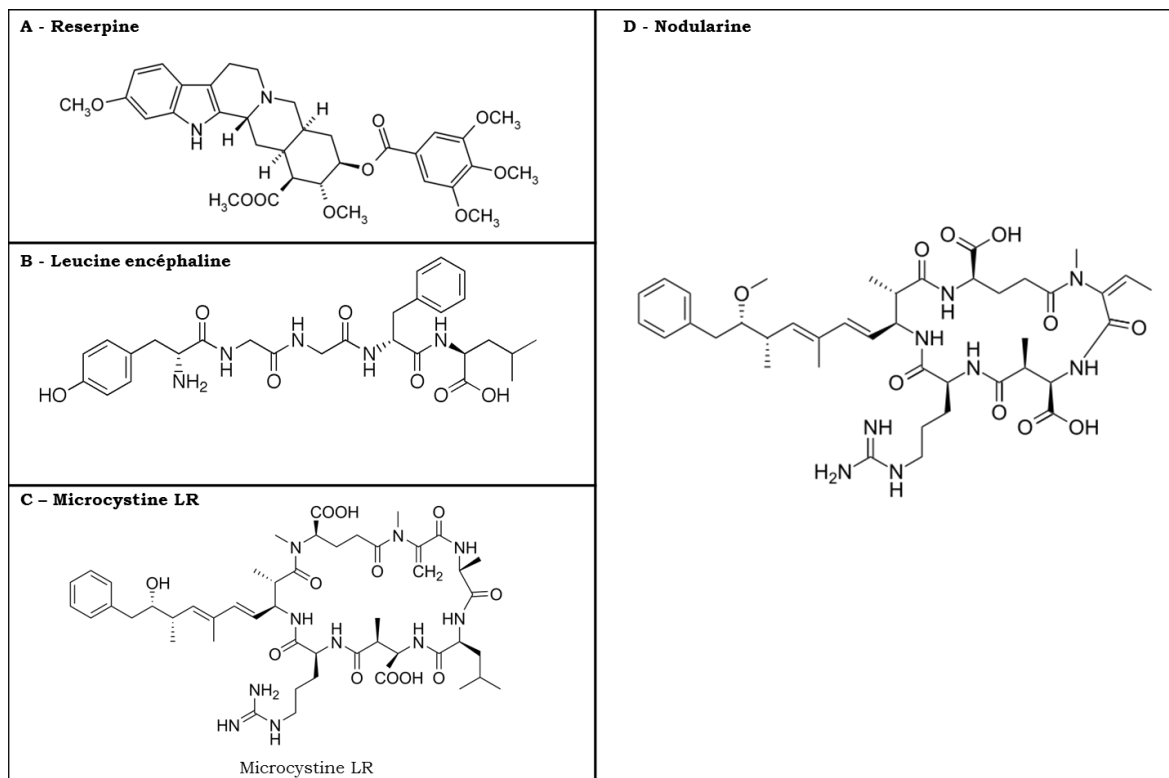


Figure 4 : Structures chimiques des molécules évaluées en tant que standards interne : la réserpine (A), la leucine encéphaline (B) et la microcystine LR (C) et de l'analyte test, la nodularine (D)

Les courbes d'étalonnage sont tracées en portant en graphique la concentration de chaque solution de point de courbe en fonction, soit de l'aire absolue du pic de chaque solution de point courbe, soit de l'aire relative corrigée par le standard. Les aires relatives sont calculées en effectuant le rapport de l'aire d'un point de courbe à l'aire du standard, mesurées dans le même spectre de masse.

La Figure 5 illustre les courbes d'étalonnages obtenues dans le cas d'une correction par le standard interne, c'est-à-dire en portant en graphique les aires relatives corrigées par le signal de chaque standard, en fonction de la concentration de la nodularine, enregistrés à l'aide des matrices 2,5-DHB et HCCA. Les valeurs des aires relatives sont très variables. Dans notre cas, ces valeurs varient grosso modo entre 0.5 et 200, or, en chimie analytique, l'effet d'un standard interne et l'utilisation du concept de ratios sont optimaux lorsque ce rapport tend vers 1. La valeur la plus proche de 1 est atteinte lorsque le standard a une structure chimique proche de celle de l'analyte (cas du standard de la microcystine LR par rapport à l'analyte nodularine).

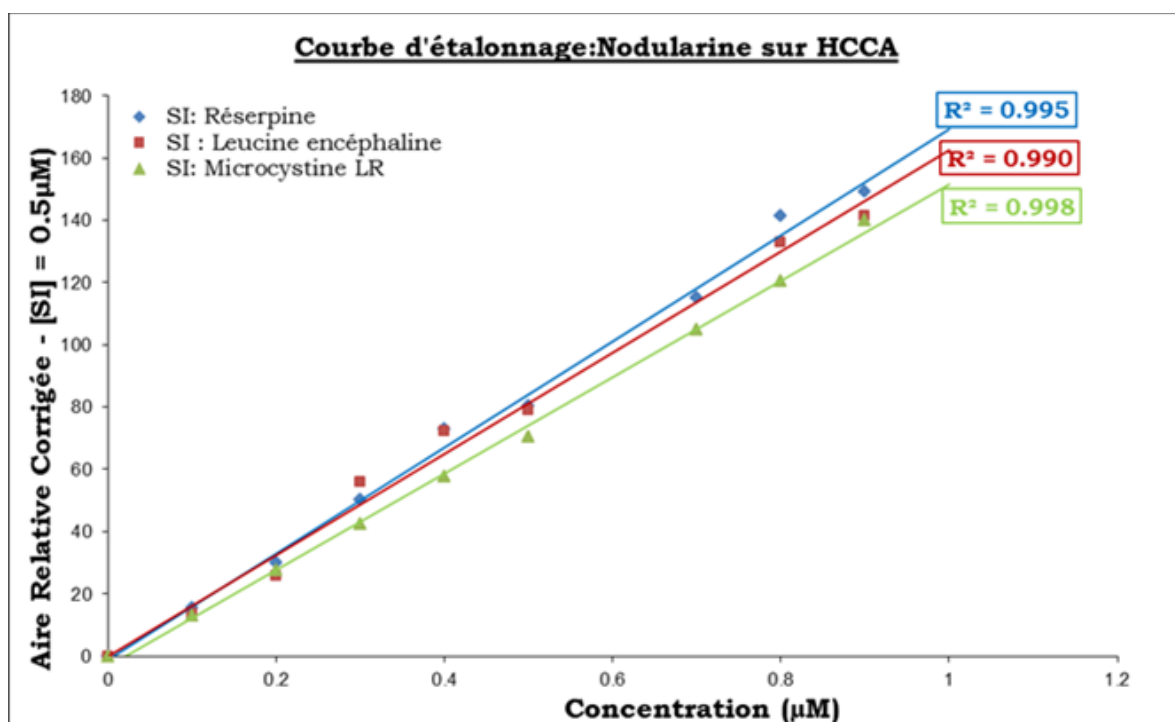
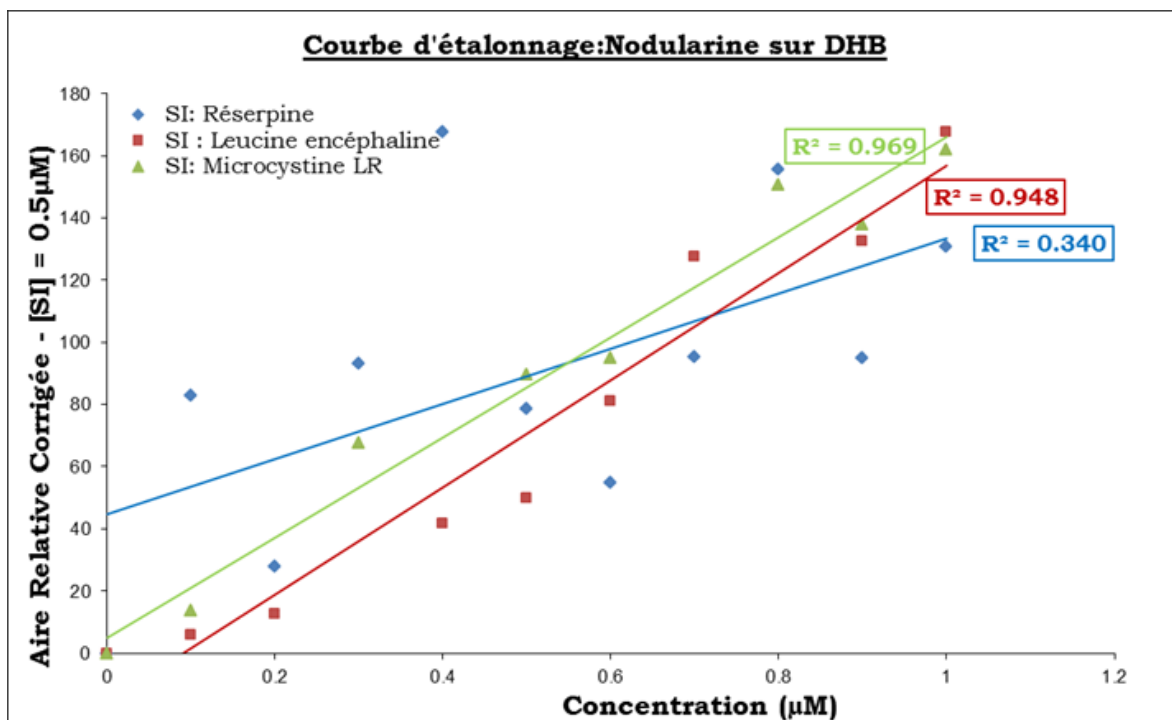


Figure 5 : Courbes d'étalonnage pour la nodularine en MALDI-TOF-MS à l'aide des matrices 2,5-DHB (Haut) et HCCA (Bas) et en fonction du standard interne (Bleu : Réserpine, Rouge : Leucine Encéphaline, Vert : MC-LR)

Le Tableau 1 reprend les divers coefficients de détermination calculés par construction des courbes et régression linéaire. La linéarité de la courbe est maximale lorsque le coefficient de détermination  $R^2$  a la valeur de 1.

Tableau 1 : Coefficients de détermination des courbes d'étalonnage pour la quantification de la nodularine par MALDI-TOF-MS, calculés sur base des aires absolues et relatives (corrigées par rapport aux standards internes réserpine, leucine encéphaline ou microcystine LR) et enregistrés dans les matrices 2,5-DHB et HCCA

Analyte	Matrice	R <sup>2</sup> Aires absolues	Standard interne 0,5 µM	R <sup>2</sup> Aires relatives
<b>Nodularine</b> [0-1] µM	2,5-DHB	0,46	Réserpine	0,34
	HCCA	0,33		0,99
	2,5-DHB	0,25	Leucine encéphaline	0,95
	HCCA	0,94		0,99
	2,5-DHB	0,03	Microcystine LR	0,97
	HCCA	0,27		0,99

Les courbes d'étalonnage, tracées sur base des aires absolues, présentent des coefficients de détermination très éloignés de la valeur cible de 1, à l'exception d'une courbe tracée grâce aux signaux enregistrés par MALDI-TOF avec l'HCCA. En outre, la variabilité des coefficients de détermination est très grande. En effet, dans le cas de l'analyse à l'aide de la matrice 2,5-DHB, les R<sup>2</sup> varient entre [0.03-0.46] tandis qu'ils varient entre [0.27-0.94] lors de l'analyse avec la matrice HCCA. Tant les valeurs très faibles des coefficients de détermination, que leur variabilité pour un même analyte, ionisé dans la même matrice, nous permettent de conclure que la quantification absolue n'est pas envisageable dans ces conditions expérimentales.

L'analyse des coefficients de détermination des courbes d'étalonnages construites sur base des aires relatives corrigées montre quant à elle que quel que soit le standard interne utilisé, la matrice HCCA permet d'obtenir la meilleure linéarité (R<sup>2</sup> = 0.99 pour les trois standards internes). La quantification relative, évaluée dans la matrice 2,5-DHB, apparaît plus sensible à la similarité de structure du standard interne par rapport à l'analyte.

A la lecture de ce tableau, il apparaît donc clairement que l'utilisation d'un standard interne en MALDI, en vue d'une quantification, est indispensable tant l'effet sur la linéarité de réponse est marqué. D'autre part, ce premier test nous permet de confirmer ce dont nous pouvions nous douter, à savoir que la linéarité sur la matrice DHB est plus difficile à atteindre, en raison de la cristallisation inhomogène du dépôt MALDI. La matrice HCCA, quant à elle, présente globalement de très bons coefficients de détermination, quel que soit le standard interne utilisé.

### 3.2.3 Conclusion

Les matrices conventionnelles confirment leur polyvalence en termes d'ionisation des analytes évalués. Toutefois, elles ne permettent pas de résoudre la

problématique de l'analyse de composés de faibles masses moléculaires en raison de la présence d'interférences dans le spectre aux masses inférieures à 500 Da.

Les points suivants présentent les résultats obtenus lors de l'évaluation de matrices alternatives dont la caractéristique commune est l'applicabilité aux composés de faible masse moléculaire.

## 4. MATRICES ALTERNATIVES

### 4.1 Matrices à haut poids moléculaire

#### 4.1.1 Introduction

Une des alternatives à l'utilisation de matrices MALDI conventionnelles est l'exploitation de matrices à haut poids moléculaire, ne présentant pas d'interférences en masse avec les analytes d'intérêt.

Les porphyrines sont des macrocycles constitués de quatre unités pyridiques et reliées entre elles par des ponts méthylène (Figure 6). En raison de leur taille ainsi que de leurs propriétés physiques intéressantes (macrocycles conjugués présentant une absorption UV), elles ont fréquemment été mentionnées dans la littérature<sup>112,114</sup>.

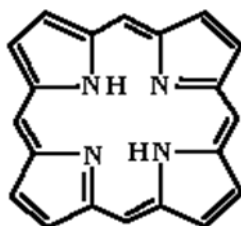


Figure 6 : Structure générale d'une porphyrine

Dans un premier temps, le groupe de Lindsey a souligné la possibilité que ces macrocycles agissent en tant qu'auto-matrices. Ayorinde et ses collaborateurs ont ensuite développé cette idée et constaté que certaines porphyrines présentaient un comportement excellent en tant que matrice MALDI<sup>112,115</sup>.

D'après ces auteurs, ces porphyrines ne produisent pas d'interférences dans la faible gamme de masse et permettraient une ionisation efficace d'une large variété de petites molécules.

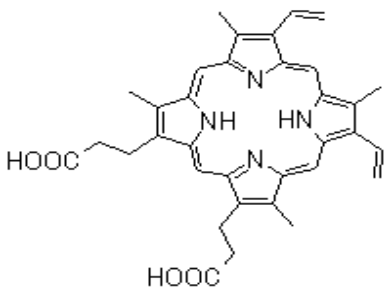
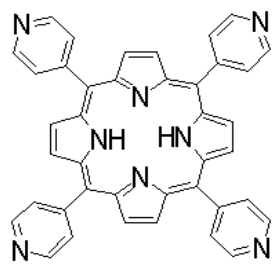
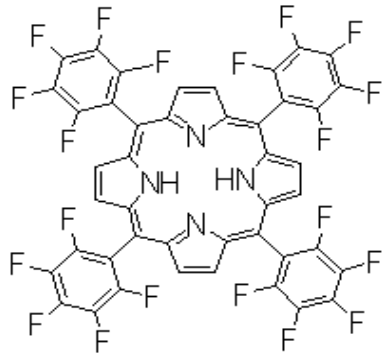
Nous avons décidé d'évaluer la capacité d'ionisation de ces porphyrines, pour nos analytes tests.

## 4.1.2 Matériel et méthodes

### 4.1.2.1 Matériel

Trois matrices porphyrines ont été choisies sur base de résultats publiés dans la littérature ainsi que sur base de ce qui était commercialement accessible lors de la réalisation de cette expérience. Il s'agit des molécules présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Structure, formule brute et masse moléculaire des porphyrines testées

Nom de la matrice porphyrine	Masse moléculaire moyenne (Da)	Formule chimique	Structure
<i>Protoporphyrin IX</i>	562,66	C <sub>34</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	
<i>5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)porphyrin</i>	618,69	C <sub>40</sub> H <sub>26</sub> N <sub>8</sub>	
<i>5,10,15,20-Tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin</i>	974,55	C <sub>44</sub> H <sub>10</sub> F <sub>20</sub> N <sub>4</sub>	

Il est à noter que, les porphyrines n'étant pas acides, l'ionisation de l'analyte a été réalisée via la formation d'adduits de cation métallique. Dans notre cas, après évaluation des iodures de lithium (LiI) et de sodium (NaI), le sel choisi fut LiI.

De même, mentionnons directement que les deux premières matrices n'ont permis l'ionisation d'aucune des molécules testées et qu'elles ont dès lors rapidement été écartées.

#### 4.1.2.2 Préparation d'échantillon

Deux modes de dépôt ont été évalués en préliminaire à toute manipulation, à savoir le dépôt en goutte séchée, dans sa variante consistant au mélange de la matrice avec l'échantillon avant dépôt et le dépôt en couche mince, simple ou recristallisée<sup>112,114</sup>.

Il s'est rapidement avéré que le dépôt en couche mince simple était, dans le cas de ces matrices porphyrines, le plus adéquat.

La matrice porphyrine a ainsi été préparée à une concentration de 20 mg/mL dans l'acétone, additionnée de 20 mM de LiI. La matrice a été déposée en couche mince, sur une plaque MALDI de type AnchorChip™ 600 μM (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne).

Les analytes ont été ensuite déposés sur les matrices porphyrines. Afin de s'affranchir de tout problème de signal, et pour effectuer l'évaluation dans les meilleures conditions possible, chaque toxine est déposée en quatre exemplaires.

D'autre part, des échantillons « blancs » sont également préparés. Il s'agit de deux types de blancs, l'un étant constitué de la matrice seule, l'autre constitué de solvant sans analyte dans EtOH/H<sub>2</sub>O (50 :50).

#### 4.1.3 Résultats et discussion

Les capacités d'ionisation des trois types de porphyrines ont été évaluées sur les cinq analytes tests de masses moléculaires et structures différentes. Seule la 5,10,15,20-Tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrine – F20TPP<sup>-</sup> a conduit à des résultats exploitables. Cette matrice n'étant pas acide, l'ionisation de l'analyte devait s'effectuer par formation d'un adduit de cation métallique. Selon la littérature, le cation le plus adéquat était Li<sup>+</sup>. Nous avons donc réalisé les expériences avec un sel de lithium additionné à la solution de matrice porphyrine.

Parmi les trois toxines testées, seule une cyanotoxine a pu être détectée : la nodularine, sous la forme [M+H]<sup>+</sup>.

L'enregistrement de spectres de matrice a également permis de constater la présence de nombreux fragments matriciels, potentiellement gênants. Ainsi, bien que la nodularine soit ionisée, sous la forme [M+H]<sup>+</sup>, nous observons la présence de nombreux signaux de masse provenant de la matrice, dans la gamme de masse de cette toxine (820-830). Sur la Figure 7, seuls les pics mis en évidence correspondent à la nodularine. Le reste du massif est observé pour tous les dépôts réalisés sur la matrice F20TPP.

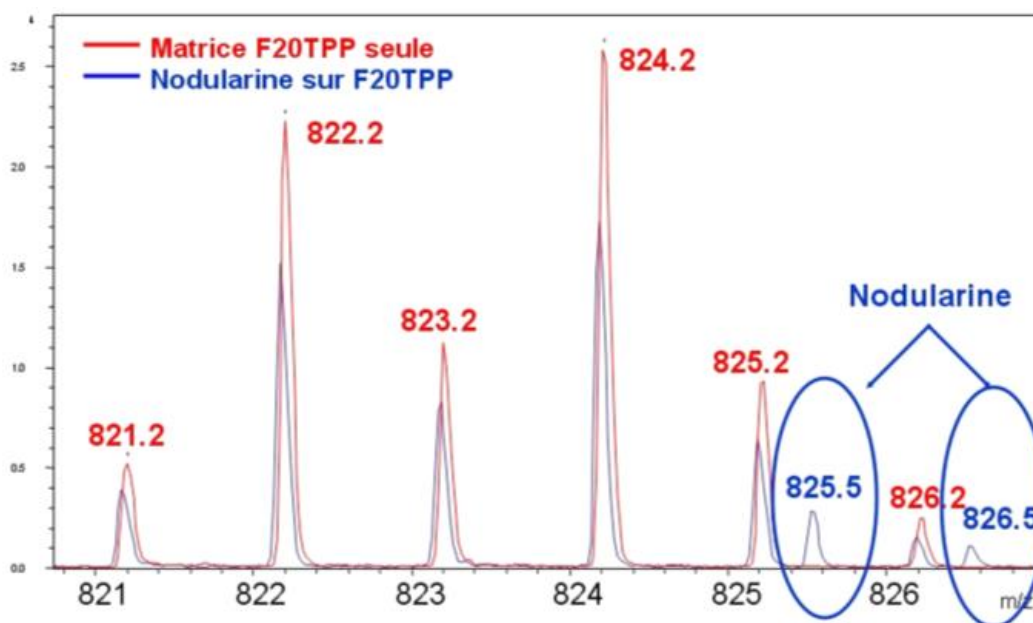


Figure 7 : Agrandissement du spectre de la nodularine sur matrice F20TPP et de la matrice F20TPP seule

#### 4.1.4 Conclusion

Bien qu'ayant évalué de nombreuses conditions expérimentales (type de dépôt, solvants, ordre de dépôt, agent cationisant, etc) nous n'avons, à l'exception du cas de la nodularine, pas pu observer d'ionisation des analytes tests avec ces matrices à haut poids moléculaire.

En conclusion, les matrices porphyrines ne constituent pas une bonne alternative aux matrices conventionnelles lors de l'analyse des molécules nous concernant, à savoir les cyanotoxines microcystine LR, la nodularine ou la cylindrospermopsine.

## **4.2 Matrices « transparentes »**

### **4.2.1 Introduction**

Dans le cadre de l'obtention de spectres MALDI exempts d'interférences en masse avec les analytes d'intérêt, nous avons souhaité évaluer les matrices dites « transparentes en masse ». Ces matrices sont en réalité des sels, de type  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ou  $\text{NaNO}_3$  se décomposant en petites molécules neutres lors de l'impact LASER. N'étant pas ionisées, elles ne sont dès lors pas détectées dans le spectre de masse et n'interfèrent pas avec les analytes.

Ces matrices ont, en première application, été exploitées au sein du laboratoire dans le cadre de la mesure de la température interne des ions<sup>113</sup>. En effet, les ions « thermomètres » utilisés pour mesurer l'énergie interne des ions lors du processus MALDI présentaient de faibles masses moléculaires, rendant difficile l'interprétation de spectres obtenus par ionisation avec les matrices MALDI conventionnelles. Les matrices transparentes ont dès lors été utilisées afin de circonvenir au problème d'interférences en masse.

S'appuyant sur ces résultats, nous avons souhaité exploiter ces sels en tant que matrices MALDI, pour l'ionisation de nos analytes. Afin d'augmenter les chances d'obtenir une bonne ionisation, un agent cationisant a été ajouté aux matrices (de type  $\text{AgNO}_3$ ).

### **4.2.2 Matériel et méthodes**

#### *4.2.2.1 Matériel*

##### *4.2.2.1.1 Solutions de matrices*

Afin d'évaluer un maximum de conditions, ces deux matrices transparentes ont chacune, sur base en première approche de la publication de Greisch *et al.*, été préparées à une concentration de 25 mg/mL.

Les solvants ont été de deux types, l'un constitué du mélange 50:50 ACN : Eau et l'autre, du mélange 50/50 ACN : TFA 0.1 %.

A chaque solution de matrice, trois concentrations différentes de l'agent cationisant ont été ajoutées.

Les 12 combinaisons de solutions préparées sont résumées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Combinaisons de solutions de matrices transparentes

NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 2.25 mg/mL ACN/H <sub>2</sub> O 25/75	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 2.25 mg/mL ACN/TFA 0.03 % 25/75	NaNO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 2.25 mg/mL ACN/H <sub>2</sub> O 25/75	NaNO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 2.25 mg/mL ACN/TFA 0.03 % 25/75
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 22.5 mg/mL ACN/H <sub>2</sub> O 25/75	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 22.5 mg/mL ACN/TFA 0.03 % 25/75	NaNO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 22.5 mg/mL ACN/H <sub>2</sub> O 25/75	NaNO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 22.5 mg/mL ACN/TFA 0.03 % 25/75
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 225 mg/mL ACN/H <sub>2</sub> O 25/75	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 225 mg/mL ACN/TFA 0.03 % 25/75	NaNO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 225 mg/mL ACN/H <sub>2</sub> O 25/75	NaNO <sub>3</sub> 12.5 mg/mL AgNO <sub>3</sub> 225 mg/mL ACN/TFA 0.03 % 25/75

#### 4.2.2.1.2 Solutions de toxines

Chacune des toxines a été déposée, seule, sur les douze combinaisons de matrices mentionnées ci-avant. Les toxines étaient en solution dans l'acétonitrile et à une concentration de 1 µg/mL.

#### 4.2.3 **Résultats et discussion**

Nous avons testé les matrices Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, avec et sans agent cationisant, en conditions acides et neutres, sur les trois toxines disponibles au moment du test, à savoir les mycotoxines aflatoxine B1 et patuline et la cyanotoxine cylindrospermopsine.

En dépit de toutes les variations du protocole, aucune des toxines n'a pu être ionisée par ces matrices. Bien que l'intensité LASER ait été augmentée au maximum, l'ionisation des analytes n'a, dans aucun cas, pu être réalisée. Seuls les ions Na<sup>+</sup> et Ag<sup>+</sup> présentaient une intensité très importante dans le spectre.

#### 4.2.4 **Conclusion**

En conclusion, appliquées à l'analyse des trois analytes susmentionnés, les matrices transparentes n'ont pu démontrer leur efficacité d'ionisation. Nous noterons que ceci ne dévalue pas leur efficacité annexe mais simplement, en ce qui concerne les toxines dont cette thèse traite, les matrices transparentes n'ont pas été d'efficaces alternatives aux matrices conventionnelles.

## 4.3 Ionisation DIOS

### 4.3.1 Introduction

Le DIOS (Desorption Ionisation on Silicon) est une technique d'ionisation « sans matrice », développée par Suizdak *et al.*, en 1999<sup>116</sup>. Dans cette technique, l'analyte est déposé sur une surface de silicium rendu poreux par un traitement d'etching et ionisé par impact LASER.

Le mécanisme d'ionisation est encore actuellement incertain, mais s'il est un paramètre qui est indispensable, c'est la porosité du silicium, ainsi que la taille des pores. En effet, l'équipe de Gary Suizdak propose que la surface poreuse du silicium « piège » les analytes. Ensuite, grâce à sa grande capacité d'absorption en UV, le support de silicium poreux agirait en tant que réceptacle et transmetteur de l'énergie des radiations LASER<sup>7</sup>.

L'avantage très important de ce système est qu'aucune matrice n'est nécessaire. Le DIOS rend donc possible l'analyse de petites molécules.

De nombreux groupes exploitant l'ionisation DIOS utilisaient des plaques « home made », cependant, l'équipement nécessaire à cette fin n'étant pas aisément disponible au sein du département, nous avons opté pour l'achat d'une plaque commerciale (Waters, MassPREP™ DIOS Target Plate) permettant d'évaluer le DIOS sur nos toxines.

### 4.3.2 Matériel et méthodes

#### 4.3.2.1 Préparation d'échantillon et paramètres MS

La plaque MassPREP™ DIOS n'était pas adaptée à une analyse directe au sein de l'Ultraflex de Bruker. En effet, la plaque DIOS Waters est une plaque 96 spots, là où nous travaillons conventionnellement avec des plaques de 384 dépôts chez Bruker. Nous avons dès lors fabriqué un adaptateur.

Afin de ne pas modifier les temps de vol des ions, nous avons réalisé un adaptateur pour notre plaque DIOS, en découpant un rectangle de la taille de cette dernière dans une plaque présrottée (Prespotted AnchorChip™ - PAC, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Notre montage était tel que la plaque DIOS était incluse dans la plaque PAC™ découpée, sans différence de niveau entre les deux supports.

La plaque PAC™ « adaptée » était ensuite glissée dans le support ad hoc (Bruker), puis inséré dans la source MALDI.

Nous avons déposé un volume de 0,5 µL de chaque solution, en accord avec la procédure recommandée par Waters. Les solutions déposées et analysées en DIOS sont :

- Le mélange de calibrant MassPREP™ Calibration Mix – dilué 10X dans une solution ACN : Eau 50 : 50

- Un mélange des cinq toxines (Meltox 5) : aflatoxine B1 (0.2 µg/mL), patuline (1 µg/mL), cylindrospermopsine (10 µg/mL), microcystine LR (1 µg/mL) et nodularine (10 µg/mL) en solution dans 50 :50 Eau : Solvants organiques (acétonitrile, éthanol, méthanol, chloroforme). Il est à noter que nous avons préféré travailler avec les solvants dans lesquels les solutions mères de toxines nous étaient fournies, d'où ce mélange « improbable » de solvants organiques, plutôt que d'évaporer les solvants des différentes toxines en raison de risques de dégradation lors de l'évaporation.
- Une solution de réserpine (RSP), utilisée fréquemment au laboratoire pour ses capacités reconnues d'ionisation. La solution était de concentration 6 µg/mL en solution ACN : Eau 50 : 50.

Tous les spectres sont enregistrés en mode réflectron positif et à la puissance LASER seuil permettant l'ionisation de tous les analytes d'intérêt.

### **4.3.3 Résultats et discussion**

La littérature était, au moment des premiers essais en août 2006, très encourageante<sup>117-125</sup>, cependant, les résultats obtenus ont été peu concluants. En effet, le mélange de calibrants, pourtant fourni avec la plaque, n'a pu être détecté qu'au prix d'impacts LASER très intenses.

La Figure 8 présente le spectre DIOS de la solution de calibrants (PEG+Na<sup>+</sup> et PEG+Rb<sup>+</sup>). Il est important de souligner que les spectres comparés ne sont pas à la même échelle. En effet, le seuil d'ionisation des calibrants à l'aide du DIOS a été atteint pour des puissances LASER beaucoup plus élevées que pour l'ionisation des calibrants avec la matrice HCCA. L'intensité absolue des ions dans le spectre DIOS est donc d'un ordre de grandeur supérieure à celle observée pour le spectre MALDI obtenu avec la matrice HCCA. Par ailleurs, l'ionisation des calibrants était incomplète lors de l'utilisation du système DIOS, avec pour conséquence un étalonnage imparfait de la gamme de masse d'intérêt.

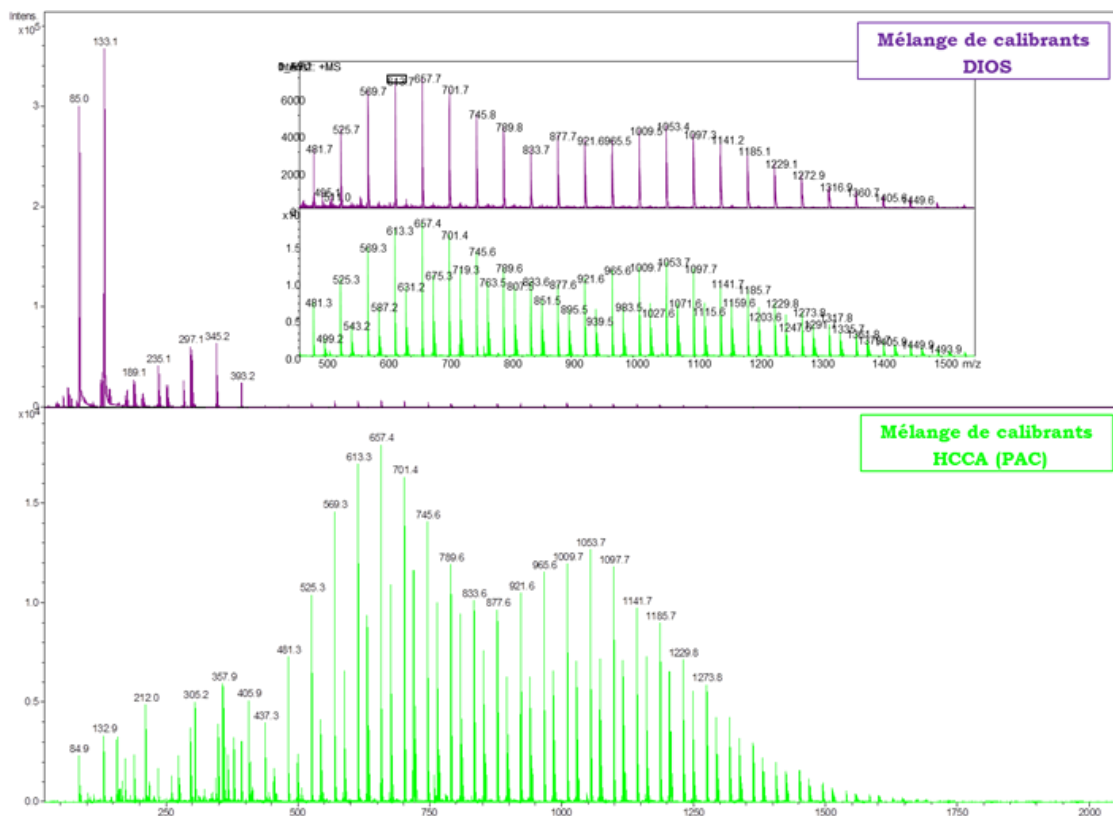


Figure 8 : Spectres TOF-MS du mélange de calibrants « PEG+Na<sup>+</sup> et PEG+Rb<sup>+</sup> » enregistrés par DIOS-TOF-MS (haut) et MALDI-TOF-MS sur une plaque préséptée PAC<sup>TM</sup> (bas)

Une vérification sur les matrices conventionnelles, à savoir la 2,5-DHB et la matrice HCCA, a permis de constater que le mélange de calibrant était complet, et que les résultats incomplets obtenus en DIOS ne lui étaient pas imputables.

L'ionisation des calibrants étant toutefois réalisée, la molécule 'test' de réserpine est déposée sur le support et le spectre, enregistré. Celui-ci, présenté dans la Figure 9, permet de constater que la réserpine (MM 609.267 g/mol) est ionisée. Néanmoins, ainsi qu'il est possible de le voir directement sur le spectre, le bruit de fond est très important (car la puissance LASER est élevée) et par ailleurs, de nombreux pics, non attribuables à la réserpine, sont présents aux m/z inférieurs à 400 Da. Enfin, ainsi que la Figure 9 le montre, le pouvoir de résolution obtenu, lors de l'ionisation de la réserpine à l'aide du DIOS-TOF-MS, est faible (inférieure à 4000) et peut avoir un impact direct sur la spécificité de l'analyse, puisque deux masses très proches risquent de ne pas être résolues, et risquent donc également de ne pas être détectées.

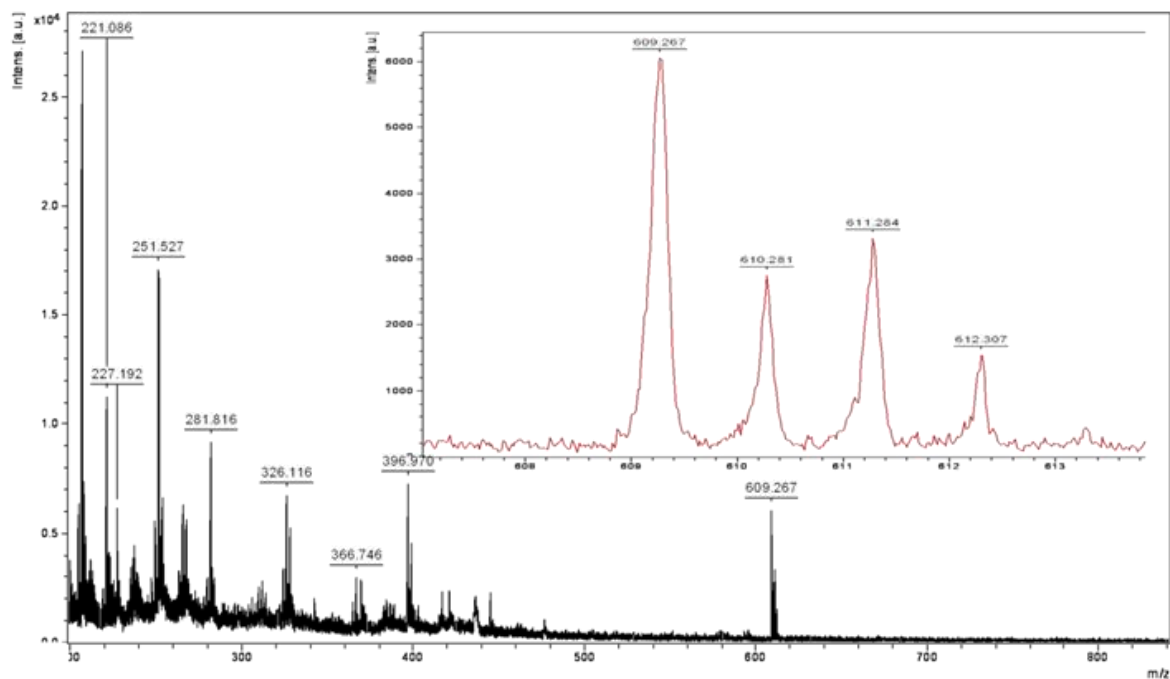


Figure 9 : Spectre DIOS de la réserpine (6  $\mu\text{g/mL}$  dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  50/50)

Enfin, une solution de mélange des cinq toxines est testée. En dépit de tentatives dans différents solvants, en présence ou absence d'acide, d'agent cationisant  $\text{Li}^+$ , en concentrant ou diluant la solution de mélange, aucune ionisation n'a pu être observée pour l'ensemble des toxines constituant le mélange.

La Figure 10 met en évidence le fait que notre mélange de toxines n'était pas en cause puisqu'il a pu être ionisé avec des matrices « classiques » (matrice HCCA prédéposée – Prespotted AnchorChip™ (PAC), Bruker Daltonics).

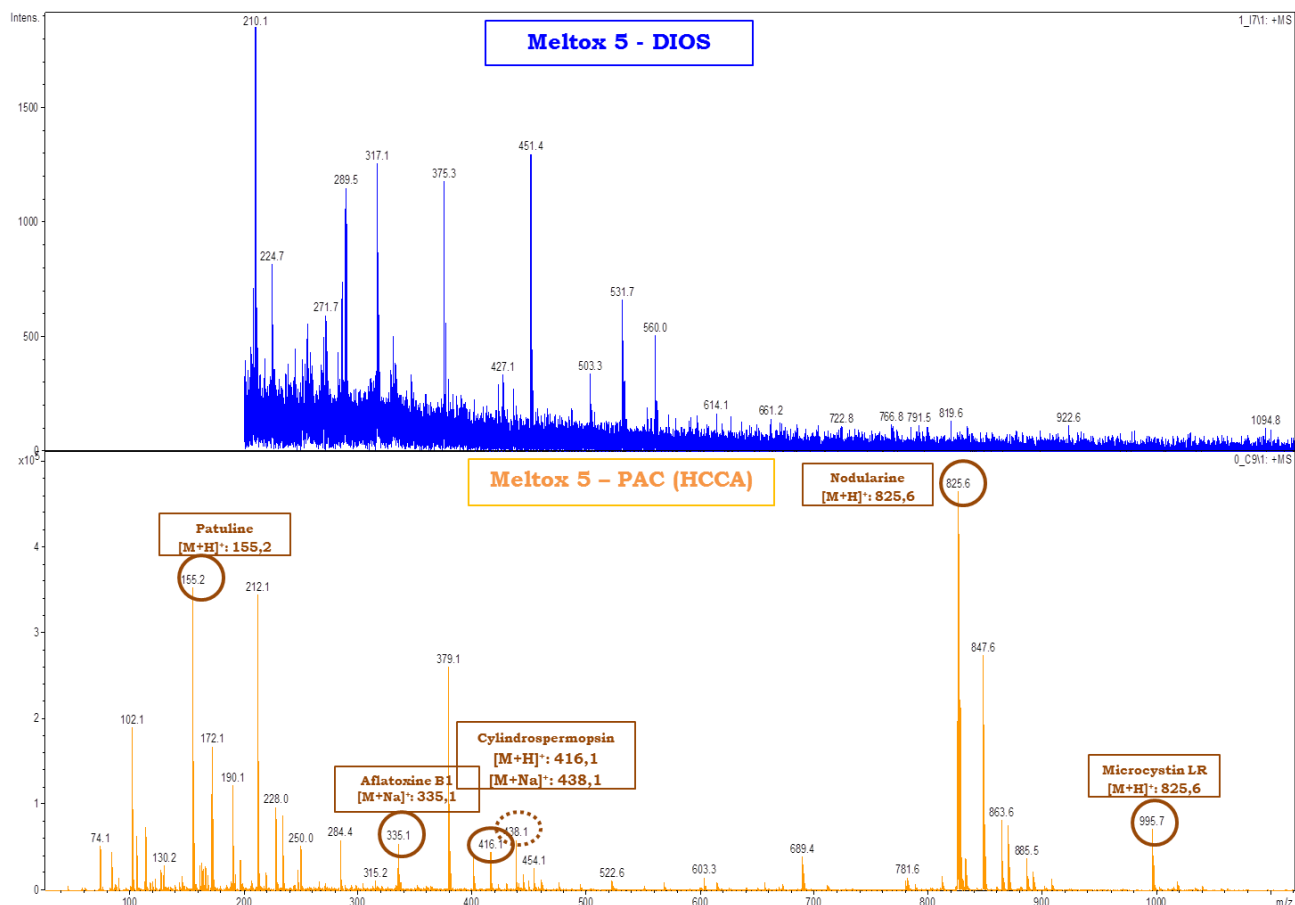


Figure 10 : Mélange de cinq toxines MELTOX5 analysées par DIOS vs matrice HCCA (sur plaque préséptée PAC<sup>TM</sup> Bruker Daltonics)

En dépit de toutes les variations de protocole, nous n'avons pu obtenir l'ionisation de nos toxines. Bien que la réserpine, et le mélange de calibrants, aient pu être ionisés, les intensités LASER mises en œuvre sont tellement importantes qu'on ne pourrait s'affranchir de problèmes annexes tels qu'une diminution de résolution et une augmentation du bruit.

#### 4.3.4 Conclusion

L'ionisation par DIOS n'a pas tenu ses promesses dans notre cas. Notons enfin qu'à l'heure d'écrire ces lignes, une revue de la littérature récente nous permet de conclure que nous n'avons pas été les seuls à rencontrer de telles difficultés avec le concept DIOS. En effet, à l'exception de publications anecdotiques, principalement pour l'analyse de polymères<sup>126-129</sup>, aucun groupe n'a récemment publié de résultats exploitant le DIOS tel que nous l'avons testé.

## **4.4 Matrices inorganiques**

### **4.4.1 Introduction**

Notre revue de littérature nous a appris que certains auteurs avaient utilisé, avec succès, les matrices inorganiques de type oxydes métalliques ou fines particules métalliques<sup>14</sup>. Ces matrices étaient, selon le cas, utilisées telles quelles ou en suspension dans un liquide peu volatil tel que le glycérol par exemple. Écartées dans un premier temps, car l'utilisation de matrices liquides pures nécessitait à priori une mise en œuvre risquée en termes de contamination de la source MALDI, nous avons en cours de thèse eu l'occasion de vérifier une publication plus récente, exploitant le dioxyde de titane sous sa forme cristallographique anatase<sup>130</sup>. Ces travaux, s'ils utilisaient bien une matrice inorganique, le faisaient en absence de liquide et promettaient une ionisation efficace de composés de faible masse moléculaire et ce, sans interférence dans la gamme de masse cible.

Nous décrivons donc dans ce point, les essais réalisés sur la matrice inorganique TiO<sub>2</sub>.

### **4.4.2 Matériel et méthodes**

#### *4.4.2.1 Préparation d'échantillon et paramètres MS*

La solution de matrice TiO<sub>2</sub> a été préparée comme décrit dans la publication de Castro, à la concentration de 10 mg/mL dans de l'eau désionisée.

Les toxines utilisées pour ce test sont la cylindrospermopsine, la saxitoxine, la néosaxitoxine, la nodularine et les microcystines LR, RR et YR. Nous avons utilisé un mélange de ces sept analytes, en solution dans du MeOH/H<sub>2</sub>O (2 :1), chacun à la concentration de 0.8 µM, sauf la microcystine YR qui était à la concentration de 0.4 µM.

Deux types de dépôt en goutte séchée ont été réalisés. Le premier s'inspirant de la publication de l'équipe de Castro a constitué en au mélange préalable de la solution de matrice avec la solution de toxines suivi du dépôt de 2 µL de ce mélange. Pour la seconde méthode, un volume de 1 µL de solution de TiO<sub>2</sub> a été déposé, et après cristallisation de la matrice, la solution d'analytes a été déposé (1µL).

Chaque dépôt a été réalisé en triplicat.

### **4.4.3 Résultats et discussion**

La calibration n'a pu être effectuée qu'au prix de tirs LASER très intenses et uniquement sur les différents adduits de PEG composant le mélange de calibrants, les peptides n'étant à aucun moment – et quelle que soit la puissance LASER - ionisés par la matrice TiO<sub>2</sub>.

Deux types de dépôts ont été réalisés – l'un en mélangeant préalablement la matrice et la solution de toxines – technique préconisée par les auteurs de la publication référente dans le cadre de cette manipulation, et l'autre en dépôt classique, matrice puis analytes. Les auteurs de l'article ont également rapporté que l'espèce formée préférentiellement, lors d'une ionisation à l'aide de la matrice  $\text{TiO}_2$ , était généralement l'adduit de sodium ou de potassium.

Nous avons testé l'ionisation d'un mélange de sept toxines par cette technique, et seule une toxine a pu être ionisée, lorsque la matrice  $\text{TiO}_2$  était prémélangée avec la solution d'analytes avant dépôt.

Cette toxine, ainsi que nous pouvons le voir sur le spectre de masse présenté dans la Figure 11, est la nodularine, détectée au  $m/z = 825.6$  Da. Nous constatons effectivement qu'outre l'ionisation par protonation, les adduits de sodium et de potassium sont également formés. Ces adduits de cations sur la nodularine n'avaient jamais été observés au laboratoire. Ceci confirme donc les observations des auteurs, concernant la formation d'adduits de cation lors de l'utilisation de la matrice  $\text{TiO}_2$ .

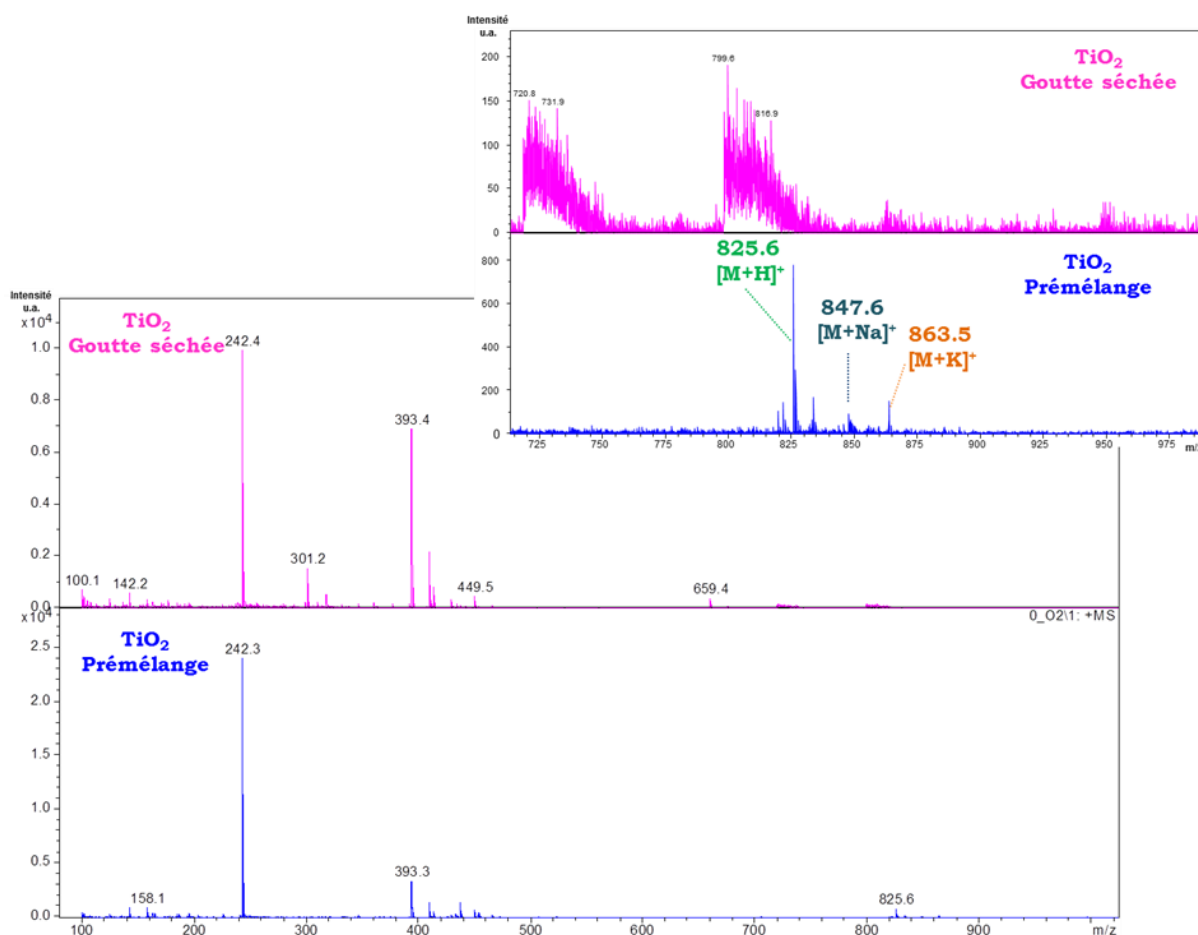


Figure 11 : Spectres MALDI-MS d'un mélange de 7 toxines en matrice  $\text{TiO}_2$

Nous ne pouvons toutefois pas nous satisfaire d'un rendement d'ionisation aussi faible, et bien qu'effectivement les spectres de masse soient exempts d'interférences dans la gamme des faibles masses moléculaires, nous décidons de ne pas poursuivre les expériences avec cette matrice.

#### **4.4.4 Conclusion**

L'utilisation d'une matrice MALDI à base de dioxyde de titane n'a pas, dans le cas de nos analytes, démontré son efficacité. Nous retiendrons cependant le très faible bruit de fond observé dans les spectres MALDI obtenus avec cette matrice, car s'il était besoin de changer de type d'analytes, nous pourrions sans hésiter réévaluer les capacités d'ionisation de l'anatase. Cette matrice montre effectivement des performances intéressantes, mais elle ne peut, dans notre cas, être une solution acceptable.

### **4.5 Matrices Carbone graphite**

#### **4.5.1 Introduction**

Un autre type de matrice, dédiée aux petites molécules, est présenté dans la littérature : l'ionisation assistée par des matrices à base de carbone. Ainsi, quelques articles faisant état de l'utilisation de fullerènes, nanotubes ou de carbone graphite ont été recensés<sup>110,131</sup>.

Bien que ces techniques semblent intéressantes, leur mise en œuvre était, d'après les auteurs, relativement difficile en raison principalement de la très faible solubilité des matériaux carbonés dans les solvants usuels (tels l'eau, l'acétonitrile, le méthanol). Il apparaissait en outre, toujours d'après les auteurs, un risque important de contamination de la source lors de l'ionisation (très faible adhérence de la matrice au support métallique).

Cependant, au cours de la première année de thèse, une publication concernant l'utilisation de mines de crayon en tant que matrice a retenu notre attention<sup>132</sup>. Basée sur l'ionisation par le carbone graphite, cette technique présente l'avantage indéniable d'une rapidité et d'une facilité de préparation de l'échantillon. En effet, le dépôt de matrice sur la cible MALDI s'effectue par un simple crayonnage de la cible, au moyen de tout crayon disponible dans le commerce (les plus gras étant les plus aisés à manipuler). Par ailleurs, cette publication faisait état d'une utilisation des mines de crayon pour l'analyse de composés à faibles masses moléculaires, le background matriciel étant « presque » nul.

#### **4.5.2 Matériel et méthodes**

##### *4.5.2.1 Préparation d'échantillon et paramètres MS*

Deux analytes ont été utilisés pour évaluer les capacités d'ionisation des mines de crayon : l'aflatoxine B1 (une mycotoxine) et la réserpine (un peptide). Les cyanotoxines telles les microcystines ou la nodularine n'étaient pas disponibles lors de la réalisation de cette expérience. Cependant, l'objectif de cette expérience étant d'évaluer la capacité d'ionisation de la matrice de carbone graphite pour de petites molécules organiques ou peptidiques, dans la gamme de  $m/z$  [0-800] Da,

l'utilisation, à priori, d'une mycotoxine et d'un peptide, a été considérée comme acceptable.

La réserpine a été préparée, à la concentration de 6 µg/mL et l'aflatoxine a été préparée en solution de 0.1 µg/mL. Les solutions d'analyte ont été diluées, aux concentrations susmentionnées, dans cinq solvants différents, à savoir ACN, ACN/H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA (50 : 50), ACN + 0.1 % TFA, H<sub>2</sub>O + LiI (1 mM), ACN/H<sub>2</sub>O + LiI 1 mM (50 :50).

La plaque MALDI utilisée est une plaque classique de type Matt Steel.

La manipulation a été réalisée en deux étapes. La première étape consistait en un « crayonnage » des spots de la plaque MALDI, correspondant au « dépôt » de la matrice. Dans la foulée, les solutions d'analytes ont ensuite été déposées, un dépôt par solvant et par analyte. Le volume déposé était de 1 µL.

### **4.5.3 Résultats et discussion**

Plusieurs manipulations ont été réalisées, suivant le protocole décrit dans l'article<sup>132</sup>. Outre la toxine analysée dans ce test, nous avons préalablement effectué l'analyse de la molécule de réserpine, qui est un composé très souvent utilisé en spectrométrie de masse car son rendement d'ionisation est généralement élevé.

Les résultats obtenus sont, dans le cas de la réserpine (MM 609.278 g/mol), très encourageants : en effet, ainsi qu'on peut le voir dans la Figure 12, la molécule est ionisée et est présente avec une intensité non négligeable dans le spectre.

Cependant, ainsi qu'il apparaît également sur la Figure 12, le spectre comporte de nombreux pics aux basses masses. Ces ions proviennent, entre autres, de la matrice carbonée (notamment des pics séparés de 12 unités de masse). Le nombre important de pics dans cette zone constitue un véritable inconvénient dans le cadre de la mise au point de la méthode pour les molécules de faible poids moléculaire.

L'ionisation au moyen de mines de crayons a ensuite été évaluée sur la seule toxine disponible au moment du test, à savoir l'aflatoxine B1. Malheureusement, en dépit de variation des conditions de solvant de l'analyte et quelle que soit la puissance LASER utilisée, l'aflatoxine B1 n'a pu être ionisée par la matrice « mines de crayon ».

### **4.5.4 Conclusion**

Bien que séduisante à priori, en raison de la facilité de dépôt de la matrice, cette méthode est inappropriée pour l'ionisation de nos analytes cibles en raison principalement de la surcharge spectrale aux basses masses. En outre, l'absence d'ionisation de l'aflatoxine B1 constitue évidemment un frein de taille, mais l'évaluation sur une seule toxine n'aurait pu être représentative de la capacité d'ionisation de la matrice mine de crayon. L'ionisation a donc effectivement eu lieu pour l'un des analytes évalués, mais les interférences aux basses masses constituent l'inconvénient insurmontable de l'utilisation de ces matrices « mine de crayon ».

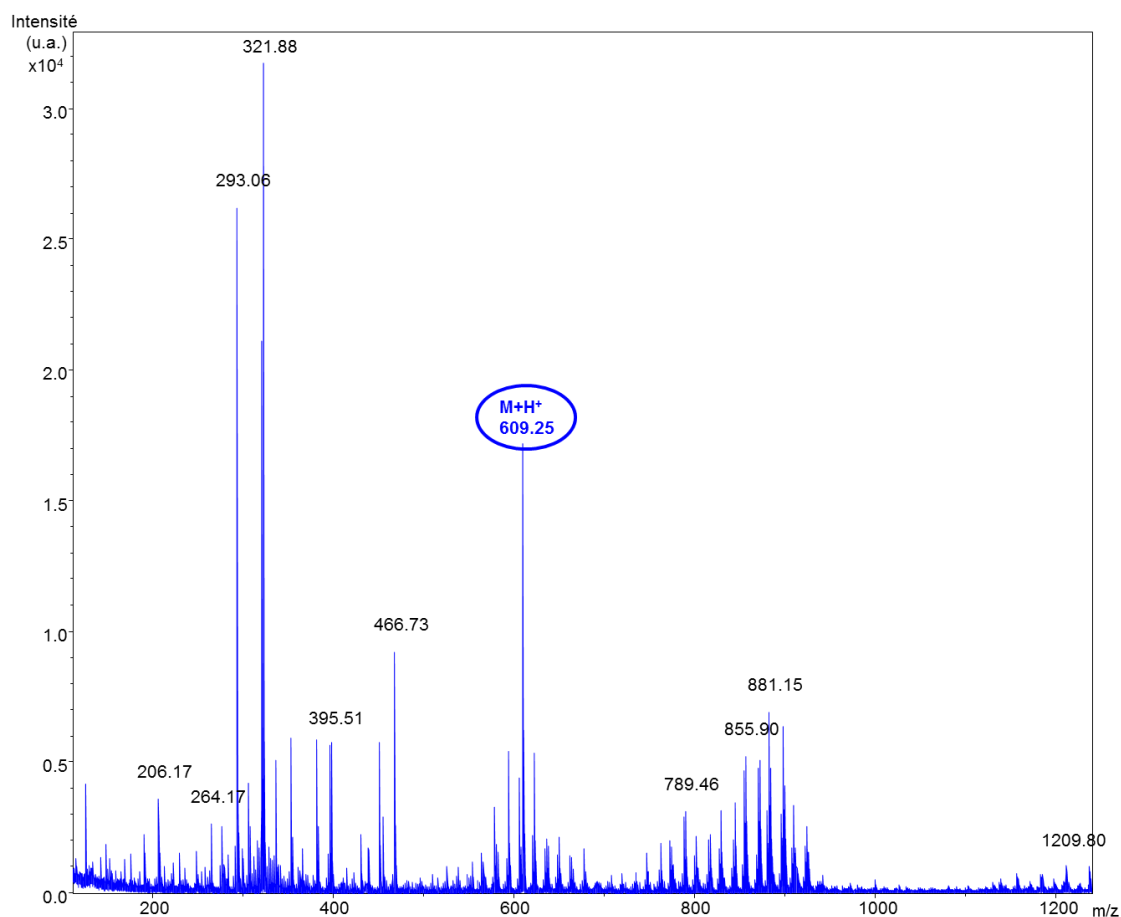


Figure 12 : Spectre MALDI-TOF-MS de la réserpine (6 ng déposés) obtenu à l'aide d'une matrice à base de 'mines de crayon'

## 4.6 Matrices ioniques liquides

### 4.6.1 Introduction

#### 4.6.1.1 Généralités

Les liquides ioniques (Room temperature ionic liquids - RTILs) sont des sels organiques de formule générale  $[A^-, B^+]$  pouvant être synthétisés via une réaction acide/base. Ces composés sont une classe de solvants ioniques présentant une faible température de fusion – conventionnellement inférieure à 100°C - et ils possèdent de remarquables propriétés physiques et chimiques, les rendant très prometteurs notamment en terme de chimie verte, de synthèse organique, de réactions électrochimiques et récemment en spectrométrie de masse<sup>133</sup>.

D'un point de vue physico-chimique, les RTIL ont une faible pression de vapeur saturante à température ambiante, possèdent une large gamme de viscosité ainsi qu'une grande variété de polarités, permettant la solubilisation de nombreux composés. Ils sont par ailleurs très stables.

Daniel Armstrong et son groupe ont démontré la possibilité de coupler les propriétés des liquides ioniques avec celles des matrices MALDI, créant des « matrices ioniques ». Les matrices conventionnelles étant, pour la plupart, acides, de nombreux produits ont pu être synthétisés en modifiant les couples matrice/base organique<sup>134</sup>.

D'après la littérature, les interférences en masse dans la gamme [100-500] Da seraient moins importantes lors d'une ionisation MALDI avec ces RTIL que lors de l'utilisation de matrices conventionnelles.

Enfin, l'état physique même de ces matrices les rendrait très avantageuses du point de vue de l'homogénéité de l'échantillon et donc au niveau des perspectives de quantification. En effet, la reproductibilité d'un tir à l'autre est capitale lorsqu'une analyse quantitative doit être menée en MALDI-MS<sup>135</sup>.

#### *4.6.1.2 Description des points évalués*

Les différents groupes travaillant avec ces matrices ont observé qu'une matrice acide produisant une ionisation efficace d'un analyte, sera généralement efficace en tant que matrice ionique<sup>135</sup>. Les toxines de ce travail étant ionisées par les matrices acides 2,5-DHB et HCCA, et en se basant sur les observations exposées ci-dessus, nous avons étudié dix combinaisons de ces deux matrices acides avec cinq bases organiques.

Une fois le choix des combinaisons acide-base optimales effectué, nous avons évalué l'intérêt – et surtout la faisabilité - d'une ionisation sur matrices ioniques par formation d'adduits de cations, métalliques ou ammonium.

Les conditions de préparation et d'utilisation des matrices ioniques liquides sélectionnées ont ensuite été optimisées. Nous avons ainsi fait varier différents points que nous estimions capables d'influencer la robustesse et la reproductibilité des matrices ioniques liquides. Ainsi, le support de dépôt, la concentration des matrices, les solvants des matrices et le mode de synthèse des matrices ont été évalués, comparés et optimisés.

Nous avons également abordé l'aspect lié à la fragmentation au sein des matrices ioniques liquides. Une comparaison de la fragmentation en matrices conventionnelles et matrices ioniques liquides a été menée et les résultats seront présentés.

## 4.6.2 Evaluation de dix matrices ioniques liquides

### 4.6.2.1 Préparation d'échantillon

Les combinaisons testées (nommées ILM1-10) sont présentées dans le Tableau 4. Le mode de préparation de ces matrices est décrit par Andreas Tholey et ses collaborateurs dans la littérature<sup>136</sup>. Il consiste en un mélange d'une solution de matrice acide avec une solution équimolaire (arbitrairement 50 mM) de base, dans un solvant que nous avons choisi être ACN/Eau acidifié par 0.1 % de TFA. Le mélange est alors simplement passé dans un bain à ultrasons et peut être utilisé tel quel.

Tableau 4 : Matrices ioniques liquides évaluées

NOM	ACIDE	BASE	NOM	ACIDE	BASE
ILM1	2,5-DHB	Pyridine	ILM6	HCCA	Pyridine
ILM2		Aniline	ILM7		Aniline
ILM3		Methylimidazole	ILM8		Methylimidazole
ILM4		n-Buthylamine	ILM9		n-Buthylamine
ILM5		Triethylamine	ILM10		Triethylamine

Nous avons également estimé l'influence du mode de préparation du dépôt. Ainsi, pour chaque matrice, le dépôt a été réalisé en goutte séchée avec soit un mélange préalable de la matrice et de l'échantillon (un seul dépôt), soit en deux temps : dépôt de la solution de matrice suivi, après évaporation du solvant, du dépôt de la solution d'échantillon.

Pour chaque spot, 1  $\mu$ L de solution de matrice a été déposé.

La concentration de chaque solution standard de toxine était d'approximativement 5  $\mu$ g/mL, ce qui correspond à des quantités déposées s'échelonnant entre 0,25 et 20 pmol de toxine.

Les dépôts ont été effectués sur une plaque MALDI de type AnchorChip™ avec des ancrs de diamètre 600  $\mu$ m.

### 4.6.2.2 Résultats et discussion

Les dix combinaisons acide-base ont été évaluées et comparées sur base de plusieurs critères.

Les Figure 13 et Figure 14 illustrent les spectres obtenus lors de l'ionisation de la microcystine LR sur les différentes matrices discutées, à savoir les 10 combinaisons acide-base formant les liquides ioniques et les deux matrices classiques 2,5-DHB et HCCA.

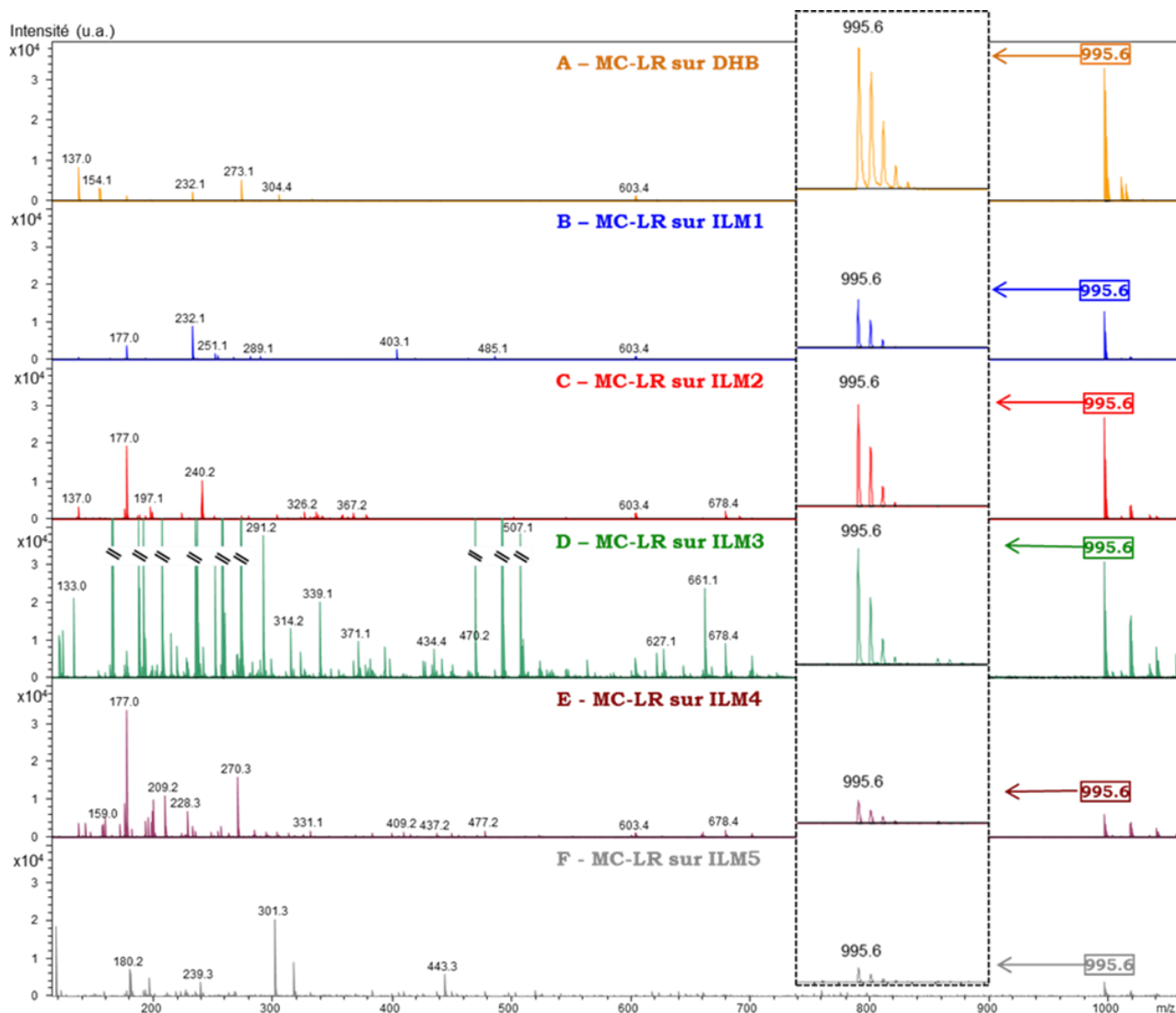


Figure 13 : Spectres MALDI-TOF-MS de la microcystine LR sur la matrice classique 2,5-DHB (A) et les matrices ioniques liquides ILM1-ILM5 (B-F)

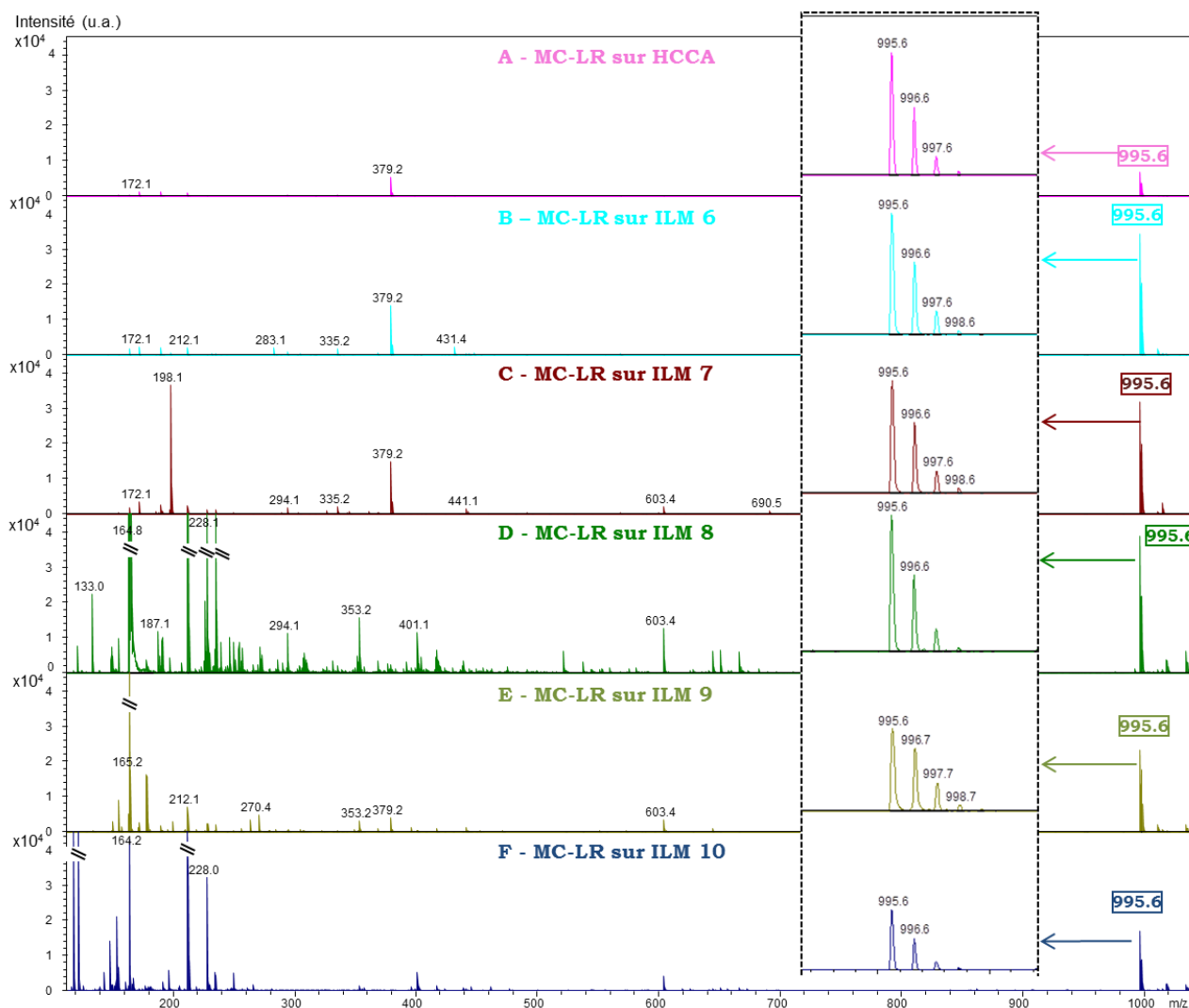


Figure 14 : Spectres MALDI-TOF-MS de la microcystine LR sur la matrice classique HCCA (A) et les matrices ioniques liquides ILM6-ILM10 (B-E)

Nous avons tout d'abord posé comme critère numéro 1, l'ionisation de toutes les toxines d'un mélange. Le Tableau 5 schématise les résultats obtenus pour l'ionisation des analytes d'intérêt dans le cadre de cette évaluation. Le second point d'attention était l'aspect liquide ou non de la matrice puisqu'il est important de préciser que certains "liquides ioniques" sont, au sens strict, des solides ioniques, sans pour autant perdre toutes leurs propriétés spécifiques aux matrices liquides. L'état physique du dépôt a, en conséquence, été évalué.

Nous pouvons constater que cinq matrices ILM peuvent être écartées en raison de leur incapacité évidente à ioniser tous les analytes. Il s'agit des matrices ILM3, ILM4, ILM5, ILM6 et ILM8. D'autre part, nous constatons que plus de la moitié des « liquides » ioniques sont en réalité solides.

Tableau 5 : Capacités d'ionisation d'une sélection de toxines par 10 matrices ioniques liquides

	DHB Cristaux	ILM1 Cristaux	ILM2 Cristaux	ILM3 Liquide	ILM4 Liquide	ILM5 Liquide	HCCA Cristaux	ILM6 Cristaux	ILM7 Cristaux & Liquide	ILM8 Liquide	ILM9 Liquide	ILM10 Liquide
Cylindrospermopsine [M+H <sup>+</sup> ]: 416.2 Da				✗		✗	✗	✗				
Microcystine LR [M+H <sup>+</sup> ]: 995.6 Da												
Nodularine [M+H <sup>+</sup> ]: 825.5 Da												
Saxitoxine [M+H <sup>+</sup> ]: 300.2 Da				✗	✗	✗				✗		
Neosaxitoxine [M+H <sup>+</sup> ]: 316.2 Da				✗	✗	✗						
Pectenotoxine-2 [M+H <sup>+</sup> ]: 881.6						✗						

✗ Pas d'ionisation de l'analyte

Les critères de l'expérience sont le signal, la résolution et le bruit – évalués ensemble car généralement étroitement liés. Le bruit a été estimé en posant un critère de comparaison intra-toxines. Cette valeur correspond au nombre de pics du spectre de masse, dont le rapport signal sur bruit est supérieur à la valeur 15, dont l'intensité relative est supérieure à 2 % et dont l'intensité absolue est supérieure à 100 u.a.

Pour chaque toxine, les trois critères ont été évalués sur base d'une cotation. Ainsi nous avons, pour chaque critère, la possibilité d'attribuer une note comprise entre 1 et 9 (7 matrices ILM évaluées – car ILM3, 4, 5 ont été exclues – et les matrices acides 2,5-DHB et HCCA)

- Signal : le signal le moins intense se voit attribuer la note de 1 et le signal le plus intense la note maximale, à savoir 9.
- Résolution : classement par pouvoir de résolution croissant, le mieux résolu obtenant le maximum de points.
- Bruit : classement par bruit décroissant : plus le nombre de pics annexes était élevé, plus les points pour cette matrice sont faibles

Les trois critères nous semblant d'importance équivalente dans le cadre de la détermination de la matrice optimale, nous avons décidé de ne pas pondérer ces derniers. En conséquence, le classement des matrices, pour chaque toxine est le fruit de l'addition des points des trois critères, pour chaque matrice.

Le Tableau 6 illustre la démarche effectuée pour classifier les matrices dans le cas d'une toxine, la microcystine LR.

Tableau 6 : Classement des matrices ioniques liquides pour la microcystine LR

Matrice	Rapport S/N	Points S/N	Résolution	Points Résolution	Bruit	Points Bruit	TOTAL Microcystine LR	Classement
2,5-DHB	1523.8	8	4688	1	24	6	15	5
ILM1	1020	6	9438	9	27	5	20	2
ILM2	950	5	7734	6	60	1	12	7
HCCA	191.9	1	8413	8	13	9	18	3
<b>ILM6</b>	<b>1715.8</b>	<b>9</b>	<b>7004</b>	<b>5</b>	<b>21</b>	<b>7</b>	<b>21</b>	<b>1</b>
ILM7	1433.8	7	6937	4	31	3	14	6
ILM8	553.1	2	6895	3	43	2	7	9
ILM9	872.8	4	5618	2	31	4	10	8
ILM10	609.9	3	7822	7	16	8	18	4

Il apparaît donc, dans ce cas d'exemple, que la première matrice du classement est la matrice ionique ILM6.

L'objectif restant d'obtenir la matrice optimale pour l'ionisation de TOUTES les toxines du test, l'analyse des résultats se poursuit en effectuant le même tableau pour chaque toxine.

Les points sont alors simplement additionnés pour chaque matrice, et nous obtenons, au terme de ces calculs, le résultat détaillé dans le Tableau 7 :

Tableau 7 : Classement des matrices ioniques liquides pour l'ensemble des toxines

Matrice	Points <u>Cylindrospermopsine</u>	Points <u>Microcystine LR</u>	Points <u>Nodularine</u>	Points <u>Saxitoxine</u>	Points <u>Néosaxitoxine</u>	Points <u>Pectenotoxine-2</u>	TOTAL	Classement
ILM1	23	20	19	25	25	23	135	1°
ILM10	24	18	17	23	26	22	130	2°
ILM2	19	12	16	15	15	20	97	3°
ILM6	8	21	15	21	14	15	94	4°
2,5-DHB	12	15	15	8	12	16	78	5°
ILM9	20	10	13	7	10	18	78	6°
HCCA	4	18	18	11	11	11	73	7°
ILM8	15	7	7	9	18	7	63	8°
ILM7	10	14	15	16	4	3	62	9°

Deux matrices sortent nettement du lot. Il s'agit des matrices ILM1 et ILM10. Nous pouvons constater que l'avantage de ces deux matrices est très net par rapport aux autres, de même que par rapport aux matrices classiques. Les optimisations à suivre seront donc effectuées avec les matrices ILM1 et ILM10.

En conclusion de cette première série de tests des liquides ioniques, nous pouvons noter que de manière générale, et en comparaison avec les matrices classiques (voir Tableau 7) l'utilisation de liquides ioniques augmente sensiblement la résolution des spectres. En parallèle, le bruit aux basses masses diminue, ce qui est indéniablement un avantage pour l'analyse de petites molécules. Enfin, ainsi que nous l'espérions, puisque les liquides ioniques sont le résultat d'une réaction acide-base avec les matrices MALDI classiques, les rendements d'ionisation furent très bons pour les analytes testés.

### **4.6.3 Adduits de cation**

La littérature faisant fréquemment état d'une ionisation par formation d'un adduit de cation<sup>135</sup>, préférentiellement à l'adduit protoné, nous avons évalué l'efficacité d'ionisation des cations Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

#### *4.6.3.1 Préparation d'échantillon*

La formation d'adduits est évaluée sur un mélange de six toxines, avec quatre cations différents (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) - dans des dépôts distincts pour éviter la compétition- et sur quatre matrices différentes (ILM1, 2,5-DHB, ILM10 et HCCA). Nous obtenons dès lors 16 combinaisons à évaluer.

Les solutions de sels de cation sont préparées à une concentration de 10 mM chacune. Quatre sels différents sont évalués, contenant chacun un cation différent, à savoir LiI, NaI, KCl et NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>.

Chaque solution saline est ajoutée sur la plaque MALDI (AnchorChip 600) aux dépôts en goutte séchée selon l'ordre de dépôt suivant: matrice, solution d'analyte(s) et enfin la solution saline.

Les matrices classiques 2,5-DHB et HCCA sont préparées par dissolution d'une masse adéquate de poudre telle que la concentration finale soit de 25 mM en solution dans ACN : H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA (2 :1).

Les matrices ioniques sont préparées, juste avant le dépôt, par mélange 1 :1 d'une solution 50 mM de base (pyridine pour ILM1 et triéthylamine pour ILM10) avec une solution 50 mM d'acide (2,5-DHB pour ILM1 et HCCA pour ILM10) dans ACN : H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA (2 :1).

Le mélange de toxines est constitué des toxines cylindrospermopsine, microcystine LR, nodularine, saxitoxine, néosaxitoxine et pectenotoxine-2 à la concentration de 1 μM en solution dans ACN : Eau + 0.1 % TFA (2 :1).

#### *4.6.3.2 Résultats et discussion*

Le Tableau 8 présente les masses attendues pour chaque adduit de cation. Les résultats obtenus montrent que, bien que certains adduits soient effectivement formés, l'efficacité d'ionisation par formation d'un adduit de cation est très faible (Tableau 9).

Tableau 8 : Masses monoisotopiques théoriques pour chaque adduit toxine + cation potentiellement détecté lors de l'ionisation par MALDI-TOF-MS au moyen d'ILMs

Toxine	Formule Brute	M	[M+Li] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
Cylindrospermopsine	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S	415.12	422.13	438.11	454.08	433.16
Microcystine LR	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	994.55	1001.56	1017.54	1033.51	1012.58
Nodularine	C <sub>41</sub> H <sub>60</sub> N <sub>8</sub> O <sub>10</sub>	824.44	831.46	847.43	863.41	842.48
Saxitoxine	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	299.13	306.15	322.12	338.10	317.17
Néosaxitoxine	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	315.13	322.15	338.12	354.09	333.16
Pectenotoxine-2	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	858.48	865.49	881.47	897.44	876.51

Par ailleurs, lorsque l'adduit est détecté, il est minoritaire par rapport au pic [M+H]<sup>+</sup>. La seule exception est constituée par la toxine pectenotoxine-2, laquelle est toujours détectée via son adduit sodium, quel que soit le cation ajouté à la solution et quelle que soit la méthode de spectrométrie de masse mise en œuvre pour l'analyse. En effet, même en passant sur un analyseur différent (le triple quadripôle) seuls les ions [M+Na]<sup>+</sup> sont détectés.

Par ailleurs, la formation d'adduit est nettement plus importante lors d'une ionisation sur les matrices conventionnelles. Or, dans le cas qui nous occupe, la formation d'adduit était particulièrement attendue dans les matrices ioniques liquides, ce qui n'est pas le cas en pratique.

Tableau 9 : Résumé des adduits de cation observés pour les 6 toxines évaluées

Toxine	Matrice ILM	M+Li	M+Na	M+K	M+NH <sub>4</sub>
Cylindrospermopsine	DHB + Py – ILM1	✘	OK	OK	✘
	HCCA + NEt <sub>3</sub> – ILM10	✘	✘	✘	✘
Microcystine LR	DHB + Py – ILM1	✘	OK	✘	✘
	HCCA + NEt <sub>3</sub> – ILM10	✘	✘	✘	✘
Nodularine	DHB + Py – ILM1	✘	OK	OK	✘
	HCCA + NEt <sub>3</sub> – ILM10	✘	✘	✘	✘
Saxitoxine	DHB + Py – ILM1	✘	✘	✘	✘
	HCCA + NEt <sub>3</sub> – ILM10	✘	✘	✘	✘
Neosaxitoxine	DHB + Py – ILM1	✘	✘	✘	✘
	HCCA + NEt <sub>3</sub> – ILM10	✘	OK	✘	✘
Pectenotoxine-2	DHB + Py – ILM1	OK	OK	OK	✘
	HCCA + NEt <sub>3</sub> – ILM10	OK	OK	OK	✘

En conclusion, la formation d'adduits ne semble, dans notre cas, pas être la solution. Nous poursuivrons donc notre travail en conditions normales, dans un milieu légèrement acidifié.

#### 4.6.4 MS/MS en matrices ioniques liquides

L'objectif majeur de ce travail étant l'obtention d'un signal identifiable et spécifique en MALDI, deux possibilités, notamment, devaient être évaluées : l'élimination des interférences matricielles via le développement de matrices limitant les interférences aux masses d'intérêt et, d'autre part, la spécificité assurée via la fragmentation.

Nous avons par ailleurs souhaité examiner la fragmentation de nos analytes cibles dans les matrices ioniques liquides.

Nous avons donc procédé à la fragmentation de quelques toxines, ioniques (saxitoxine, néosaxitoxine, cylindrospermopsine) et peptidiques (microcystine LR et nodularine).

##### 4.6.4.1 Préparation d'échantillon

Les matrices classiques 2,5-DHB et HCCA sont en concentration de 25 mM dans ACN : H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA (2 : 1). Les matrices ioniques sont préparées, comme au point précédent, par réaction acide base en solution. Les concentrations finales sont de 25 mM dans ACN : H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA (2 : 1).

Afin de faciliter la sélection des ions parents avant la fragmentation, nous travaillons avec des solutions pures de toxines, chacune étant déposée sur un spot différent. Ainsi, les toxines suivantes sont déposées : cylindrospermopsine, microcystine LR, nodularine, saxitoxine et néosaxitoxine, chacune à la concentration molaire de 1 µM dans ACN : H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA (2 : 1).

L'ordre de dépôt de chaque solution de toxine sur la plaque MALDI (AnchorChip 600) est le suivant : matrice puis solution d'analyte.

##### 4.6.4.2 Résultats et discussion

Les liquides ioniques sont généralement répertoriés en tant que matrices douces, permettant l'ionisation de composés entiers, sans les fragmenter (par ISD par exemple) ni leur conférer une énergie interne trop importante (première étape du PSD). Le nombre de fragments obtenus en MS/MS a été légèrement inférieur au nombre de fragments obtenus en MS/MS avec ionisation en matrice classique. Par ailleurs, alors que la configuration de l'appareil est telle que les énergies transmises aux ions sont très importantes (de l'ordre de 19 keV), ceci n'a pas mené à une fragmentation supplémentaire par rapport aux appareils de type triple quadripôle.

La Figure 15 illustre l'observation que nous avons pu faire concernant le profil de fragmentation de la microcystine LR en matrices classiques et ioniques. Il apparaît clairement que les profils MS/MS sont très similaires, quelle que soit la matrice utilisée. Les échelles sont légèrement différentes, mais ceci est simplement lié à la puissance LASER déployée pour obtenir une bonne ionisation – puissance LASER qui est caractéristique de chaque matrice. Bien que les puissances LASER diffèrent, les spectres MS et MS/MS ne sont pas plus (ou moins) fournis dans une matrice ionique par rapport à une matrice classique.

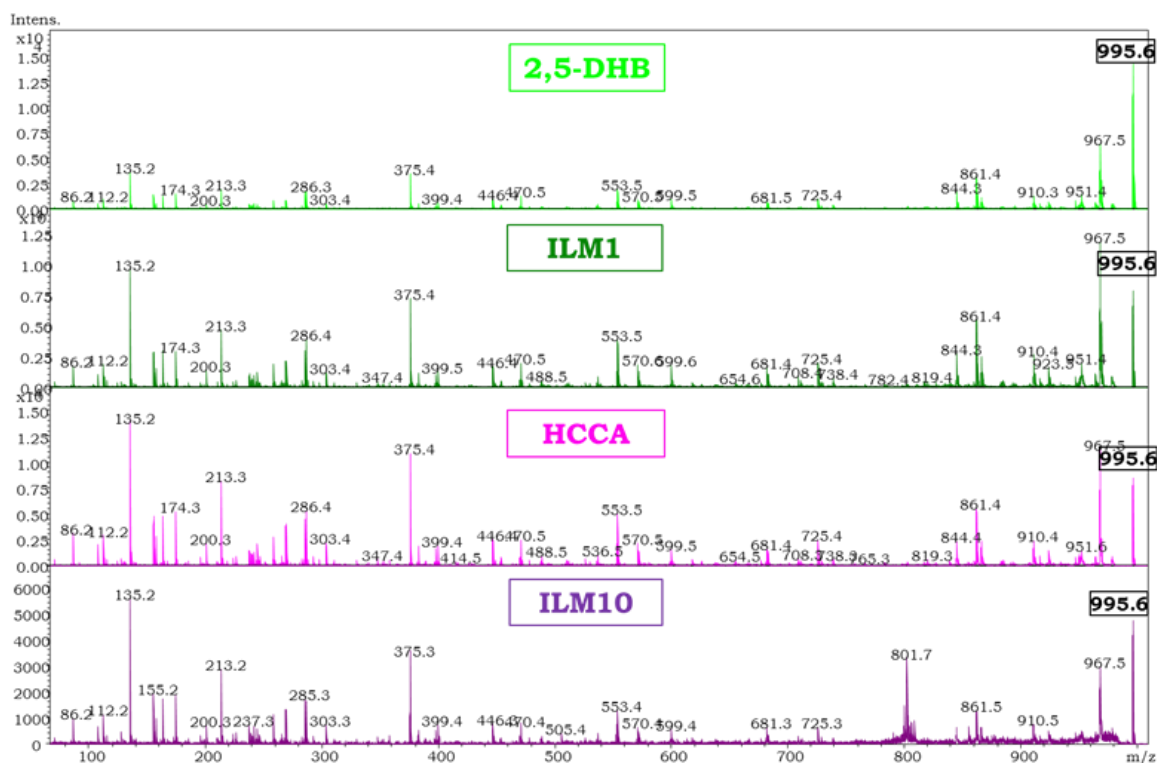


Figure 15 : Spectres de la MC-LR analysée par MALDI-TOF-MS/MS à l'aide de matrices classiques et ILM, et enregistrés en mode LIFT™ sur l'Ultraflex II

Nous avons observé le même type de profil de fragmentation lors de l'analyse de la toxine peptidique nodularine. Les fragments observés correspondent aux fragments répertoriés dans la littérature en ce qui concerne la microcystine LR<sup>137-139</sup>.

Par ailleurs, nous avons été confrontés à une limitation technique, totalement indépendante des matrices choisies, et qui a constitué un frein à l'étude de la fragmentation des toxines de faible poids moléculaire. En effet, l'analyseur à temps de vol utilisé permet une « précision » de sélection du parent de +/- 10 Da autour de la masse cible. Dans le cas de peptides ou protéines, ceci ne constitue en aucun cas un problème car les masses sont suffisamment espacées. Dans le cas de molécules de masses inférieures à 500 Da, nous avons été confrontés à un gros problème de spécificité dans la sélection des parents. Bien que les liquides ioniques minimisent les interférences aux basses masses, ceci n'a pas été suffisant pour empêcher la sélection de molécules supplémentaires aux analytes cibles. Nous avons ainsi, dans le cas de la saxitoxine, la néosaxitoxine et la cylindrospermopsine, été incapables d'affirmer que le parent sélectionné était bel et bien la toxine cible. D'une part, le profil de fragmentation était beaucoup moins riche que ceux obtenus avec les toxines peptidiques. D'autre part, étant donné le manque de précision lors de la sélection du parent, nous n'avons pu, avec une confiance suffisante, déterminer si les fragments obtenus provenaient de l'analyte cible ou d'un parent dont la masse serait comprise dans l'intervalle de 10 Da autour de la masse visée.

Ce problème devait être souligné, car il semble difficile à contourner en vue de poursuivre les analyses MS/MS d'analytes de masses inférieures à 500 Da. Afin

de remédier à cette limitation technique, nous pensons bien entendu à une séparation LC préalable, à des purifications successives cependant la précision de la sélection des ions cible demeure trop pour des analytes de masses inférieures à 500 Da.

En conclusion, pour des analytes de masses supérieures à 500 Da, la MS/MS dans les liquides ioniques est exploitable, mais conduit à des profils en tous points similaires aux profils obtenus en matrices conventionnelles et donc, ne permet pas l'obtention d'informations supplémentaires.

En ce qui concerne les analytes de masses inférieures à 500 Da, l'analyseur utilisé dans ce travail ne permet pas une spécificité suffisante et nous ne sommes pas en mesure d'assurer avec confiance que le profil de fragmentation corresponde aux ions précurseurs sélectionnés. La MS/MS directe, sans purification ou séparation HPLC préalable, est donc dans ce cas, à pratiquer avec toutes les précautions d'usage.

Après des essais de quantification préliminaire très prometteurs, nous n'avons pas pu confirmer les capacités de quantification des liquides ioniques. Bien qu'ayant évalué plusieurs standards internes, et déterminé le standard optimal, aucune des deux matrices testées ne permet, avec une confiance suffisante, de pouvoir quantifier en MALDI-MS, sur l'analyseur à temps de vol (Ultraflex II).

La matrice ILM1 sera toutefois conservée car elle permet l'ionisation douce d'analytes de petits poids moléculaires, et présente moins d'interférences aux basses masses que son pendant acide, la matrice conventionnelle 2,5-DHB.

En conclusion générale de ce point consacré aux matrices liquides ioniques, en dépit d'une large variété de tests divers, une quantification de petites molécules, en MALDI, sur l'Ultraflex II, est actuellement impossible. L'utilisation du pendant liquide des matrices classiques est toutefois la meilleure alternative pour l'ionisation des cyanotoxines évaluées dans ce travail.

## 5. MATRICES RÉDUCTRICES

### 5.1 Introduction

Dans ce point, nous détaillerons les différentes alternatives envisagées pour obtenir une caractérisation des cyanotoxines, avec un focus tout particulier sur la famille des microcystines.

La ligne de conduite de ce travail étant le développement d'un outil permettant de faciliter la détection et la caractérisation de blooms toxiques de cyanobactérie, une voie d'accès à ces informations est la caractérisation par spectrométrie de masse en tandem. L'hypothèse initiale de ce point était qu'en exploitant la fragmentation aux hautes énergies (PSD avec ou sans gaz de collision), l'accès à des informations structurales supplémentaires serait facilité par rapport aux spectres MS/MS classiquement obtenus dans les appareils de type quadripôles ou trappe ionique<sup>137,139-143</sup>. On pouvait donc s'attendre à observer, tant au niveau des précurseurs qu'à celui de fragments, des spectres plus riches en information structurale, notamment grâce à la complémentarité avérée des fragmentations obtenues par PSD en matrices classiques et par ISD en matrices réductrices.

D'un point de vue identification, quelques études ont récemment décrit l'utilisation de matrices réductrices en MALDI afin de caractériser les analytes grâce aux réactions chimiques se déroulant dans la plume MALDI, lors du processus d'ionisation<sup>144-146</sup>. Parmi ces matrices réductrices, nous pouvons citer le 1,5-diaminonaphtalène (1,5-DAN) dont les études susmentionnées ont décrit la capacité de réduction partielle de ponts disulfures, en parallèle à l'ionisation MALDI. L'évaluation des propriétés réductrices de cette matrice 1,5-DAN est également présentée et discutée. En effet, l'analyse de microcystines par MALDI avec la matrice réductrice 1,5-DAN n'avait jamais été rapportée et méritait d'être évaluée.

Les résultats, surprenants, sont présentés et une propriété supplémentaire de la matrice 1,5-DAN est observée, validée et exploitée pour l'analyse environnementale de microcystines. Nous démontrerons que la matrice 1,5-DAN permet l'obtention de spectres caractéristiques et dépendants de la structure de l'acide aminé 7 dont on a mentionné l'importance dans les différences de toxicité.

En conclusion, l'objectif de ce chapitre est la mise au point d'un outil de screening environnemental permettant la distinction entre microcystines de structures différentes, en exploitant les propriétés réductrices de matrices MALDI.

### 5.2 Préparation d'échantillon

Les matrices 2,5-DHB et 1,5-DAN ont été préparées respectivement aux concentrations de 20 mg/mL et à saturation, dans ACN : FA 0.1 % (50 : 50).

Les solutions de peptides synthétiques P1-Ala, P2-Dha et P3-Dhb sont préparées aux concentrations de 0.1  $\mu\text{mol/L}$  dans MeOH : H<sub>2</sub>O (20 : 80) et les solutions de microcystine LR, YR et RR et de nodularine ont été préparées dans le même solvant MeOH :H<sub>2</sub>O (20 : 80), à des concentrations de l'ordre de 1  $\mu\text{M}$ .

Les calibrants, les peptides synthétiques et les standards de toxines ont été déposés, à raison de 1 µL par dépôt, après le dépôt d'un volume identique de matrice (1 µL), sur une plaque MALDI classique de type Polished steel (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

## 5.3 Résultats et discussion

### 5.3.1 Fragmentation ISD

Afin d'observer le phénomène de fragmentation « in source », une comparaison de spectres MALDI a été entreprise avec deux matrices MALDI communément utilisées pour favoriser la fragmentation ISD : les matrices 2,5-DHB et 1,5-DAN.

Les deux matrices ont été évaluées à différentes puissances LASER, pour trois microcystines (LR, YR et RR) et la nodularine. En dépit de la variation sur toute la gamme possible de puissances LASER, aucun fragment ISD (c ou z) n'a pu être détecté, tant avec la matrice 2,5-DHB qu'avec le 1,5-DAN.

Cependant, un phénomène intéressant a été observé au cours de cette expérience. En effet, en comparant le profil « isotopique » des différentes toxines obtenu avec la matrice 2,5-DHB et avec la matrice 1,5-DAN, une différence très nette a pu être mise en évidence. Ainsi que la Figure 16 le montre clairement, le spectre de la microcystine obtenu dans le 1-5-DAN montre, pour chaque microcystine testée, une augmentation nette du pic au  $m/z$   $[M+2+H]^+$  en comparaison avec le profil obtenu dans 2,5-DHB ou en comparaison avec le profil isotopique obtenu au moyen d'un logiciel de simulation. Nous avons également pu observer que, si les microcystines voyaient leur profil « isotopique » fortement influencé par le choix de la matrice MALDI, le profil de la nodularine n'était pas aussi affecté, ainsi qu'on peut le remarquer également sur la Figure 16.

Il est important de mentionner que l'utilisation du 1,5-DAN n'a pas d'influence sur le profil isotopique des molécules, mais que cette matrice induit une modification chimique au niveau de certaines espèces moléculaires, conduisant à la création de molécules chimiquement différentes et détectées, dans notre cas, à un  $m/z$  augmenté de 2 unités de masse. La matrice 1,5-DAN a fréquemment été reconnue capable de réduire, au moins partiellement, les ponts disulfures au sein de protéines ou peptides<sup>144-146</sup>. Nous le savons, les microcystines ne contiennent aucun pont disulfure dans leur structure, en conséquence de quoi le gain de 2 Da doit être expliqué par un autre phénomène. L'hypothèse la plus probable est qu'une double liaison de la structure de la microcystine a pu être, au cours de l'ionisation par 1,5-DAN, partiellement réduite. Une autre hypothèse, semblant moins probable mais qui doit être vérifiée, serait que l'ionisation s'accompagne d'une ouverture non quantitative du cycle de la microcystine, résultant en une augmentation de la masse de 2 Da. Les paragraphes suivant décrivent les différentes expériences réalisées afin de vérifier les hypothèses

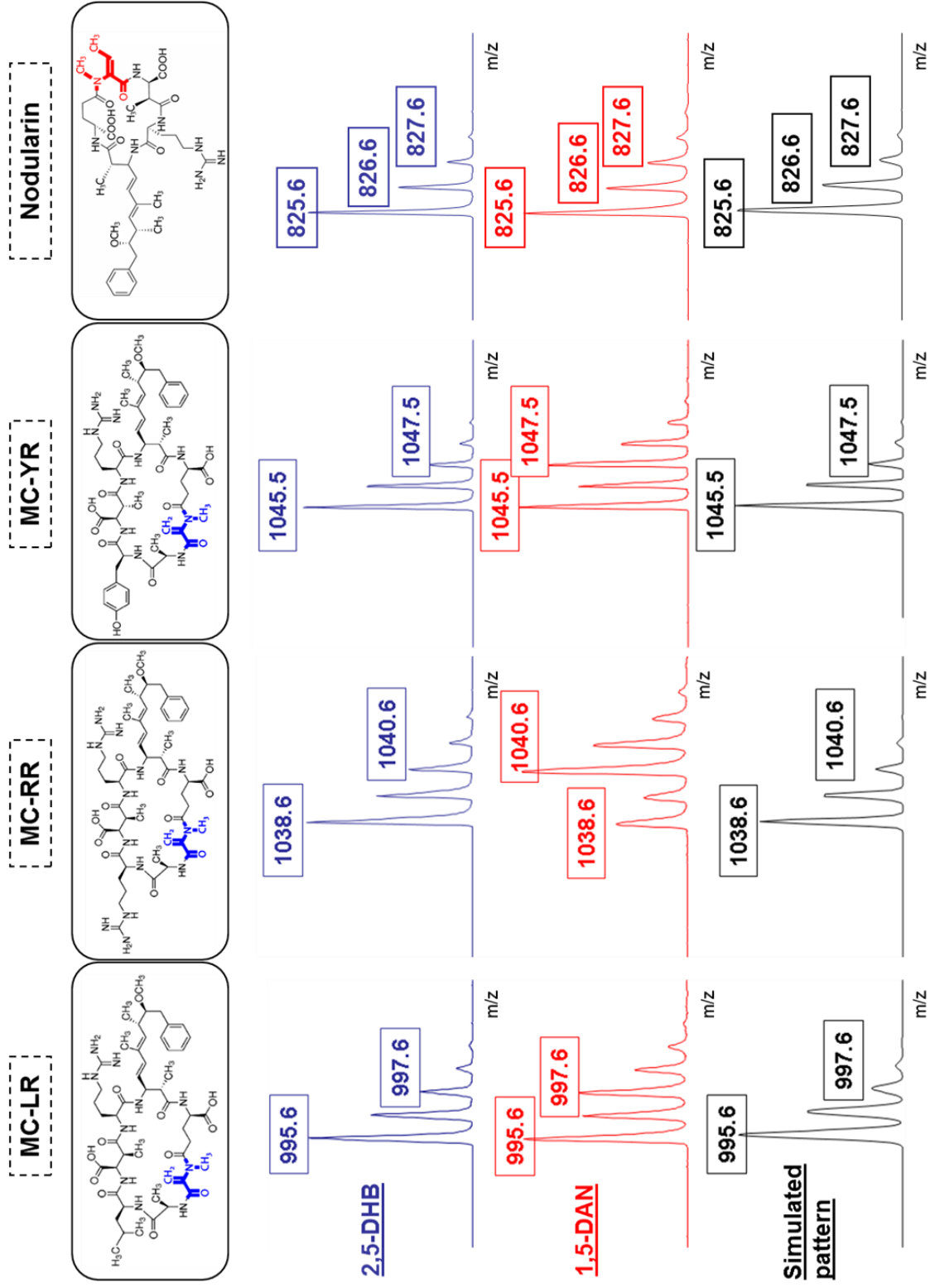


Figure 16 : Comparaison des profils « isotopiques » des microcystines LR, RR et YR et de la nodularine analysées par MALDI-TOF dans les matrices 2,5-DHB et 1,5-DAN

## 5.3.2 Vérification du pouvoir réducteur de 1,5-DAN

### 5.3.2.1 Hypothèse

Nous l'avons mentionné, la nodularine, analysée dans les mêmes conditions que les trois microcystines LR, RR et YR, n'a pas conduit au même phénomène d'augmentation massive du pic à  $[M+H+2]^+$ . Toutefois, comme nous pouvons le remarquer sur la Figure 16, une légère augmentation du pic à la masse  $[M+H+2]^+$  peut être soulignée, en comparaison avec le spectre obtenu dans 2,5-DHB ou le profil isotopique simulé. Nous pouvons également observer que le rapport des intensités des pics aux masses  $M+H$  et  $M+H+2$  est supérieur dans 2,5-DHB par rapport à 1,5-DAN. Ceci tend à confirmer une nouvelle fois que la matrice 1,5-DAN est plus réductrice que la matrice 2,5-DHB. Cette dernière a toutefois un pouvoir légèrement réducteur qui apparaît en comparant le massif obtenu lors de l'ionisation par 2,5-DHB avec le profil isotopique théorique des analytes étudiés (Figure 17).

Afin d'expliquer les différences de comportement lors de l'ionisation MALDI par la matrice 1,5-DAN, l'analyse de la structure des toxines est une étape clé. Ainsi, outre le nombre de peptides constituant les cycles (7 pour les microcystines, 5 pour la nodularine), une des différences majeures entre la famille des microcystines et la nodularine, est que les microcystines analysées contenaient le groupement MDha en position 7 de leur cycle, tandis que la nodularine contient le groupement MDhb.

Les acides aminés Dha et Dhb sont constitués d'une double liaison C=C, laquelle est méthylée dans le cas du groupement Dhb – comme souligné en couleur bleue dans les structures des 4 toxines présentées en Figure 16.

Une revue de la littérature concernant l'influence de la nature du 7<sup>ième</sup> acide aminé sur la toxicité des microcystines permet de constater que certaines microcystines, possédant l'acide aminé Dhb (substitué par ailleurs ou pas) – ont été recensées et que, en outre, leur toxicologie diffère notablement de leurs analogues possédant le groupement Dha<sup>57,59-61,147-150</sup>. Ces microcystines n'étaient, au moment de l'étude, malheureusement pas accessibles commercialement et avec un niveau de pureté acceptable.

En première approximation, le fait que la nodularine, peptide cyclique également, ne présente pas cette réduction si intense semble écarter l'hypothèse d'une ionisation avec ouverture de cycle.

A l'observation des structures des différentes toxines intervenant dans cette expérience, nous n'ignorons pas que deux autres doubles liaisons carbone-carbone sont également présentes dans la structure des toxines analysées. Toutefois, ces liaisons C=C font en fait intégralement partie de l'acide aminé complexe Adda, lequel est présent dans la structure des 4 toxines analysées et dont la réduction sélective pourrait difficilement être expliquée.

Afin de vérifier l'hypothèse d'une réduction de la double liaison carbone-carbone présente dans l'acide aminé Dha au contraire de l'acide aminé

Dhb, nous avons procédé à l'analyse comparative de peptides linéaires (afin d'écarter la contribution d'ouverture de cycle) contenant des acides aminés variables – à savoir l'alanine, la Dha et la Dhb.

### 5.3.2.2 Analyse de peptides synthétiques par MALDI-MS dans 1,5-DAN et 2,5-DHB

Trois peptides linéaires ont été synthétisés, et ils ont été choisis afin de présenter une structure aussi similaire que possible par rapport aux microcystines analysées. Toutefois, les acides aminés complexes présents dans les microcystines n'ont pu être reproduits de manière synthétique pour cette expérience.

Afin d'être dans une gamme de masse similaire à celle des microcystines, le nombre d'acides aminés constituant les peptides synthétiques a été arrêté à 7 acides aminés. La séquence de base des peptides synthétiques est R-F-E-X-A-L-D où X est l'acide aminé variable pouvant être soit l'alanine (P1-Ala), la déhydroalanine (P2-Dha) ou l'acide déhydroaminobutyrique (P3-Dhb).

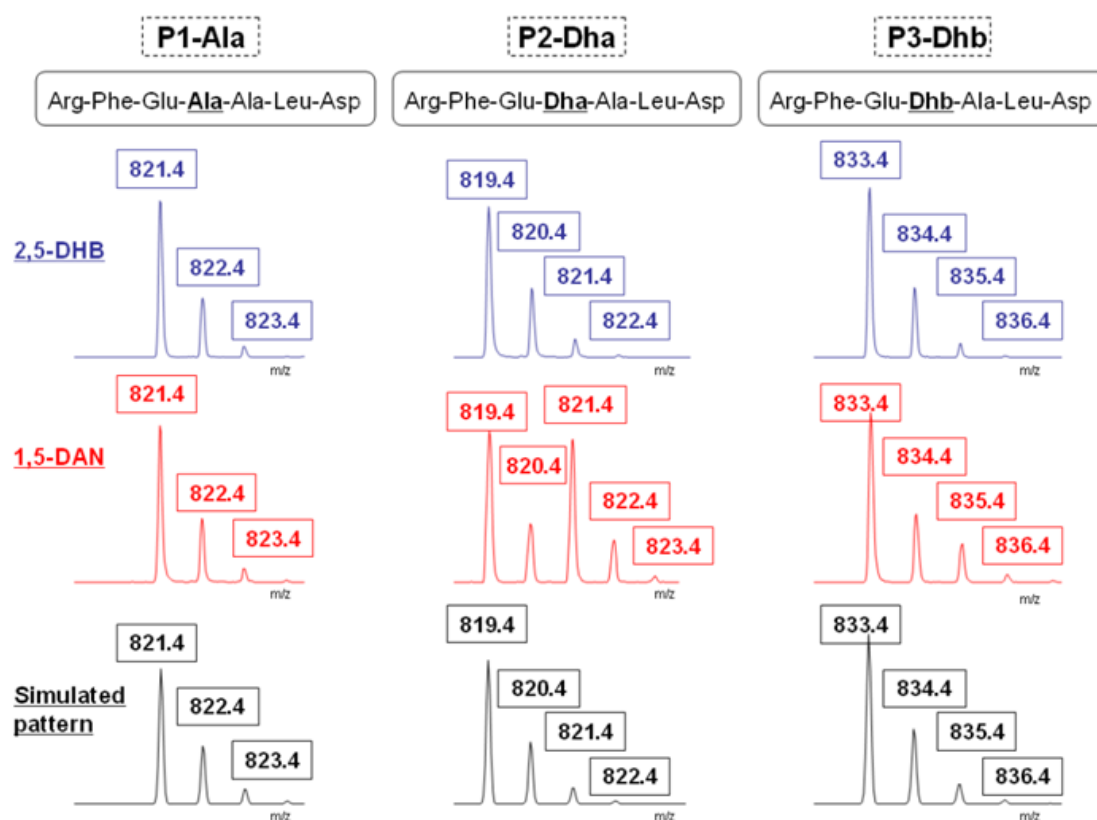


Figure 17 : Comparaison des profils isotopiques des peptides P1-Ala, P2-Dha et P3-Dhb analysés par MALDI-TOF dans les matrices 2,5-DHB et 1,5-DAN

La Figure 17 montre l'agrandissement de spectres des trois profils isotopiques des peptides analysés dans 2,5-DHB et 1,5-DAN en comparaison avec le profil isotopique simulé au moyen du logiciel Data Analysis 3.4.

La comparaison entre le profil simulé et le spectre obtenu en 2,5-DHB ne souligne pas de différence notable. Par contre, les profils des trois peptides synthétiques obtenus par ionisation MALDI avec la matrice 1,5-DAN, sont différents, ainsi que l'hypothèse de base pouvait le laisser penser.

Une augmentation massive du pic à la masse  $[M+H+2]^+$  peut être soulignée pour le peptide P2-Dha, tandis que  $[M+H+2]^+$  augmente également mais de manière beaucoup moins nette dans le spectre du peptide P3-Dhb. Enfin, le spectre du peptide P1-Ala, ne contenant aucune double liaison réductible, présente, tant dans le 1,5-DAN que dans le 2,5-DHB, une distribution isotopique classique.

Ces observations tendent à confirmer l'hypothèse initiale d'une réduction spécifique de la double liaison non méthylée Dha du peptide P1-Dha, tandis que la double liaison méthylée est quant à elle, beaucoup moins réduite lors de l'ionisation MALDI dans 1,5-DAN.

Afin de vérifier l'hypothèse de cette nouvelle propriété réductrice du 1,5-DAN, ainsi que pour confirmer la localisation du site de réduction, les trois peptides synthétiques ont été analysés par MALDI-MS/MS (PSD – Post Source Decay).

### *5.3.2.3 Analyse de peptides synthétiques par MALDI-MS/MS dans 1,5-DAN et 2,5-DHB*

La fragmentation de peptides réduits pourrait être extrêmement utile car le profil isotopique des fragments devrait permettre de localiser la position de la double liaison. En effet, les fragments contenant la double liaison réduite devraient, selon toute vraisemblance, présenter un pic  $[M+H+2]^+$  très intense au niveau du massif isotopique de cette région de  $m/z$  tandis que les fragments ne contenant pas de site réductible (ou de double liaison réduite) devraient présenter un massif isotopique « classique » correspondant à une molécule unique.

En général, l'analyse PSD donne majoritairement lieu à des fragments b et  $y^{151-154}$ . Les trois peptides synthétiques P1-Ala, P2-Dha et P3-Dhb ont effectivement donné lieu à des fragments PSD de type b, mais également des fragments moins classiques b-17, correspondant à une perte de neutre ( $NH_3$ ).

La Figure 18 présente le spectre MS/MS obtenu pour le peptide P2-Dha. Comme ce peptide présente la plus importante réduction, l'étude poussée de son spectre MS/MS permettra de vérifier l'endroit précis de la réduction en fonction des fragments.

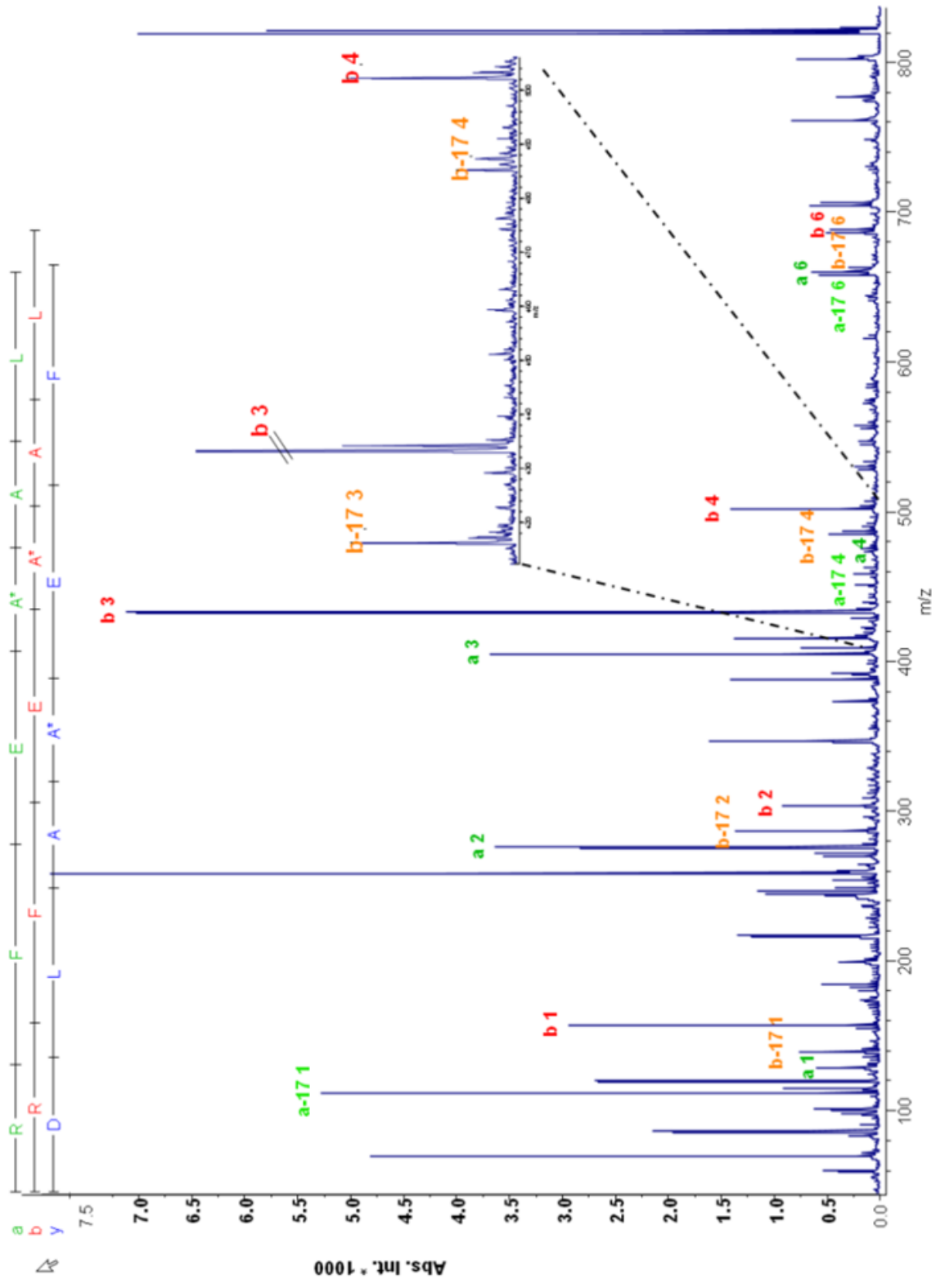


Figure 18 : Spectre PSD MS/MS du peptide P2-Dha obtenu avec la matrice MALDI 1,5-DAN

Le Tableau 10 résume la majorité des ions identifiés au cours des enregistrements MS/MS, ainsi que l'apparence de la distribution isotopique, à savoir:

n : distribution isotopique "n"ormale

r : distribution isotopique modifiée car peptide "r"éduit

En observant cette table, on remarque très nettement que la corrélation entre le pattern attendu et le pattern finalement observé est presque parfaite, à l'exception d'un seul fragment b<sub>4</sub>, lequel est vraisemblablement caché par un autre ion (provenant d'un fragment interne par exemple).

*Tableau 10 : Ions identifiés en MS/MS*

<b>Ion</b>	<b>m/z</b>	<b>Distribution isotopique théorique</b>	<b>Distribution isotopique expérimentale</b>
<i>a</i> <sub>2</sub>	276,17	n	n
<i>a</i> <sub>4</sub>	474,30	r	r
<i>a</i> <sub>6</sub>	658,50	r	r
<i>b</i> <sub>2</sub>	304,21	n	n
<i>b</i> <sub>4</sub>	502,23	r	<b>n</b>
<i>b</i> <sub>6</sub>	686,42	r	r
<i>a</i> <sub>2-17</sub>	259,14	n	n
<i>a</i> <sub>4-17</sub>	457,21	r	r
<i>a</i> <sub>6-17</sub>	528,30	r	r
<i>b</i> <sub>2-17</sub>	287,15	n	n
<i>b</i> <sub>4-17</sub>	485,19	r	r
<i>b</i> <sub>6-17</sub>	669,36	r	r
<i>b</i> <sub>2+18</sub>	322,18	n	n
<i>b</i> <sub>4+18</sub>	-	r	-
<i>b</i> <sub>6+18</sub>	704,44	r	r

Enfin, la Figure 19 montre, en agrandissant deux zones du spectre de fragmentation de P2-Dha, les différences nettes entre un massif « normal » et un massif « réduit ».

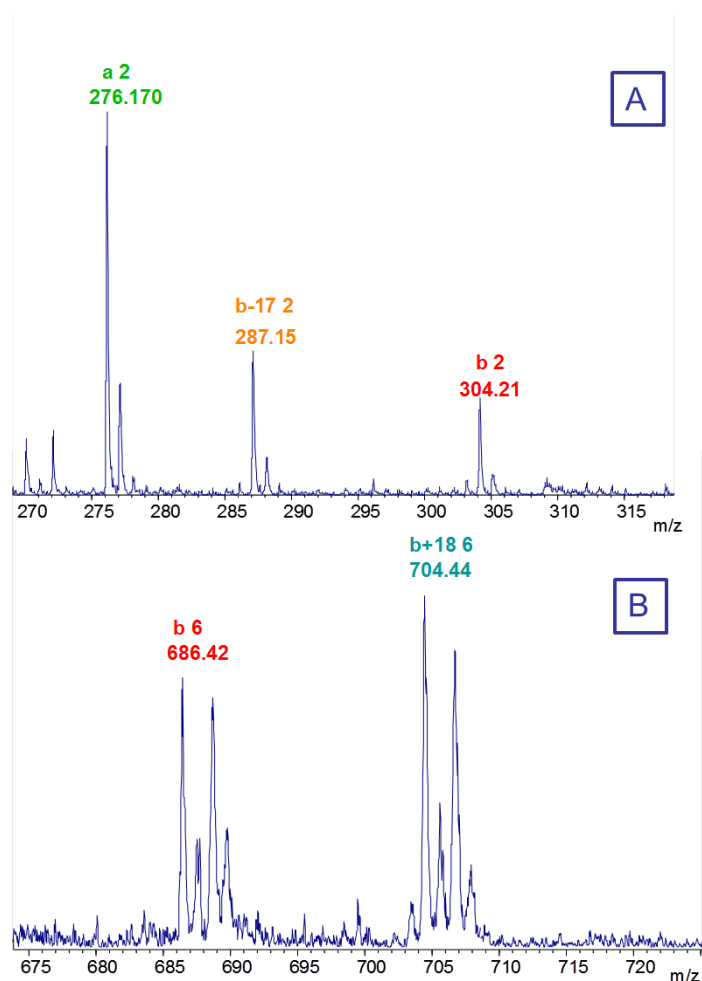


Figure 19 : Agrandissements du spectre MS/MS de P2-Ala obtenu à l'aide de la matrice 1,5-DAN : exemples de pics présentant une distribution "normale", observée pour les fragments a<sub>2</sub>, b<sub>2-17</sub> et b<sub>2</sub> (A) et une distribution "réduite" avec les ions b<sub>6</sub> et b<sub>6+18</sub> (B)

Ces expériences permettent donc de confirmer que la matrice 1,5-DAN possède la propriété de réduire certaines doubles liaisons. En conséquence, nous pouvons conclure que, dans le cas des microcystines contenant le groupement (M)Dha en position 7 du cycle heptapeptidique, le pic observé à la masse [M+H+2]<sup>+</sup> présente une intensité nettement augmentée et cette augmentation est imputable à la réduction, durant l'ionisation MALDI par la matrice 1,5-DAN, de la liaison exocyclique de l'acide aminé (M)Dha.

## 6. CONCLUSIONS

L'objectif de cette partie du travail était la mise au point d'une méthode d'ionisation de type (MA)LDI, qui permette l'ionisation sans interférence en masse, de plusieurs types de toxines dans la gamme de masses [250-1200] Da.

Nous avons, après revue de littérature, testé de nombreuses alternatives, publiées et donc validées par la communauté scientifique mais ces méthodes ont été globalement inefficaces.

Ainsi, les méthodes « sans matrices », pourtant plébiscitées, à l'image de la méthode DIOS, ont été un échec total dans le cadre de l'ionisation de nos toxines. Nous parlons du DIOS, mais la technique NALDI, commercialisée par Bruker et dont nous n'avons pas détaillé les aspects techniques car nous n'avons pu obtenir aucune donnée exploitable, a également été évaluée, sans succès.

Sur papier, les matrices transparentes et à haut poids moléculaire étaient également très convaincantes. Dans ce cas, bien que les résultats ne soient pas positifs pour nos toxines, nous restons d'avis que lorsque la, ou les molécules ad hoc auront été mises en évidence, le principe pourra fonctionner et permettre l'obtention de spectres dénués de bruit, interférences matricielles et clusters dans la gamme de masse ciblée [0-500] Da. Notons que les matrices porphyrines ont été globalement légèrement supérieures aux autres matrices alternatives, bien qu'elles aient été abandonnées car elles ne couvraient pas l'ensemble des analytes. En outre, au cours de ce travail, les molécules ciblées se sont naturellement concentrées sur les microcystines, en raison d'une occurrence plus importante en Belgique par rapport aux autres toxines envisagées. Cette évolution a constitué une étape importante car la nécessité absolue d'une matrice sans interférence aux faibles masses est devenue secondaire. En effet, la gamme de masse des microcystines est centrée autour du  $m/z = 1000$  Da, ce qui permet l'utilisation de matrices plus conventionnelles. Dans le cas des porphyrines par contre, la masse moléculaire des matrices devenait un véritable frein et aurait nécessité d'être encore plus élevée pour être applicable à l'analyse de microcystines.

Les matrices inorganiques n'ont pas été plus convaincantes, au même titre que les matrices « mine de crayon ». Si le concept des mines de crayon était très intéressant, de par la facilité apparente d'obtention des matrices et de préparation d'échantillon, nous avons été surpris, notamment par la présence de clusters de carbone espacés de 12 unités de masse, dans la faible gamme de masse. Cette distribution surchargeait considérablement la gamme de masse que nous voulions la plus propre possible et nous a conduit à immédiatement abandonner cette matrice.

Enfin, nous avons jusqu'ici uniquement abordé l'aspect ionisation, car nous n'avons pas pu aller plus loin avec la majorité des matrices alternatives évaluées. Cependant, nous souhaitons également obtenir, outre l'ionisation effective de nos analytes cibles, leur quantification.

Ceci nous mène à la partie de ce chapitre, consacrée aux matrices ioniques liquides. Indubitablement ces dernières ont été les plus performantes en termes

d'ionisation de nos analytes. Ainsi que décrit précédemment, de nombreuses mises au point ont été effectuées, traduisant la confiance que nous avons en cette technique alternative.

Toutefois, en définitive, les liquides ioniques, s'ils permettent effectivement de réduire légèrement le bruit, ne constituent pas la solution absolue dans notre cas. Leur capacité d'ionisation est effectivement élevée, mais, bien qu'elles permettent d'ioniser effectivement l'ensemble des toxines ciblées, elles ne conduisent pas à l'obtention de spectres exempts d'interférences aux basses masses.

En parallèle, une autre voie d'accès à un signal spécifique a été investiguée. En effet, pour parvenir à une élucidation structurale formelle de nos analytes, nous avons exploité les propriétés réductrices d'une nouvelle matrice, le 1,5-DAN, qui ont permis la mise en place d'un outil permettant une identification facilitée de la famille des microcystines.

Cette nouvelle propriété du 1,5-diaminonaphtalène (1,5-DAN) a été soulignée et confirmée en cette fin de chapitre. Outre sa capacité de favoriser le phénomène d'ISD, d'agir en tant que promoteur d'ionisation en MALDI et sa propriété de réduction de ponts disulfures, nous avons démontré que 1,5-DAN est également capable de réduire spécifiquement certaines liaisons carbone-carbone. Le mécanisme impliqué dans cette réduction fait encore l'objet d'études à l'heure actuelle, bien que l'hypothèse du transfert d'hydrogène radicalaire soit la plus probable<sup>155-157</sup>. Toutefois, sur base de la littérature et des résultats obtenus lors de l'ionisation de microcystines dans le 1,5-DAN, nous pouvons classifier le pouvoir réducteur de 1,5-DAN de la manière suivante : S-S>C=C>N-Cα<sup>55,156</sup>

Ces résultats sont prometteurs car ils permettent d'envisager de nombreuses applications suite à la découverte de cette propriété supplémentaire de la matrice 1,5-DAN. En effet, l'utilisation de la matrice réductrice, comparée au signal enregistré sur une matrice classique de type 2,5-DHB, permet l'obtention rapide et peu onéreuse, d'informations structurales concernant les microcystines analysées. Dans le cadre de l'analyse ciblée de microcystines, cette application permet de discriminer les microcystines possédant les acides aminés de type alanine ou sérine des acides aminés de type Dhb et Dha au sein du cycle peptidique. Les limites de détection, pour les microcystines LR, RR, YR et la nodularine sont de l'ordre de 100 fmol.

Le développement d'une méthode nouvelle n'a pas pour objectif, en première intention, de remplacer les méthodes plus lourdes telles la RMN (1D ou multidimensionnelle) ou les analyses d'acides aminés pour la caractérisation précise des microcystines. Cette approche se veut être un test rapide, d'interprétation simple et permettant une classification préliminaire des microcystines contenues dans un bloom de cyanotoxines. Bien que les microcystines présentant le groupement Dha dans leur structure soient majoritaires, de nombreuses microcystines incorporent le groupement Dhb, l'acide aminé alanine (Ala) ou la sérine (Ser).

Cette méthode permettrait de savoir si la microcystine analysée contient soit le groupement Dha (augmentation massive du pic à  $m/z = [M+2+H]^+$  ; soit le groupement Dhb (augmentation légère du pic à  $m/z = [M+2+H]^+$ ), soit le groupement Ala ou Ser (pas de double liaison donc distribution isotopique).

L'application du pouvoir réducteur de 1,5-DAN pourrait encore être étendue à une grande variété de composés chimiques et biologiques. Couplée à l'analyse MS/MS, l'ionisation réductrice par MALDI en utilisant 1,5-DAN pourrait permettre la localisation de doubles liaisons spécifiques et pourrait s'appliquer à la chimie organique, la biologie, pétrochimie ou la métabolomique par exemple.

Par ailleurs, une analyse de microcystines contenant le groupement Dhb a pu être menée (non commercialement accessibles mais fournies par deux groupes de recherche contactés au cours de ce travail). Cette analyse dans des conditions « réelles » a permis de constater que les échantillons reçus ne contenaient pas de groupement Dha. Ainsi, alors que les microcystines « classiques », qui contiennent le Dha, subissent une réduction nettement et aisément détectable lors de leur analyse MALDI en utilisant le 1,5-DAN, les échantillons n'ont, eux, subi qu'une réduction partielle nettement inférieure à celle observée pour l'acide aminé Dha. Le chapitre 3 détaillera cette application environnementale ainsi que les informations ayant pu être obtenues grâce à la caractérisation structurale par MALDI-MS(/MS) avec ionisation par 1,5-DAN et 2,5-DHB.

Cependant, avant de pouvoir exploiter l'outil analytique qu'est la matrice 1,5-DAN, il est indispensable de s'assurer de disposer d'un échantillon environnemental le plus purifié possible. A cette fin, le chapitre suivant expose et discute la mise au point de la séparation HPLC d'un mélange de toxines.

## **CHAPITRE II : OPTIMISATION DE LA SÉPARATION HPLC DE CYANOTOXINES**



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique d'une particule de silice greffée par un ligand T3 trifonctionnel (Waters Atlantis) .....	96
Figure 2 : Gradient évalué sur les colonnes monolithique et C18 .....	99
Figure 3 : Chromatogramme TIC de la séparation du mélange de Concentration 2 sur la PepSwift monolithique (haut) et l'Atlantis C18 (bas) .....	101
Figure 4 : Chromatogramme TIC (Atlantis C18) reconstruit sur base des ions de saxitoxine et spectres MS/MS des ions de m/z = 300.12 Da enregistrés à 5.59 min et 13.44 min .....	102
Figure 5 : Chromatogramme TIC (Atlantis C18) reconstruit sur base des ions de la néosaxitoxine et spectres MS/MS des ions 316.12 enregistrés à 5.09 min et 13.37 min .....	103
Figure 6 : Structure chimique de la cylindrospermopsine, la saxitoxine et la néosaxitoxine .....	104
Figure 7: Gradients évalués sur la colonne ZIC HILIC. En rouge sur le graphique, le gradient évalué pour un solvant B constitué de NH <sub>4</sub> Ac de concentration 10 ou 50 mM en solution aqueuse acide (0.1% FA) et en bleu, le gradient évalué pour une composition de solvant B d'eau acidifiée par 0.1% FA .....	105
Figure 8 : Chromatogramme de la cylindrospermopsine, la néosaxitoxine et la saxitoxine sur colonne ZIC® HILIC Sequant avec gradient Eau et détection MS - Triple Quadripôle Quattro Ultima Platinum Waters en mode MRM positif...	106
Figure 9 : Chromatogramme de la microcystine LR et la nodularine sur colonne ZIC® HILIC Sequant avec gradient Amonium 50 mM et détection MS - Triple Quadripôle Quattro Ultima Platinum Waters en mode MRM positif.....	107
Figure 10 : Illustration des chromatogrammes présentant des facteurs de résolution de 0.75 - 1 - 1.5 .....	108
Figure 11 : Gradient évalué sur la colonne Atlantis aux débits 0,3 – 0,7 et 1 µL/min .....	110
Figure 12 : Chromatogrammes TIC du mélange "Concentration 1" obtenus sur la colonne Atlantis C18 en variant les débits de phase mobile à 0.3 - 0.7 et 1 µL/min .....	111
Figure 13 : TIC et traces chromatographiques de la saxitoxine, néosaxitoxine et cylindrospermopsine sur Atlantis C18 avec débit de 0.7 µL/min.....	112

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition et concentration des mélanges de toxines .....	98
Tableau 2: Conditions expérimentales des injections sur la colonne monolithique et sur la colonne C18 .....	99

Tableau 3: Ordre d'élution des composés élués des colonnes PepSwift et Atlantis par le gradient décrit à la Figure 2.....	100
Tableau 4 : Données techniques de la colonne ZIC® HILIC (Sequant) et conditions de gradient des injections.....	105
Tableau 5 : Facteur de résolution des constituants du mélange de toxines observés sur les colonnes monolithiques (PepSwift) et C18 (Atlantis).....	108
Tableau 6 : Ordre d'élution des composés élués de la colonne Atlantis par le gradient décrit à la Figure 11 avec les débits de 0.3, 0.7 et 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ .....	110
Tableau 7 : Facteur de résolution des constituants du mélange de toxines observés sur la colonne C18 (Atlantis) avec des débits de 0,3 – 0,7 et 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ .....	113

## 1. INTRODUCTION

La finalité de ce travail étant la mise au point d'une méthode d'analyse de cyanotoxines à partir d'échantillons environnementaux, une séparation préalable des constituants d'un tel échantillon est indispensable. Ce chapitre détaille les différentes étapes suivies qui ont permis d'aboutir à l'établissement d'une méthode de séparation de toxines organiques par chromatographie liquide.

Un second objectif technique était que cette séparation HPLC puisse être, non seulement couplée à une source ESI, mais aussi à un robot permettant le dépôt de l'éluat sur une plaque MALDI, afin d'exploiter la complémentarité des deux sources. En effet, l'ESI est une technique qui produit des ions multichargés, ce qui favorise souvent une meilleure fragmentation (répulsion entre les charges) et l'obtention d'informations structurales plus riches quant au composé cible. De plus, l'ESI permet le développement de méthodes quantitatives, ce qui est beaucoup plus complexe en MALDI. L'ionisation MALDI quant à elle, est globalement plus tolérante aux impuretés, ce qui est un vrai plus dans le cadre de l'analyse d'extraits environnementaux. Par ailleurs, l'utilisation de matrices réductrices, en complément aux matrices classiques, donne accès à des informations supplémentaires quant à la réduction de doubles liaisons ou de ponts disulfures par exemple. Le couplage LC-MALDI présente également l'avantage de pouvoir stocker la séparation HPLC, l'entièreté du dépôt n'étant jamais totalement consommée, et ré-analyser l'échantillon si nécessaire. Notons qu'étant donné le milieu très réducteur, l'ionisation MALDI ne produit généralement que les ions monochargés<sup>108,158-160</sup>.

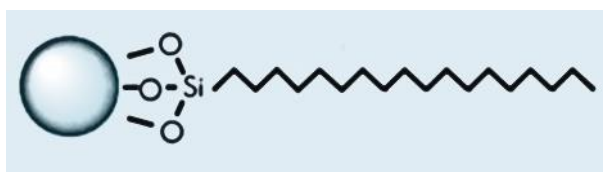
Ces deux techniques sont donc complémentaires et leur utilisation conjointe pourrait apporter une vraie valeur ajoutée aux résultats d'analyse en augmentant le taux d'identification des composants de l'échantillon.

Une revue de la littérature, effectuée en amont de la mise au point de la séparation HPLC (2014), a mis en évidence que l'utilisation de phases de type C18 greffées pour la séparation de cyanotoxines<sup>52,161-174</sup> était adaptée. Toutefois, certaines phases plus atypiques, de type C12 (phase silice greffée de chaînes de 12 carbones), phényl-éther ou monolithique ont également montré des résultats intéressants<sup>175-179</sup>. Par ailleurs, le mode isocratique est peu utilisé, devancé largement par des gradients linéaires, principalement binaires et parfois constitués de plusieurs pentes et paliers.

Cette revue de littérature a permis la sélection de deux colonnes les plus adéquates et compatibles avec le système HPLC utilisé, à savoir la nanoAcquity UPLC® (Waters).

La première colonne sélectionnée est la colonne C18 Atlantis (Waters). Il s'agit d'une colonne à base de silice greffée par un ligand à chaînes de 18 carbones (C18) trifonctionnel (T3). L'objectif de l'utilisation d'un ligand trifonctionnel est de faciliter l'accès des analytes et de la phase mobile à proximité de la phase stationnaire, et augmenter la rétention de composés plus polaires<sup>180</sup>. En effet, avec un ligand trifonctionnel, la densité de ligand est moindre qu'avec un ligand

monofonctionnel, rendant la phase stationnaire plus accessible à la phase mobile. La phase est de plus “endcappée”, ce qui signifie que les groupements silanol résiduels, après greffage, sont « désactivés » par réaction avec un petit composé, de type chlorure de triméthylsilyle par exemple. Notons que l’agent de « capping » n’est pas décrit par Waters. Sur cette colonne, la rétention est assurée par le partage des analytes entre la phase stationnaire (silice greffée T3, illustré sur la Figure 1) et la phase mobile. Cette phase a été développée afin de permettre la rétention et la séparation de composés plus polaires grâce à sa capacité d’utilisation sur une large gamme de pH ([2-8] et en combinaison avec des phases mobiles très polaires, pouvant aller jusque 100 % en eau.



*Figure 1 : Représentation schématique d'une particule de silice greffée par un ligand T3 trifonctionnel (Waters Atlantis)*

D'autre part, une colonne de type monolithique a également été évaluée. Ce type de phase présente la particularité d'être constituée d'une seule pièce (monolithe), à la différence des phases stationnaires classiques lesquelles sont particulaires. Les monolithes sont généralement synthétisés par polymérisation in situ dans une colonne et sont constitués d'une structure poreuse tridimensionnelle dont des macropores (>50nm) et des mésopores (2-50nm). Les macropores sont responsables de l'écoulement de la phase mobile tandis que les micropores sont le siège des interactions hydrophobes entre les analytes et la phase stationnaire.

La colonne monolithique évaluée est la PepSwift™ (Dionex Thermo Fisher Scientific) composée d'un copolymère de polystyrène-divinylbenzène. Ce type de colonne connaît un bel essor, en raison notamment de la grande stabilité des phases en fonction du pH par rapport aux phases classiques particulaires. Les colonnes monolithiques sont principalement utilisées pour la séparation de composés biologiques, des peptides aux protéines et leur mécanisme d'action est basé sur les interactions hydrophobes et les interactions  $\pi$  via le cycle aromatique du benzène<sup>179,181-184</sup>.

La comparaison des séparations chromatographiques obtenues sur les deux types de colonnes fait l'objet de la première partie du chapitre. La seconde partie du chapitre sera consacrée à l'évaluation des conditions de gradient, et particulièrement de débit, sur la colonne HPLC ayant montré les meilleurs résultats.

## **2. OPTIMISATION DE LA SÉPARATION HPLC**

### **2.1 Matériel et méthodes**

#### **2.1.1 Chemicals**

Toutes les toxines utilisées en tant que standard dans ce travail ont été, quel que soit le fournisseur, extraites de cultures ou d'échantillons contaminés. Après purification, impliquant généralement la chromatographie préparative, ils ont été commercialisés/envoyés au laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Liège. Les informations relatives au mode d'extraction et de purification sont résumées en annexe de ce travail.

L'acide formique (FA), les microcystines LR, RR, et YR et la nodularine ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Steinheim et Taufkirchen, Allemagne et Bornem, Belgique).

La microcystine LA, la microginine, les cyanopeptolines 1007 et 1041, ont été achetées chez Alexis Biochemicals (Enzo Life Sciences, Zandhoven, Belgium).

La saxitoxine, la néosaxitoxine et la cylindrospermopsine provenaient du NRC (National Research Council) Canada.

La Microcystine [D-Asp<sup>3</sup>, Dhb<sup>7</sup>]-MC-HtyHty a été offerte par l'équipe du Dr Rainer Kurmayer de l'Austrian Academy of Sciences et la Microcystine [D-Asp<sup>3</sup>, Dhb<sup>7</sup>]-MC-RR a généreusement été envoyée par l'équipe du Dr Judith Blom de l'Université de Zürich.

Tous les solvants utilisés étaient de qualité HPLC. L'eau utilisée était de l'eau Milli-Q.

#### **2.1.2 Préparation d'échantillon**

Un pool contenant un mélange de standards de toxines a été préparé et utilisé, sous forme de deux dilutions, pour la mise au point de la méthode.

Le Tableau 1 présente la composition des deux dilutions du pool ainsi que les concentrations du mélange.

#### **2.1.3 Paramètres HPLC et MS (/MS)**

Les colonnes évaluées sont d'une part une colonne monolithique (PepSwift™ Capillary column 100 µm x 250 mm – Thermo Scientific) et d'autre part une colonne C18 (Atlantis T3 75 µm x 150 mm – Waters).

La mise au point de la méthode HPLC a été réalisée sur un instrument de type nano UPLC (nanoAcquity UPLC® de chez Waters) couplé avec un analyseur hybride Quadripôle-Orbitrap (Thermo Fischer Scientific) en mode Full MS et MS/MS (et Full Lock MS avec liste d'inclusion permettant de préprogrammer le

suivi et la fragmentation d'ions mono- et dichargés). La fragmentation MS/MS a été réalisée en mode HCD (Higher Energy Collisional Dissociation).

L'analyse des spectres et données a été réalisée avec le logiciel Xcalibur 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific).

*Tableau 1 : Composition et concentration des mélanges de toxines*

<b>Toxine</b>	<b>Masse monoisotopique (Da)</b>	<b>Concentration 1 (µM)</b>	<b>Concentration 2 (µM)</b>
Cylindrospermopsine	415,116	0,594	0,119
Microcystine LR	994,548	0,0295	0,00589
Nodularine	824,977	0,0546	0,0109
Saxitoxine	299,134	0,586	0,117
Néosaxitoxine	315,129	0,586	0,117
Microcystine RR	1037,565	0,544	0,109
Microcystine YR	1044,528	0,272	0,00544
Microginine	690,329	0,408	0,0816
Microcystine LA	909,485	0,816	0,163
Microcystine [D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HtyHty	1065,505	0,258	0,0517
Microcystine [D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	1023,549	2,04	0,408
Cyanopeptoline 1041	1040,473	0,522	0,104
Cyanopeptoline 1007	1006,512	0,54	0,108

## **2.2 Résultats et discussion**

### **2.2.1 Evaluation des colonnes monolithiques et C18**

Les deux colonnes sur lequel le choix s'est porté étant très différentes de par leur technologie de fabrication principalement, la réalisation d'une expérience comparative dans les mêmes conditions n'était pas réaliste. Ainsi, par exemple, la température optimale d'utilisation de la colonne monolithique a été empiriquement estimée à 60°C tandis que les conditions optimales d'utilisation de la C18 Atlantis (littérature et constructeur) préconisaient une température de 40°C.

Afin d'estimer leur efficacité, chacune dans les conditions optimales définies par le constructeur, la littérature ou l'expérience, la comparaison est effectuée dans les conditions résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2: Conditions expérimentales des injections sur la colonne monolithique et sur la colonne C18

	<b>Monolithique PepSwift</b>	<b>C18 Atlantis</b>
Pool	Concentration 2	Concentration 2
Volume injecté (μL)	4 μL	4 μL
Gradient		
Solvant A= H <sub>2</sub> O + 0.1 % FA	Voir Figure 2	Voir Figure 2
Solvant B= ACN + 0.1 % FA		
Débit (μL/min)	0.7	1
Température de colonne (°C)	60	40
Dimensions colonne	100 μm x 250 mm	75 μm x 150 mm
Diamètre particules (μm)	Monolithe	3
Diamètre pores (Å)	3750	100

Le gradient appliqué, bien que les débits soient différents pour les deux colonnes, est identique en termes de pente et est représenté dans la Figure 2. Il s'agit d'un gradient binaire A-B où A est de l'H<sub>2</sub>O acidifiée par 0.1 % d'acide formique et B est de l'acétonitrile acidifiée par 0.1 % d'acide formique. Les conditions initiales du gradient sont de 97% en H<sub>2</sub>O + 0.1 % FA. Dans ces conditions, les composés moins polaires sont retenus sur la colonne tandis que les composés ioniques seront élués avec la phase mobile. Le pourcentage de solvant organique est augmenté graduellement, pendant 30 minutes, pour atteindre 40% d'ACN + 0.1 % FA. Cette augmentation progressive permet d'éluer petit à petit, les composés, du plus polaire au moins polaire. Après 30 minutes, la pente du gradient augmente rapidement pour atteindre 70% de solvant B, lesquels sont maintenus 3 minutes durant, afin d'éluer tous les solutés apolaires. La dernière partie du gradient permet de replacer la colonne HPLC en conditions initiales et de permettre l'injection suivante.

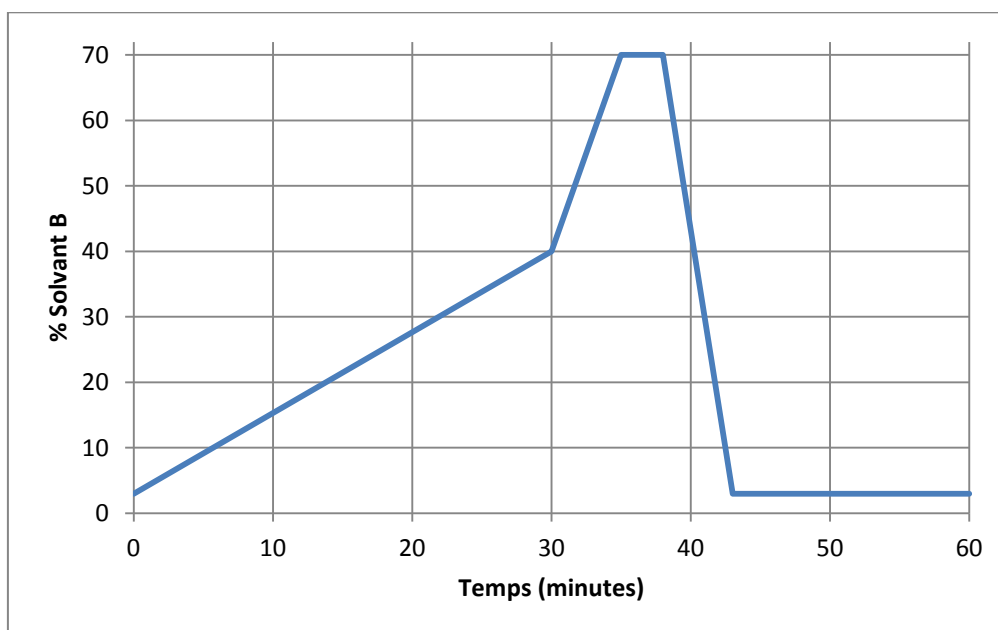



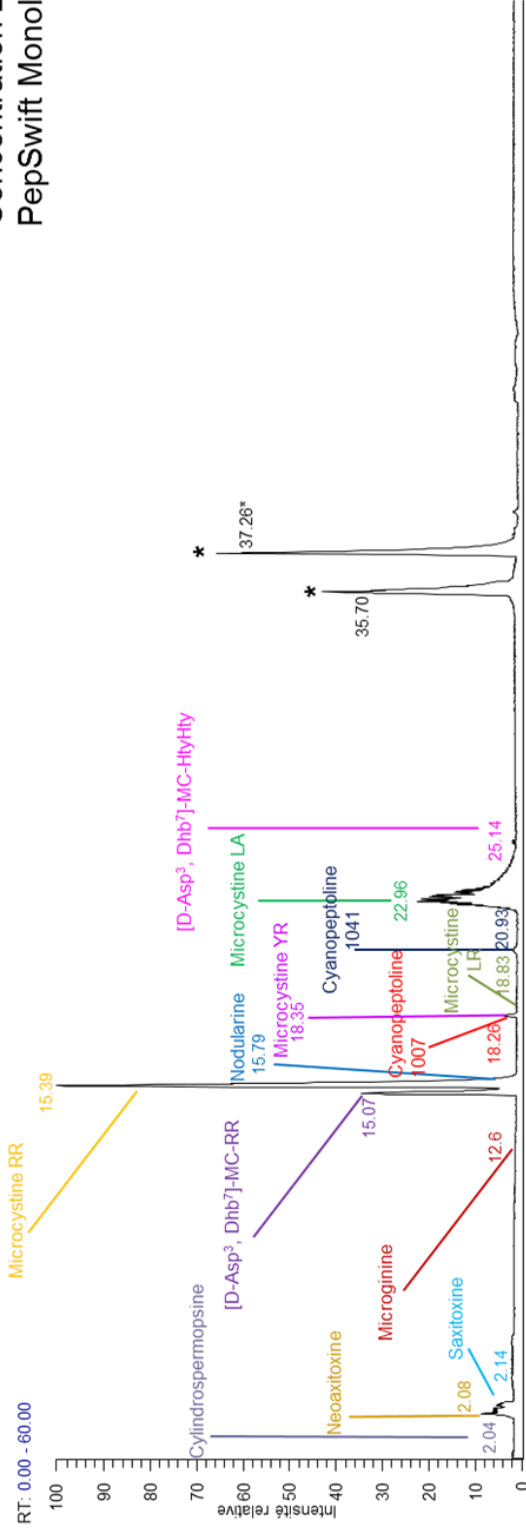
Figure 2 : Gradient évalué sur les colonnes monolithique et C18

Les chromatogrammes obtenus sur les deux colonnes, et détectés par MS et MS/MS (Q Exactive), sont présentés dans la Figure 3. La première observation est que l'ordre d'élution est pratiquement identique sur la colonne monolithique et sur la colonne C18 (Tableau 3). En effet, à l'exception de la néosaxitoxine qui est détectée à deux temps de rétention dans le chromatogramme obtenu à l'aide de la colonne Atlantis, l'ordre d'élution des composés est rigoureusement identique sur les deux colonnes.

Tableau 3: Ordre d'élution des composés élués des colonnes PepSwift et Atlantis par le gradient décrit à la Figure 2

 Ordre d'élution	<b>PepSwift Monolithique</b>	<b>Atlantis</b>
	Cylindrospermopsine	Néosaxitoxine 1
	Néosaxitoxine	Cylindrospermopsine
	Saxitoxine	Néosaxitoxine 2
	Microginine	Saxitoxine
	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	Microginine
	Microcystine RR	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR
	Nodularine	Microcystine RR
	Cyanopeptoline 1007	Nodularine
	Microcystine YR	Cyanopeptoline 1007
	Microcystine LR	Microcystine YR
	Cyanopeptoline 1041	Microcystine LR
	Microcystine LA	Cyanopeptoline 1041
	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HtyHty	Microcystine LA
-	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HtyHty	

Concentration 2  
PepSwift Monolithique



Concentration 2  
Atlantis C18

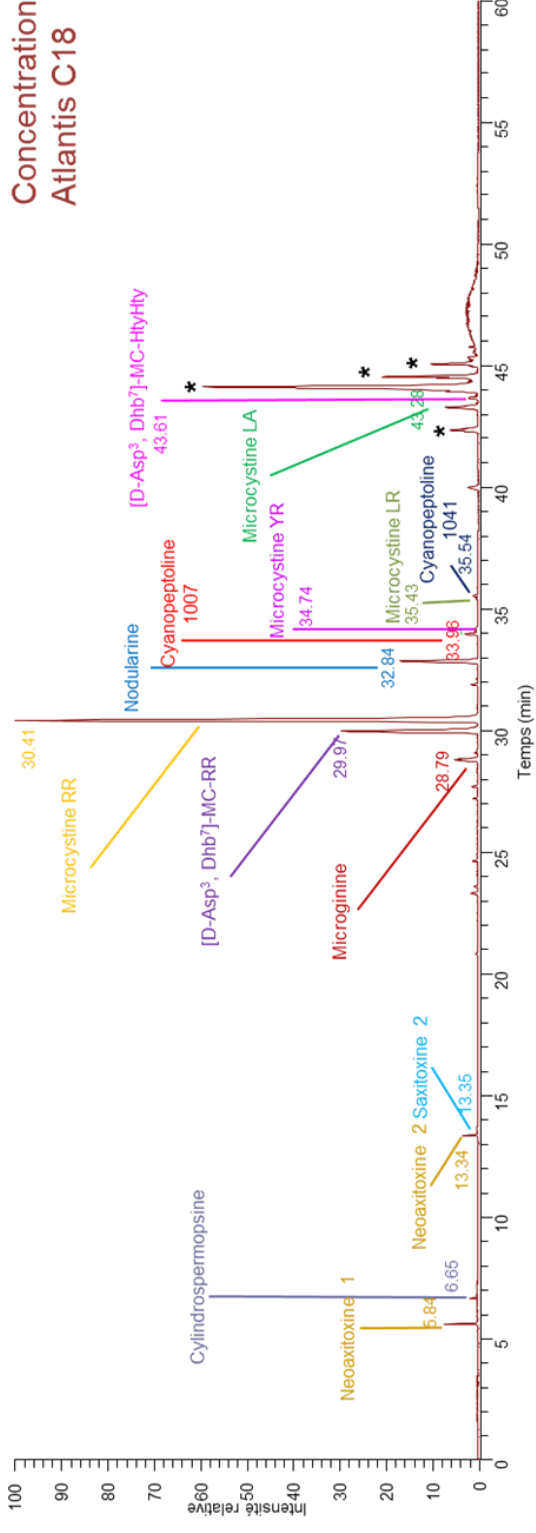


Figure 3 : Chromatogramme TIC de la séparation du mélange de Concentration 2 sur la PepSwift monolithique (haut) et l'Atlantis C18 (bas)

Les 13 toxines du mélange ont pu être identifiées dans les deux chromatogrammes obtenus grâce à la colonne monolithique et la colonne C18 Atlantis. Sur la colonne monolithique, trois toxines sont éluées en front de solvant, tandis que sur la colonne C18, les toxines saxitoxine et néosaxitoxine présentent un comportement particulier, semblant être détectées dès 5.8 minutes d'éluion mais également à 13.35 minutes. Afin de vérifier que les traces correspondent bien aux toxines saxitoxine et néosaxitoxine dans les deux massifs, l'analyse des spectres MS/MS est réalisée. Les Figure 4 et Figure 5 présentent les chromatogrammes reconstruits sur base du courant produit par les ions de la saxitoxine ( $m/z = 300.12$  Da) et de la néosaxitoxine ( $m/z = 316.16$  Da). Les spectres MS/MS des ions, aux deux temps de rétention du chromatogramme (5 et 13 minutes), sont représentés en insert sur chaque chromatogramme.

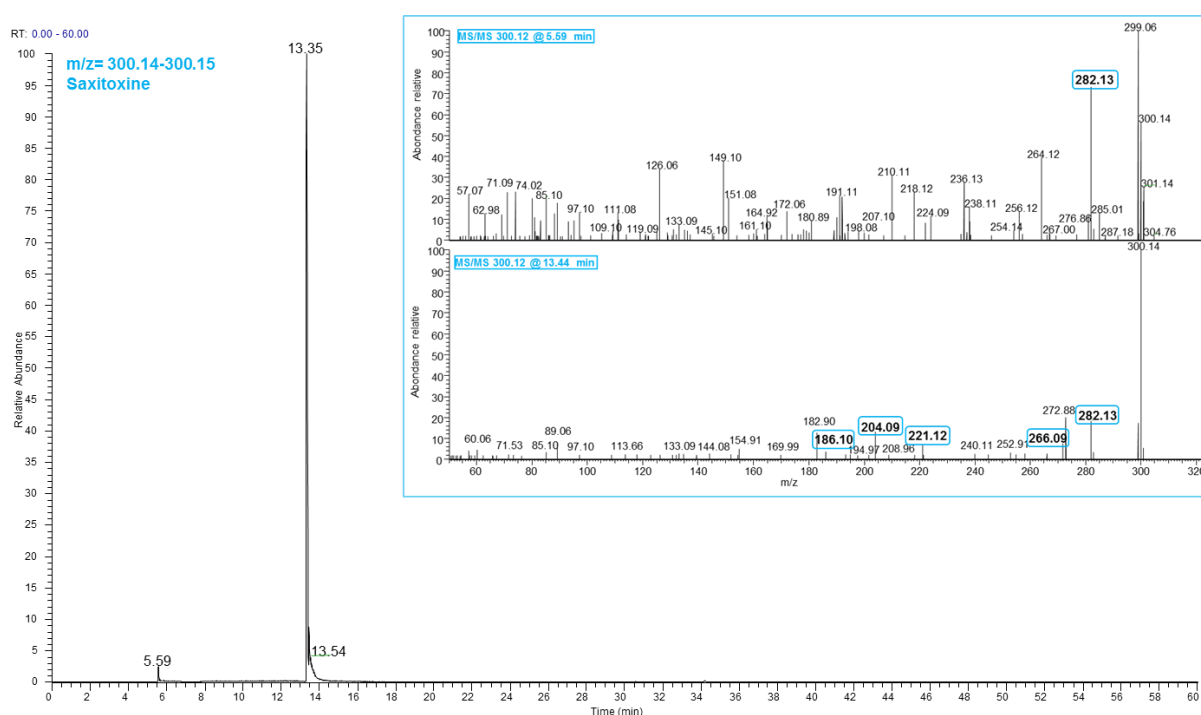


Figure 4 : Chromatogramme TIC (Atlantis C18) reconstruit sur base des ions de saxitoxine et spectres MS/MS des ions de  $m/z = 300.12$  Da enregistrés à 5.59 min et 13.44 min

Les spectres MS/MS de la saxitoxine, enregistrés à 5.59 et 13.44 minutes sont a priori peu semblables. Toutefois, comme mis en évidence dans la Figure 4, une transition est présente dans les deux spectres, à savoir la transition  $300 > 282$ . Cette transition pourrait être attribuable à la perte, peu spécifique, d'une molécule d'eau. D'autre part, seul le spectre MS/MS provenant du composé élué à 13.44 minutes présente les transitions caractéristiques de la saxitoxine (à savoir  $m/z = 266, 221, 204, 186$  Da)<sup>105,185</sup>. Aucune de ces transitions n'est présente dans le spectre MS/MS du pic éluant à 5.59 minutes. Il semblerait dès lors que la saxitoxine soit éluée uniquement à 13.44 minutes et que le composé éluant à 5.59 minutes soit un composé isobare et/ou un isomère.

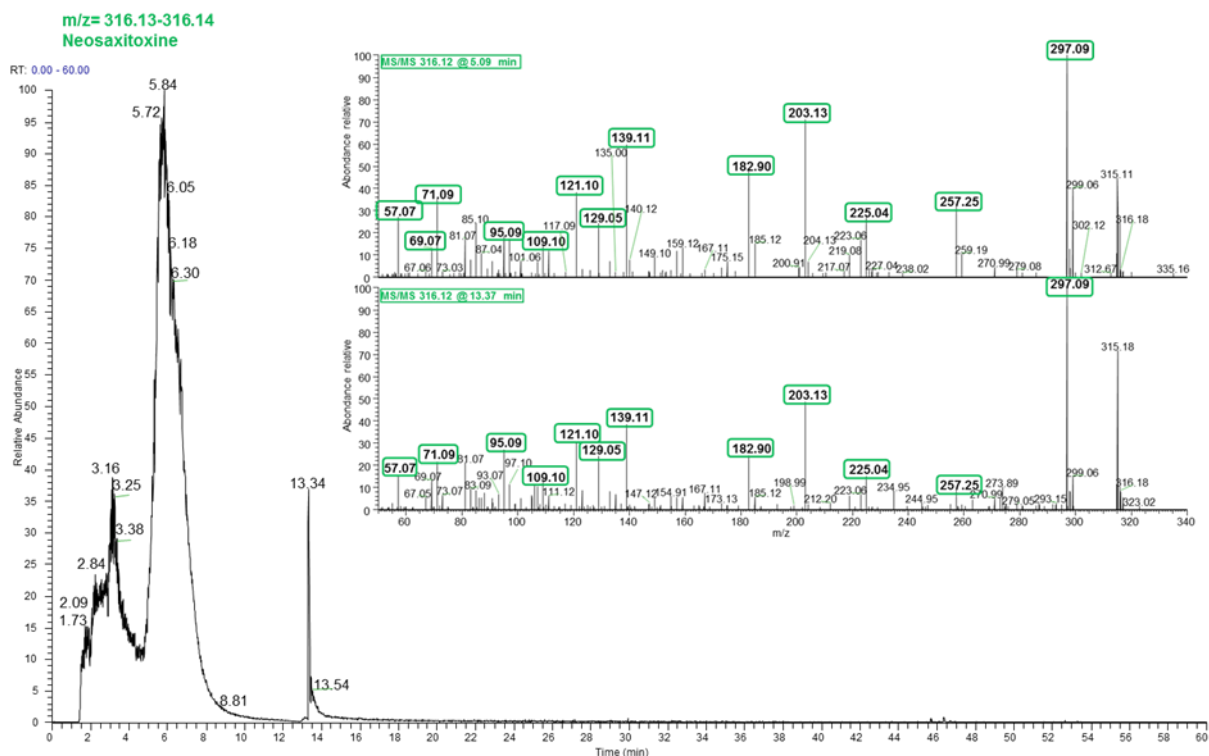


Figure 5 : Chromatogramme TIC (Atlantis C18) reconstruit sur base des ions de la néosaxitoxine et spectres MS/MS des ions 316.12 enregistrés à 5.09 min et 13.37 min

Les spectres MS/MS de la néosaxitoxine, enregistrés à 5.09 minutes pour le premier massif, et à la minute 13.34 pour le second massif, présentent quant à eux, de nombreux pics communs. Ainsi, outre les pics majoritaires, mis en évidence dans les spectres MS/MS et répertoriés à 257, 225, 203, 182.9, 139, 129, 121 109, 95, 71, 69 et 57 Da, les transitions caractéristiques de la néosaxitoxine ( $316 > 298$ ,  $316 > 238$  et  $316 > 220$ )<sup>105,186</sup>, bien que d'intensité faible, sont présentes dans les deux spectres MS/MS. Il semble donc que dans ce cas, la néosaxitoxine soit bel et bien présente dans les deux massifs.

L'absence de rétention, et la forme particulière des massifs attribués aux toxines cyanospermopsine, saxitoxine et néosaxitoxine voient certainement leur origine dans leur structure, particulièrement polaire, ainsi qu'illustré sur la Figure 6. Leur élution en front de solvant sur la colonne monolithique n'est pas une surprise étant donné que le mécanisme de rétention est ici principalement basé sur les interactions hydrophobes.

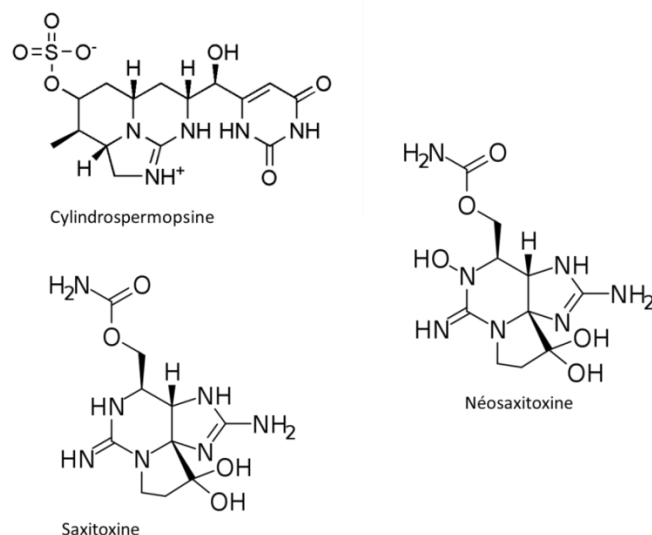


Figure 6 : Structure chimique de la cylindrospermopsine, la saxitoxine et la néosaxitoxine

Par ailleurs, bien que la colonne C18 Atlantis soit destinée à l'analyse de composés plus polaires, il semble que les limites soient atteintes lorsqu'il s'agit de toxines ioniques. En effet, la colonne est « endcappée », ce qui signifie que les groupements silanol résiduels, qui auraient pu interagir avec les toxines ioniques, sont, pour la plupart, neutralisés par le réactif de capping. D'autre part, les conditions initiales de gradient influencent probablement le comportement des toxines ioniques. En effet, les conditions initiales de phase mobile sont de 3 % ACN et 40 % ACN après 30 minutes. Afin de favoriser l'accroche des toxines ioniques, un pourcentage encore plus faible de solvant organique, voire une phase mobile 100 % aqueuse, auraient pu probablement mener à de meilleurs résultats.

Afin d'obtenir une meilleure rétention de ce type de toxine, il serait séduisant de travailler avec des colonnes destinées aux composés très polaires, voire ioniques, ou de travailler sur une colonne sur laquelle la séparation est basée sur des interactions hydrophiles (Hydrophilic Liquid Chromatography - HILIC). Dans ce but, la chromatographie HILIC a fait l'objet de quelques tests durant ce travail, dont les plus pertinents sont présentés au point suivant.

### 2.2.2 Evaluation d'une colonne HILIC

La colonne zwitterionique ZIC® HILIC (Sequant) a été évaluée sur un mélange de toxines ioniques et peptidiques, chacune à la concentration de 1  $\mu$ M, avec plusieurs gradients différents (Tableau 4 et Figure 7). Les spectres de masse ont été enregistrés sur un triple quadripôle muni d'une source ESI (Quattro Ultima Platinum Waters) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) positif et négatif.

Tableau 4 : Données techniques de la colonne ZIC® HILIC (Sequant) et conditions de gradient des injections

Colonne	ZIC® HILIC Sequant		
Echantillon (concentration)	Cylindrospermopsine, Saxitoxine, Néosaxitoxine, Microcystine LR, Nodularine (1µM)		
Volume injecté (µL)	20		
Solvant de l'échantillon	50/50 H <sub>2</sub> O/ACN		
Gradient (Figure 7)	Gradient Eau A= ACN + 0.1 % FA B= H <sub>2</sub> O + 0.1 % FA	Gradient Amonium A= ACN + 0.1 % FA B= NH <sub>4</sub> Ac 10mM dans H <sub>2</sub> O + 0.1 % FA	Gradient Amonium A= ACN + 0.1 % FA B= NH <sub>4</sub> Ac 50mM dans H <sub>2</sub> O + 0.1 % FA
Durée (min)	30		
Débit (mL/min)	0.6		
Température de colonne (°C)	40		
Dimensions colonne	2.1 x 150 mm		
Diamètre particules (µm)	5		
Diamètre pores (Å)	200		

Les gradients appliqués, bien que les pentes soient décalées et les solvants légèrement différents, sont identiques en termes de débits et représentés dans la Figure 7.

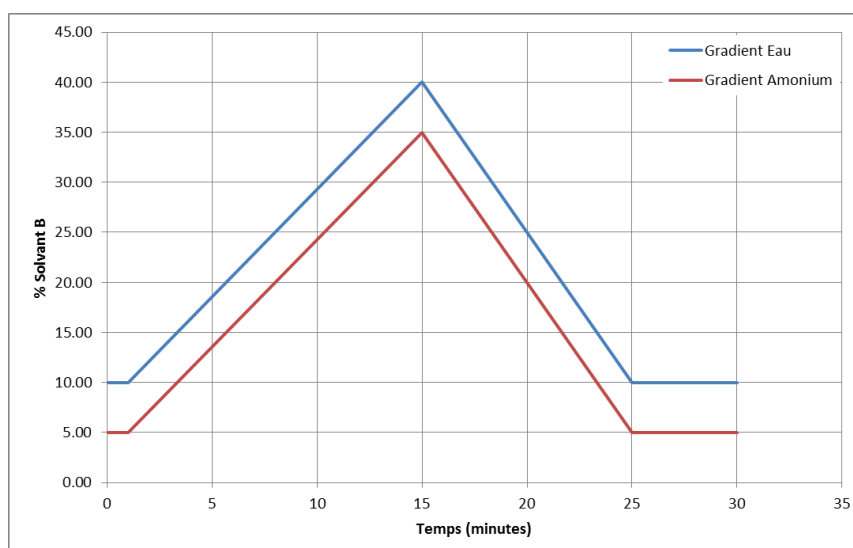


Figure 7: Gradients évalués sur la colonne ZIC HILIC. En rouge sur le graphique, le gradient évalué pour un solvant B constitué de NH<sub>4</sub>Ac de concentration 10 ou 50 mM en solution aqueuse acide (0.1% FA) et en bleu, le gradient évalué pour une composition de solvant B d'eau acidifiée par 0.1% FA

Il s'agit de gradients binaires A-B où A est de l'acétonitrile acidifiée par 0.1 % d'acide formique et B est de l'eau acidifiée par 0.1 % d'acide formique et contenant respectivement 0, 10 et 50 mM en acétate d'ammonium (NH<sub>4</sub>Ac). L'acétate d'ammonium a pour rôle d'augmenter la compétition pour les sites chargés et donc, de diminuer la rétention des composés ioniques. Sur ce type de phase, les conditions initiales du gradient sont majoritairement constituées de phase organique afin de favoriser la rétention des composés ioniques et polaires. Le pourcentage de phase aqueuse est augmenté graduellement, pendant 14 minutes, pour atteindre 35-40% de solvant aqueux. Cette augmentation progressive permet d'éluer petit à petit, les composés, du moins polaire au plus polaire. Après 15 minutes, la pente du gradient change afin de replacer la colonne dans les conditions initiales et permettre l'injection suivante.

Quel que soit le gradient évalué, la séparation de composés polaires et ioniques s'est effectivement révélée efficace (Figure 8). Toutefois, le chromatogramme et la séparation des composés peptidiques de type microcystines étaient perfectibles (Figure 9). La littérature rapporte en effet, pour la séparation de microcystines par HILIC, des profils chromatographiques peu satisfaisants, présentant des phénomènes d'asymétrie (tailing) et des largeurs importantes par rapport aux composés ioniques<sup>187</sup>.

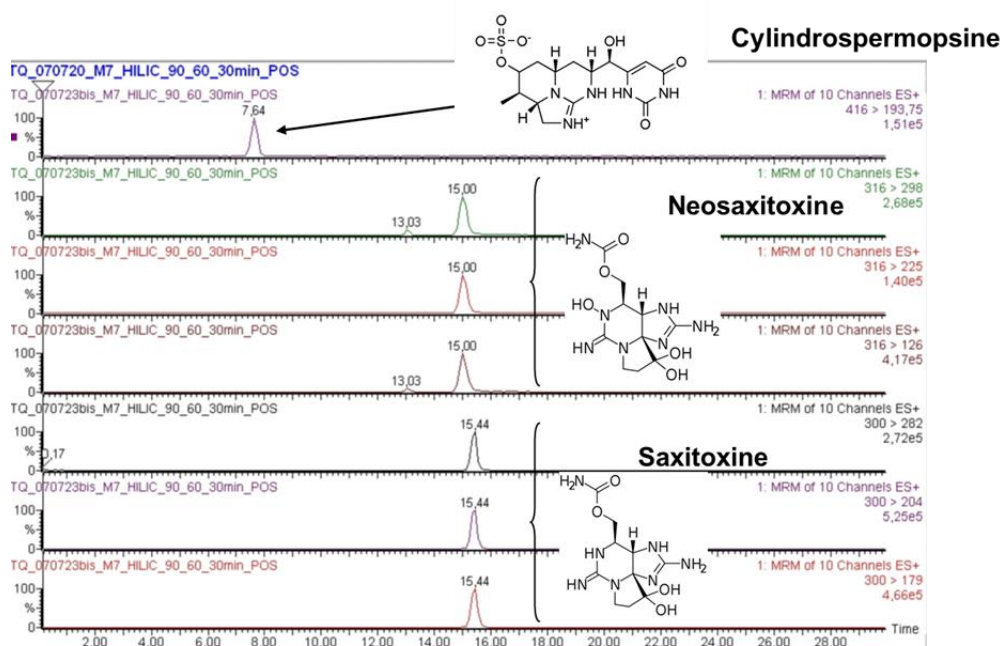


Figure 8 : Chromatogramme de la cylindrospermopsine, la néosaxitoxine et la saxitoxine sur colonne ZIC® HILIC Sequant avec gradient Eau et détection MS - Triple Quadripôle Quattro Ultima Platinum Waters en mode MRM positif

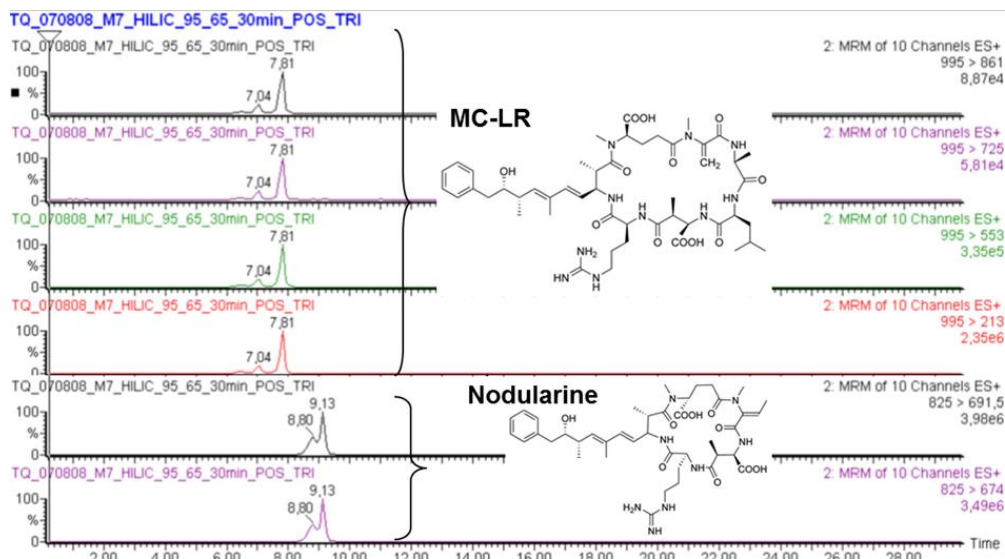


Figure 9 : Chromatogramme de la microcystine LR et la nodularine sur colonne ZIC® HILIC Sequant avec gradient Amonium 50 mM et détection MS - Triple Quadripôle Quattro Ultima Platinum Waters en mode MRM positif

D'autre part, lors de l'évaluation de la séparation HILIC, et quelles que soient les conditions de gradient, l'équilibration de la colonne n'était pas assurée, et la reproductibilité et la robustesse des résultats s'en trouvaient affectées. Enfin, les microcystines étant majoritaires dans les blooms de cyanobactéries en Belgique, la priorité a été donnée aux colonnes permettant leur accroche et leur séparation, c'est-à-dire les phases de type C18 ou monolithiques<sup>187</sup>.

### 2.2.3 Choix de la colonne HPLC

Dans le cadre de l'évaluation des colonnes monolithique et C18, l'identification de la majorité des pics a pu être réalisée, à l'exception de deux composés inconnus, présents sur le chromatogramme en colonne monolithique aux temps de rétention  $t_R = 35.70$  min et  $t_R = 37.26$  min (Figure 3). Ces impuretés, dont les masses respectives étaient de 682.54 Da et 739.61 Da, n'ont pas été retrouvées dans les blancs, ni dans le chromatogramme obtenu sur la colonne C18 Atlantis. Pour la colonne Atlantis, les pics en fin de chromatogramme ( $t_R = 44.53$  min, 45.05 min, 47.19 min) n'ont pas pu être identifiés mais chacun d'entre eux contenaient les ions de  $m/z = 437.19$  Da, 432.24 Da et 415.21 Da et étaient absents des blancs.

Il apparaît également clairement que les pics sont plus fins et mieux résolus dans le cas de la séparation via la colonne C18. Afin de rationaliser cette observation, le Tableau 5 présente le facteur de résolution, calculé pour chaque doublet de toxines successif dans le chromatogramme.

Ce facteur de résolution est calculé au moyen de la formule suivante :

$$R_{ab} = 2 \frac{t_{Rb} - t_{Ra}}{w_a + w_b}$$

Avec  $R_{ab}$  le facteur de résolution des pics a et b,  $t_{Ra}$  et  $t_{Rb}$  les temps de rétention des composés a et b et  $w_a$  et  $w_b$  la largeur du pic mesurée à la base. Ce facteur de résolution définit la séparation de deux composés en tenant compte de la forme des pics et de leur recouvrement éventuel. Ainsi qu'illustré dans la Figure 10, un facteur de résolution de 1,5 correspond à une séparation complète de a et b, c'est-à-dire un retour à la ligne de base (en vert dans le Tableau 5), une valeur de  $R_{ab}=1$  correspond à une séparation incomplète (en orange dans le Tableau 5) et pour les valeurs de  $R_{ab}$  inférieures à 0,75, les analytes a et b ne sont pas séparés (en rouge dans le Tableau 5).

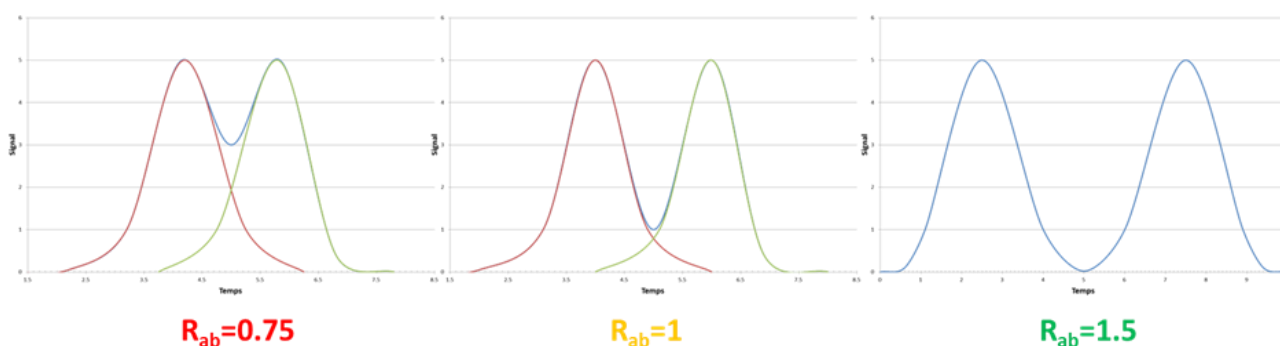


Figure 10 : Illustration des chromatogrammes présentant des facteurs de résolution de 0.75 - 1 - 1.5

L'observation des chromatogrammes ainsi que la comparaison des facteurs de résolution montre un léger avantage pour la colonne C18 ( $Atl/Pep > 1$ ). Par ailleurs, la largeur des pics observée sur la colonne monolithique est plus importante que celle des pics observés sur la C18, ce qui pourrait entraver le facteur de résolution de deux composés dans le cas d'une analyse d'échantillons environnementaux plus riches.

Tableau 5 : Facteur de résolution des constituants du mélange de toxines observés sur les colonnes monolithiques (PepSwift) et C18 (Atlantis)

Composé a	Composé b	$R_{ab}$ PepSwift	$R_{ab}$ Atlantis	Rapport des $R_{ab}$ $R_{ab} \text{ C18}/R_{ab} \text{ Pep}$
Néosaxitoxine 1	Cylindrospermopsine	NA	0.22	NA
Cylindrospermopsine	Néosaxitoxine	0.26	44.60	170.97
Néosaxitoxine	Saxitoxine	0.46	0.06	0.14
Saxitoxine	Microginine	55.05	96.50	1.75
Microginine	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	3.15	4.72	1.50
[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	MC-RR	0.81	1.42	1.75
MC-RR	Nodularine	0.83	9.38	11.26
Nodularine	Cyanopeptoline 1007	4.89	4.83	0.99

Composé a	Composé b	R <sub>ab</sub> PepSwift	R <sub>ab</sub> Atlantis	Rapport des R <sub>ab</sub> R <sub>ab</sub> C18/R <sub>ab</sub> Pep
Cyanopeptoline 1007	Microcystine YR	0.19	2.52	13.28
Microcystine YR	Microcystine LR	1.22	2.71	2.23
Microcystine LR	Cyanopeptoline 1041	2.59	0.55	0.21
Cyanopeptoline 1041	Microcystine LA	3.06	27.16	8.87
Microcystine LA	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HtyHty	1.95	1.16	0.59

Le choix de la colonne se porte donc sur la colonne Atlantis C18. Afin d'optimiser la séparation HPLC et d'obtenir la meilleure séparation en un laps de temps le plus court possible, l'étape suivante est l'optimisation du débit du gradient.

#### 2.2.4 Optimisation du débit du gradient d'élution

Trois débits sont évalués sur la colonne Atlantis C18. 4 µL de mélange de Concentration 1 sont injectés sur la colonne C18 Atlantis maintenue à 40°C. Les débits évalués sont 0,3 – 0,7 et 1 µL/minute.

Le gradient appliqué, bien que les débits soient différents, est identique en termes de pente et est représenté dans la Figure 11. Il s'agit d'un gradient binaire A-B où A est de l'H<sub>2</sub>O acidifiée par 0.1 % d'acide formique et le solvant B est de l'acétonitrile acidifiée par 0.1 % d'acide formique.

Les conditions initiales du gradient sont de 95% en H<sub>2</sub>O + 0.1 % FA. Dans ces conditions, les composés moins polaires sont retenus sur la colonne tandis que les composés ioniques seront élués avec la phase mobile. Le pourcentage de solvant organique est augmenté à 20% en 7.5 minutes afin d'éluer rapidement les composés ioniques et très polaires. La pente du gradient est ensuite réduite pour atteindre, après 57.5 minutes, une composition de phase mobile constituée de 45% d'ACN + 0.1 % FA. Cette augmentation progressive permet d'éluer petit à petit et de résoudre dans le chromatogramme, les composés de structure très similaire. Après 57.5 minutes, la pente du gradient augmente rapidement pour atteindre 70% de solvant B, lesquels sont maintenus 3 minutes durant, afin d'éluer tous les solutés apolaires. La dernière partie du gradient permet de replacer la colonne HPLC en conditions initiales et de permettre l'injection suivante.

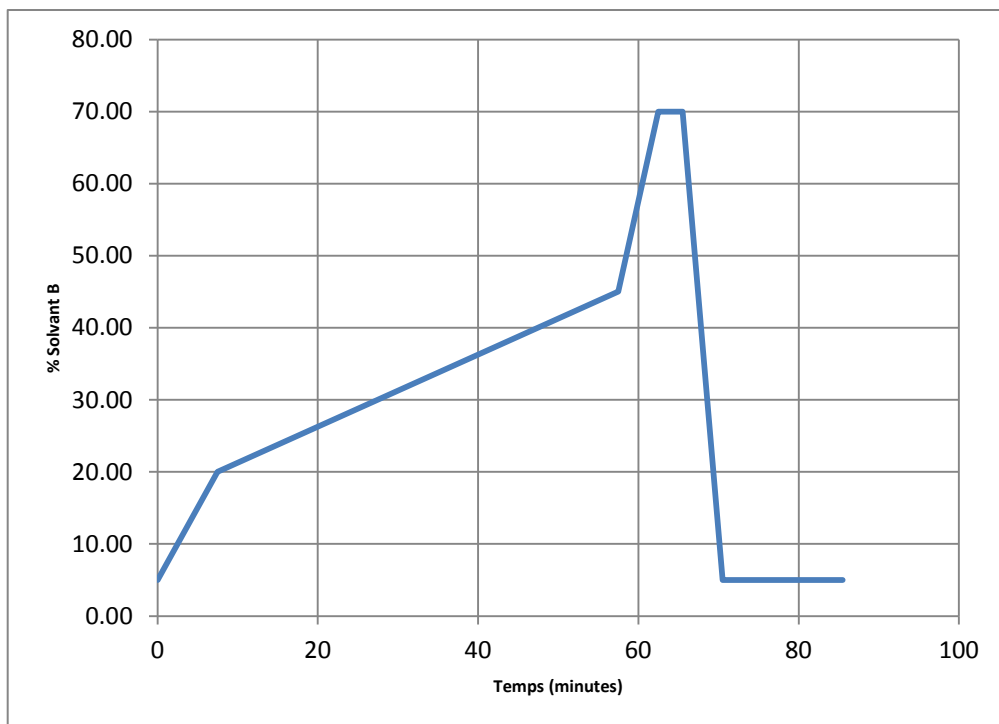


Figure 11 : Gradient évalué sur la colonne Atlantis aux débits 0,3 – 0,7 et 1 µL/min

Les chromatogrammes obtenus sur les deux colonnes sont présentés dans la Figure 12. L'ordre d'élué est identique quel que soit le débit appliqué (Tableau 6).

Tableau 6 : Ordre d'élué des composés élués de la colonne Atlantis par le gradient décrit à la Figure 11 avec les débits de 0.3, 0.7 et 1 µL/min

Ordre d'élué	<b>Atlantis</b>
	Cylindrospermopsine
	Néosaxitoxine 1
	Saxitoxine
	Néosaxitoxine 2
	Microginine
	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR
	Microcystine RR
	Nodularine
	Cyanopeptoline 1007
	Microcystine YR
	Microcystine LR
	Cyanopeptoline 1041
	Microcystine LA
	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HtyHty

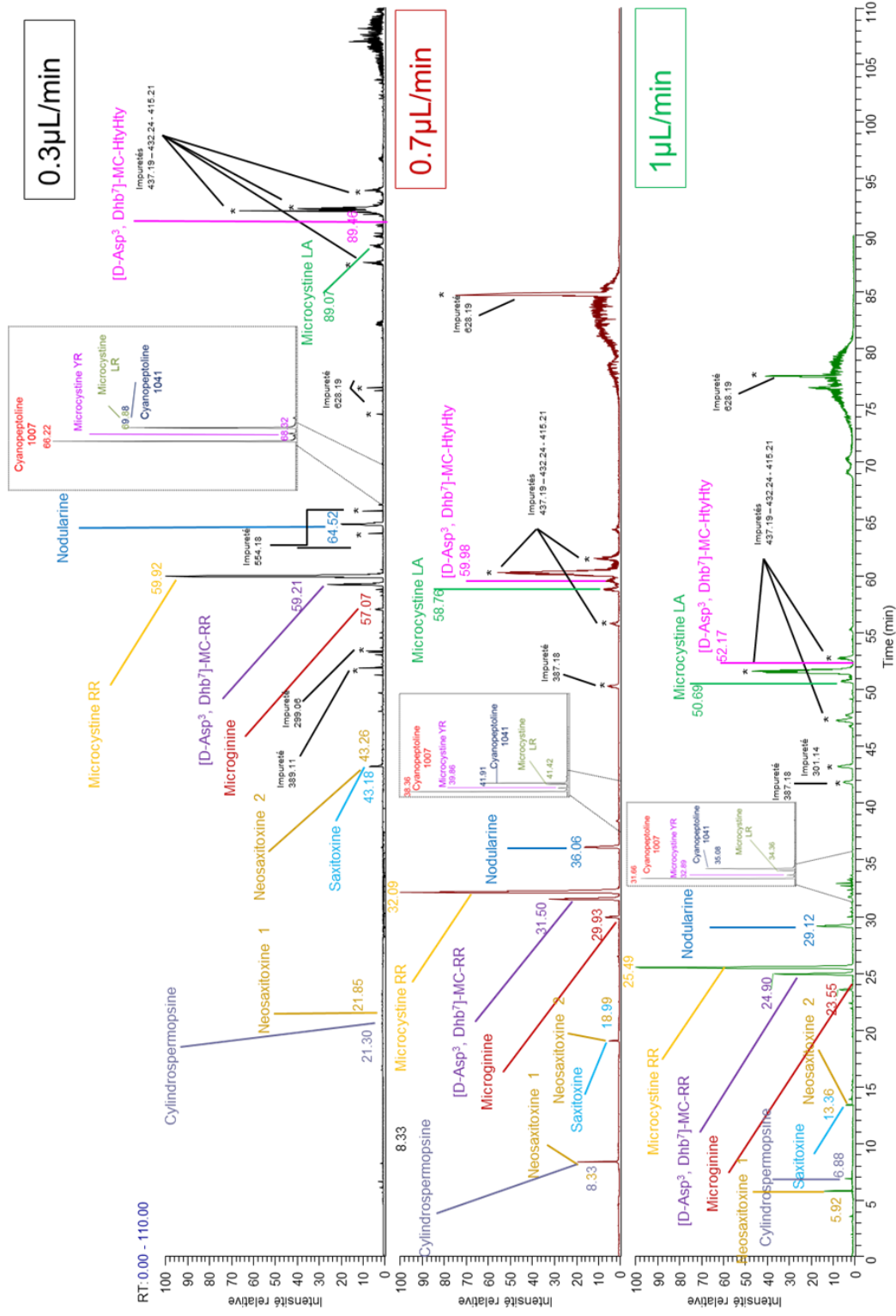


Figure 12 : Chromatogrammes TIC du mélange "Concentration 1" obtenus sur la colonne Atlantis C18 en variant les débits de phase mobile à 0.3 - 0.7 et 1 µL/min

La première observation, par rapport au premier test sur la C18, est la confirmation que la rétention des toxines ioniques est nulle ou très faible. Leur chromatogramme, reconstitué sur les traces des ions  $[M+H]^+$  de chacune des trois toxines, est présenté, pour le débit moyen de  $0.7 \mu\text{L}$ , dans la Figure 13. On peut observer un tracé de pic très large, témoignant d'une mauvaise rétention. Ce type de massif s'explique aussi par un temps de réaction important de la colonne aux modifications de conditions de phase mobile. L'éluion de ces toxines, non retenues, est principalement le fait d'un phénomène de diffusion simple au sein de la colonne. En conclusion, bien que les toxines ioniques sortent en front de solvant, ce qui se traduit sur le spectre par un pattern très large, les toxines saxitoxine et néosaxitoxine semblent légèrement plus retenues que la cylindrospermopsine sans toutefois permettre de les discriminer dans le chromatogramme.

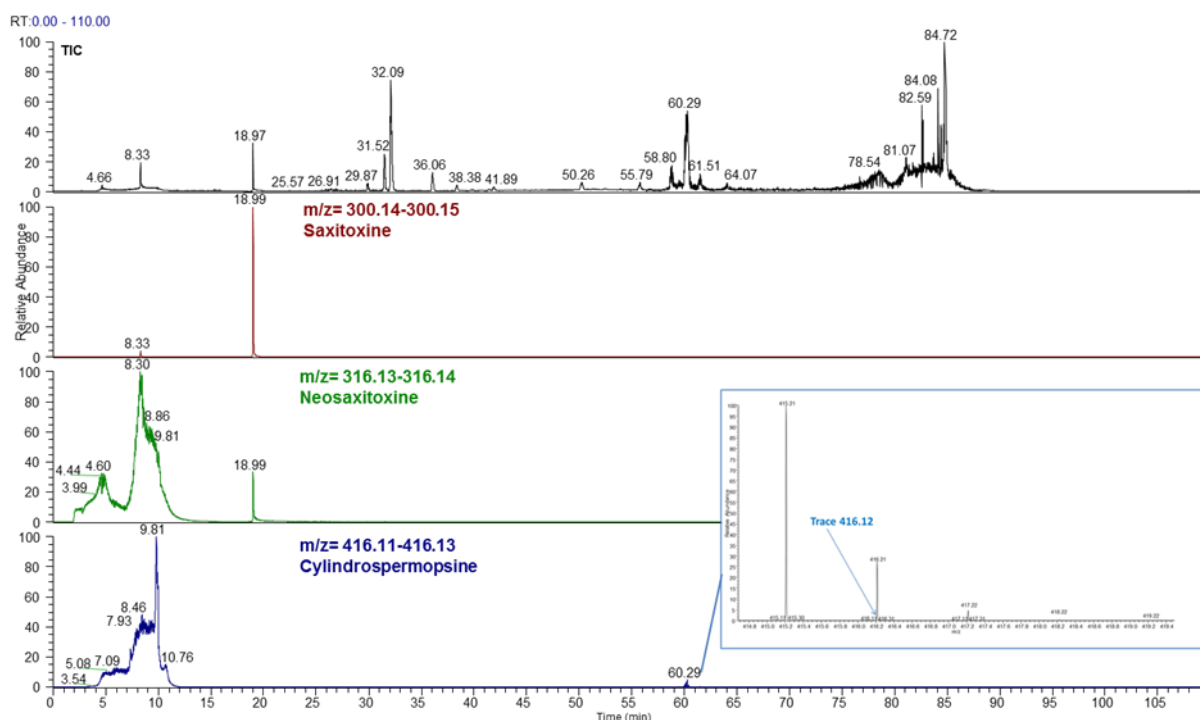


Figure 13 : TIC et traces chromatographiques de la saxitoxine, néosaxitoxine et cylindrospermopsine sur Atlantis C18 avec débit de  $0.7 \mu\text{L}/\text{min}$

Notons enfin la présence d'un pic, sur la trace de la masse de la cylindrospermopsine, apparaissant à 60.29 min. Ainsi qu'illustré dans l'insert, il s'agit en fait de la trace du pic  $[M+H+1]^+$  des ions de  $m/z = 415.21$  Da, laquelle recouvre légèrement la valeur de  $m/z = 416.12$  Da correspondant aux ions  $[M+H]^+$  de la cylindrospermopsine. Ce pic à  $t_R = 60.29$  min n'est donc pas attribuable à la cylindrospermopsine.

D'autre part, les impuretés marquées d'un astérisque dans le chromatogramme ont pu être assignées sur base de leur masse mais elles ne correspondent à aucune des toxines présentes dans le mélange de standards. Leur signal est probablement imputable à l'origine des standards en tant que tels. En effet, chacune des toxines du mélange de standards est obtenue par purification

(chromatographie préparative) d'un extrait environnemental ou de culture de bactéries. Les puretés des standards varient entre 90 et 95 % en moyenne, et les traces observées dans les chromatogrammes, non attribuables aux toxines du mélange, sont vraisemblablement des impuretés co-extraites lors de la purification des standards.

Enfin, il apparaît a priori que les pics sont plus fins et mieux résolus dans le cas d'un débit de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . En outre, ce débit plus rapide permet d'augmenter sensiblement la vitesse d'analyse de chaque échantillon et, en vue d'une utilisation routinière, permettrait d'augmenter le nombre d'échantillons analysés par heure. Afin de rationaliser cette observation, en suivant un raisonnement identique à celui suivi pour la détermination de la meilleure phase de colonne, le Tableau 7 présente le facteur de résolution, calculé pour chaque doublet de toxines successif dans le chromatogramme, aux débits 0,3 - 0,7 - 1  $\mu\text{L}/\text{minute}$ . Notons qu'au vu des chromatogrammes obtenus pour la rétention/séparation de la néosaxitoxine et de la cylindrospermopsine, nous avons estimé qu'il n'était pas pertinent de faire intervenir le calcul de facteur de résolution, étant donné l'allure de chaque chromatogramme respectif.

*Tableau 7 : Facteur de résolution des constituants du mélange de toxines observés sur la colonne C18 (Atlantis) avec des débits de 0,3 – 0,7 et 1  $\mu\text{L}/\text{min}$*

<b>Composé a</b>	<b>Composé b</b>	<b>R<sub>ab</sub> Atlantis 0.3 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>R<sub>ab</sub> Atlantis 0.7 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>R<sub>ab</sub> Atlantis 1 <math>\mu\text{L}</math></b>
Saxitoxine	Microginine	<b>28.43</b>	<b>30.82</b>	<b>33.97</b>
Microginine	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	<b>5.11</b>	<b>3.38</b>	<b>3.55</b>
[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	MC-RR	<b>1.60</b>	<b>1.22</b>	<b>1.42</b>
MC-RR	Nodularine	<b>9.89</b>	<b>8.10</b>	<b>8.85</b>
Nodularine	Cyanopeptoline 1007	<b>4.15</b>	<b>4.47</b>	<b>5.91</b>
Cyanopeptoline 1007	Microcystine YR	<b>5.75</b>	<b>3.23</b>	<b>3.08</b>
Microcystine YR	Microcystine LR	<b>4.05</b>	<b>3.59</b>	<b>3.72</b>
Microcystine LR	Cyanopeptoline 1041	<b>0.00</b>	<b>0.94</b>	<b>1.57</b>
Cyanopeptoline 1041	Microcystine LA	<b>38.38</b>	<b>26.33</b>	<b>27.39</b>
Microcystine LA	[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HtyHty	<b>0.69</b>	<b>2.10</b>	<b>2.49</b>

L'observation des chromatogrammes ainsi que la comparaison des facteurs de résolution montrent un avantage net pour l'utilisation d'un débit de phase mobile de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . En effet, les pouvoirs de résolution posant problème aux débits 0.3 et 0.7  $\mu\text{L}$  se voient augmenter lors de l'augmentation du débit à 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , le tout sans entraver la bonne séparation des autres composés.

Notons que certaines publications<sup>170,173,188</sup> faisaient état d'une séparation améliorée lorsque le gradient était précédé d'un palier de quelques minutes, avant

d'entamer les différentes pentes. Cette option a été évaluée, aux débits 0,3 - 0,7 - 1  $\mu\text{L}/\text{minute}$  mais l'utilisation d'un palier n'a, dans aucun cas, montré le moindre avantage par rapport à un gradient classique. Cette option a donc été abandonnée.

Le choix de la colonne se porte donc sur la colonne Atlantis C18 avec le gradient présenté dans la Figure 11 et un débit de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . L'optimisation étant réalisée sur le mélange de standards, l'étape suivante sera l'application de cette séparation HPLC à l'analyse d'un échantillon environnemental. Ce point, ainsi que l'ensemble des étapes d'extraction/purification/analyse sera développé dans le chapitre suivant.

## **CHAPITRE III : APPLICATION ENVIRONNEMENTALE**



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie d'une micropipette ZipTip® (Millipore) .....	121
Figure 2 : Gradient appliqué avec A : H <sub>2</sub> O+ 0.1 % FA et B : ACN .....	122
Figure 3 : Photographie du montage HPLC-Robot-MALDI (LSM - ULiège) .....	123
Figure 4 : Spectre MALDI-MS d'extrait NRJ enregistré sur 2,5-DHB (haut de l'image) et 1,5-DAN (bas de l'image). .....	125
Figure 5 : Agrandissement de la zone 975-1080 Da du spectre MALDI-MS d'extrait NRJ enregistré sur 2,5-DHB (haut de l'image) et 1,5-DAN (bas de l'image) .....	126
Figure 6 : Pourcentage d'acétonitrile en fonction de l'intensité relative (%) des toxines Nodularine, MC-RR et Microginine.....	127
Figure 7 : Chromatogramme TIC de l'échantillon environnemental NRJ4, agrandi sur la zone d'élution des MC (19-39 min).....	131
Figure 8 : Chromatogrammes reconstruits (RIC) sur les masses 505.75, 512.78, 520.76 et 527.77 Da de l'échantillon NRJ4 et spectres MS/MS associés.....	132
Figure 9 : Spectre de masse de l'échantillon NRJ pour les fractions HPLC éluées entre 19 et 39 minutes de gradient et zoom sur la gamme de masse 450-600 Da	134
Figure 10 : Structure générale de la microcystine MC-XZ .....	135
Figure 11 : Chromatogramme reconstruit sur la masse 520.7 de l'échantillon NRJ4 et spectres MS/MS associés.....	138
Figure 12 : Représentation schématique de la stratégie analytique .....	140
Figure 13 : RIC de la masse 484.27 et spectres de masse associés aux 6 pics d'élution du RIC.....	142
Figure 14 : MS <sup>2</sup> de M <sub>966a</sub> à m/z = 484.27 Da via ESI-HCD-MS <sup>2</sup> (Orbitrap Q Exactive) .....	144
Figure 15 : MS <sup>2</sup> de M <sub>966a</sub> à m/z = 484.27 Da via MALDI-CID-MS (FT-ICR Solarix) .....	145
Figure 16 : Schémas de fragmentation observés dans le spectre de masse MS/MS (CID/HCD) de M <sub>966a</sub> (ions exprimés en m/z).....	146
Figure 17 : RIC des ions de m/z = 491.27 et 498.28 Da et spectres de masse ESI-MS (Orbitrap) associés aux pics d'élution du RIC.....	151
Figure 18 : Calcul du défaut de masse de Kendrick pour le composé M <sub>966a</sub> sur base de la masse exacte .....	158
Figure 19 : Nomenclature de Roepstorff et Biemann pour la fragmentation au sein de la chaîne peptidique .....	159
Figure 20 : Microcystine [DMAdda <sup>5</sup> -Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR et nomenclature de rupture des liaisons .....	160
Figure 21 : Spectres de fragmentation de M <sub>966a</sub> obtenus en ESI-HCD-MS <sup>2</sup> (haut) et MALDI-CID-MS <sup>2</sup> (bas) .....	163

Figure 22 : Chromatogramme des ions de m/z compris entre 508.23 et 508.29 Da et spectres de masses associés à M <sub>1014a</sub> (1), M <sub>1014b</sub> (1), M <sub>1014c</sub> (2) et M <sub>1014d</sub> (2) .....	176
Figure 23 : RIC des ions [M+2H] <sup>2+</sup> à 527.77 Da et [M+H] <sup>+</sup> à 1054.54 Da et spectre de masse associé.....	179
Figure 24 : Spectres MS <sup>2</sup> du composé M <sub>1053</sub> : Fragmentation de l'ion dichargé (haut de l'image : m/z = 527.77 Da) et de l'ion monochargé (bas de l'image : m/z = 1054.54) par ESI-HCD-MS <sup>2</sup> dans l'Orbitrap Q Exactive .....	181

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Masses suivies en MS/MS en HPLC-MS/MS sur l'Orbitrap lors de l'injection des échantillons environnementaux NRJ .....	130
Tableau 2 : Structure des microcystines potentiellement présentes dans les échantillons environnementaux NRJ.....	136
Tableau 3 : Fragments de M <sub>966a-f</sub> en ESI-HCD-MS <sup>2</sup> (Orbitrap) et M <sub>966a</sub> en MALDI-CID-MS <sup>2</sup> (FT-ICR).....	147
Tableau 4 : Identification des pics ESI-HCD-MS <sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS <sup>2</sup> (FT-ICR) des composés M <sub>980a</sub> , M <sub>980b</sub> , M <sub>994a</sub> et M <sub>994b</sub> .....	154
Tableau 5 : Comparatif des profils et intensités de fragmentation obtenues lors de l'analyse MS/MS de M <sub>966a</sub> en ESI-HCD-MS <sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS <sup>2</sup> (FT-ICR) .....	161
Tableau 6 : Fragments successifs après ouverture du cycle de [DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR au niveau de la liaison 2 (Leu-MeAsp).....	164
Tableau 7 : Identification des pics ESI-HCD-MS <sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS <sup>2</sup> (FT-ICR) des composés M <sub>1009a-e</sub> , M <sub>1023a</sub> et M <sub>1023b</sub> .....	168
Tableau 8 : Fragments menant à l'hypothèse de structures dérivées de la MC-RR .....	171
Tableau 9 : Identification des pics ESI-HCD-MS <sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS <sup>2</sup> (FT-ICR) des composés M <sub>1016a</sub> , M <sub>1016b</sub> , M <sub>1016c</sub> , M <sub>1016d</sub> , M <sub>1030a</sub> , M <sub>1030b</sub> , M <sub>1044a</sub> , M <sub>1044b</sub> .....	173
Tableau 10 : Identification des pics ESI-HCD-MS <sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS <sup>2</sup> (FT-ICR) des composés M <sub>1014a,b</sub> (1), M <sub>1014c,d</sub> (2) et M <sub>1053</sub> .....	182
Tableau 11 : Récapitulatif des informations obtenues à l'issue de l'analyse de l'échantillon environnemental d'eau de lac (Ry Jaune) et identification de microcystines contaminant cet échantillon .....	186

## **1. INTRODUCTION**

Nous l'avons mentionné, ce travail se positionne dans un contexte environnemental, et vise à évaluer la possibilité de caractériser les toxines produites lors d'épisodes de blooms de cyanobactéries dans les eaux de baignade.

Ce chapitre présente l'application de l'ensemble des développements réalisés au cours de la thèse, par le biais d'une analyse d'échantillon environnemental complète. L'ensemble des différentes étapes nécessitant une mise au point dans le cadre de l'extraction et de la purification d'échantillons environnementaux, suivi de leur analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation MALDI ou ESI sont décrites et les résultats présentés.

A l'heure actuelle, le suivi sanitaire des eaux récréatives et des réservoirs d'eau potable est effectué par ELISA. En Belgique, et spécifiquement en région wallonne, le kit utilisé permet le dosage en équivalent microcystine LR et de la nodularine uniquement, avec des limites de détection de l'ordre de 0.15 ppb.

Avant d'être analysés, les échantillons environnementaux doivent être préparés à l'analyse, via des étapes d'extraction et purification, variables en fonction de l'analyse finale. Dans le cas du monitoring des eaux wallonnes, l'extraction des toxines est réalisée par une succession de congélation/décongélation conduisant à la lyse des cellules et la libération des toxines. La solution est ensuite analysée en l'état, par ELISA.

Cette technique, extrêmement robuste, rapide et peu onéreuse présente néanmoins l'inconvénient majeur de l'absence d'identification précise des toxines du bloom dont la toxicité peut être très variable. Notre objectif est d'apporter, via l'exploitation des méthodes HPLC-ESI et HPLC-MALDI et l'utilisation en MALDI de matrices réductrices pour l'analyse en masse, l'identification des toxines produites lors des blooms. La première étape de ce chapitre est donc la détermination des conditions d'extraction des toxines d'échantillons environnementaux provenant de lacs situés en Wallonie. Une fois l'extraction réalisée, une étape de concentration/purification sera également nécessaire afin de permettre de se placer dans les conditions de solvant et de concentration optimales pour une analyse par HPLC-MS (MALDI ou ESI).

## **2. ETUDE ENVIRONNEMENTALE**

### **2.1 Objectifs de l'étude**

Dans le cadre du projet B-BLOOMS, présenté en introduction de ce travail, une étude environnementale a été mise en place, incluant le monitoring d'eaux de lacs de Wallonie et de Bruxelles. L'objectif de cette étude était de déterminer le statut trophique, la biomasse cyanobactérienne et la concentration en microcystines (via des méthodes biologiques de type ELISA) dans les étendues d'eau étudiées. Par ailleurs, l'influence de facteurs environnementaux sur la biomasse cyanobactérienne et la concentration en microcystines a été également investiguée<sup>74,189</sup>. Le projet B-BLOOMS2, prolongeant le projet B-BLOOM, avait l'objectif principal d'améliorer la modélisation pour la prédiction

et la prévention précoce des blooms, de développer des structures et outils de suivi, et de proposer des stratégies pour réduire l'impact des blooms de cyanobactéries.

En parallèle aux projets B-BLOOMS, Yannick Lara (Université Liège – Centre d'Ingénierie des Protéines - CIP) a organisé le prélèvement d'échantillons provenant d'un des lacs du domaine de l'Eau D'Heure (Lac du Ry Jaune) dans le cadre de son travail de thèse<sup>37</sup>. Par le biais d'une collaboration étroite avec le CIP (Yannick Lara et Annick Wilmotte), nous avons pu extraire et analyser les échantillons de cette étude, en particulier les prélèvements effectués à intervalle hebdomadaire entre le 28 juillet et le 21 octobre 2009 dans le lac du Ry Jaune. Cette analyse fait l'objet de ce chapitre.

Les résultats complets des projets B-BLOOMS sont disponibles sur le site internet du projet et, plus globalement, et l'aspect moléculaire et génétique de la production de microcystines dans les étendues d'eau en Belgique, est discuté dans le travail de thèse de Yannick Lara<sup>37,189-192</sup>.

### **3. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **3.1 Chemicals**

L'acide formique (FA), les microcystines LR, RR, et YR et la nodularine ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Steinheim et Taufkirchen, Allemagne et Bornem, Belgique).

La microcystine LA, la microginine, les cyanopeptolines 1007 et 1041, ont été achetées chez Alexis Biochemicals (Enzo Life Sciences, Zandhoven, Belgium).

La saxitoxine, la néosaxitoxine et la cylindrospermopsine provenaient du NRC (National Research Council) Canada.

La Microcystine [D-Asp<sup>3</sup>, Dhb<sup>7</sup>]-MC-HtyHty a été offerte par l'équipe du Dr Rainer Kurmayer de l'Austrian Academy of Sciences et la Microcystine [D-Asp<sup>3</sup>, Dhb<sup>7</sup>]-MC-RR a généreusement été envoyée par l'équipe du Dr Judith Blom de l'Université de Zürich.

Les trois peptides synthétiques RFEAALD (P1-Ala), RFEDhaALD (P2-Dha), où Dha est l'acide aminé déhydroalanine et RFEDhbALD (P3-Dhb) où Dhb est l'acide déhydroaminobutyrique ont été synthétisés « sur mesure », avec une pureté supérieure à 95 %, par Xaia Custom Peptides (Göteborg, Suède).

Le mélange de calibrants MassPrep Calibration Mix – DIOS Low Mass<sup>TM</sup> provenait de chez Waters (Milfort, USA) et le mélange de calibrants Peptide Calibration Standard II provenait de Bruker Daltonics (Bremen, Allemagne).

Les échantillons environnementaux analysés dans ce chapitre proviennent de prélèvements effectués à intervalle hebdomadaire dans le Lac du Ry jaune, entre juillet et octobre 2009. Les échantillons, « NRJ », sont numérotés de 1 à 12 (NRJ1-12). Au cours de notre analyse, nous n'avons pas tenu compte de l'évolution temporelle de la concentration ou de la population de microcystine. Cette analyse se focalise sur l'identification des microcystines présentes en moyenne sur le laps de temps de l'étude. En particulier, l'échantillon NRJ4 a été l'échantillon de base pour l'analyse. Lorsque le signal se révélait insuffisamment précis pour l'identification d'une microcystine, d'autres

échantillons NRJ ont été analysés afin de compléter l'information et permettre l'identification de la composition moyenne des prélèvements dans le lac du Ry jaune. Les résultats obtenus seront donc le reflet de la composition moyenne, entre juillet et octobre 2009 (NRJ1-NRJ12), dans le Lac du Ry Jaune.

Tous les solvants utilisés étaient de qualité HPLC. L'eau utilisée était de l'eau Milli-Q.

## **3.2 Préparation d'échantillon**

### **3.2.1 Extraction**

Les échantillons environnementaux ont été extraits sur base d'un protocole standard, décrit par Meriluoto et Spoof<sup>36</sup> auquel de petites adaptations, décrites ci-après, ont été apportées lorsque le matériel recommandé n'était pas disponible.

Les différents prélèvements sont filtrés sur des filtres de type GF/C, de diamètre 47mm lesquels sont ensuite placés dans un tube de type Falcon à bout rond, puis lyophilisés. Les filtres sont ensuite extraits par l'addition de 3 mL du solvant d'extraction (MeOH/H<sub>2</sub>O 75/25). Les tubes sont fermés hermétiquement et passent 15 minutes dans un bain à ultrason. Afin de compléter l'extraction, les tubes sont ensuite passés dans un sonicateur avec sonde. Un échantillon est soniqué à la fois pendant 30 secondes. La sonde est nettoyée au mélange 75 % méthanol entre chaque échantillon.

Les tubes sont ensuite refroidis dans un bain de glace puis centrifugés à 2700 g pendant 10 minutes. 400 µL du surnageant sont prélevés et transférés dans des tubes coniques en polypropylène de capacité 1.7 mL (Eppendorf).

Le solvant est ensuite évaporé à sec sous vide (SpeedVac), repris dans 100 µL de solution MeOH/H<sub>2</sub>O 75/25 contenant les peptides synthétiques P1, P2 et P3 (standards internes) et homogénéisé au vortex.

Les extraits sont ensuite analysés ou conservés au congélateur à -18°C.

### **3.2.2 Purification**

Lorsqu'une purification additionnelle s'avère nécessaire (avant injection en HPLC par exemple), celle-ci est réalisée via l'utilisation de pipettes ZipTip®. Un ZipTip® est une pipette de 10 µL semblable à un embout de micropipette classique (tip) mais contenant de la phase chromatographique à son extrémité (voir Figure 1). L'objectif des pipettes ZipTip® est double, à savoir la purification de mélanges complexes de peptides et leur concentration. Elles permettent donc d'atteindre des limites de détections plus basses et des niveaux de purification adéquats pour une analyse ultérieure en HPLC et nanoHPLC.



*Figure 1 : Photographie d'une micropipette ZipTip® (Millipore)*

Différentes étapes sont nécessaires pour une bonne utilisation de la purification sur micropipettes greffées, à savoir :

- L'équilibration (Wet) : Afin de « conditionner » la phase stationnaire, la micropipette est équilibrée en aspirant une solution de solvant organique (ACN par exemple). L'étape de conditionnement est ensuite réalisée en prélevant, à plusieurs reprises, une solution d'équilibration, de composition en solvant similaire à l'échantillon (solution aqueuse acide).
- L'accroche (Bind) : L'échantillon, en solution aqueuse (acide) est aspiré dans la pipette. Plusieurs cycles d'aspiration-évacuation sont effectués mais sans jamais laisser la phase à sec, c'est-à-dire sans jamais lâcher le piston de la micropipette.
- Le dessalage (Wash) : Sans lâcher le piston de la pipette, la phase est ensuite dessalée en prélevant, à plusieurs reprises (20-30  $\mu\text{L}$ ), une solution d'eau acidifiée (TFA 0.1 %).
- L'élution : Les analytes d'intérêt peuvent ensuite être décrochés de la phase stationnaire en prélevant un volume compris entre 5-10 $\mu\text{L}$  (en fonction de la concentration souhaitée) de solvant d'élution. La composition de la solution permettant de décrocher les toxines doit être déterminée en évaluant plusieurs compositions de solvants d'élution.

En pratique, les extraits sont décongelés à température ambiante et 40  $\mu\text{L}$  sont prélevés. Le solvant, majoritairement organique (MeOH/H<sub>2</sub>O 75/25), est évaporé à sec au SeedVac. Le résidu sec est ensuite dissout dans 10  $\mu\text{L}$  d'eau acidifiée par 0.1 % d'acide formique. Après conditionnement du ZipTip®, les 10  $\mu\text{L}$  de l'extrait reconstitué sont prélevés et élués par une fraction de 5  $\mu\text{L}$  d'ACN 35 % : H<sub>2</sub>O 65 % + Acide formique 0.1 %.

La fraction purifiée, afin d'être en conditions initiales similaires aux conditions initiales du gradient de la chromatographie, est enfin évaporée à sec au SpeedVac et le résidu est repris dans 10  $\mu\text{L}$  d'eau acidifiée par 0.1 % d'acide formique. L'extrait purifié peut ensuite être injecté en l'état en HPLC.

### 3.3 Paramètres HPLC et robot

Les séparations HPLC ont été réalisées sur la colonne C18 (Atlantis T3 75  $\mu\text{m}$  x 150 mm – Waters) installée sur un instrument de type nano UPLC (nanoAcquity UPLC®, Waters). Un gradient de 90 minutes, avec un débit de 1  $\mu\text{L}$  par minute, est appliqué pour l'élution des constituants de l'extrait de la colonne HPLC. Il s'agit d'un gradient binaire A-B où A est de l' $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q acidifiée par 0.1 % d'acide formique et le solvant B est de l'acétonitrile acidifiée par 0.1 % d'acide formique (Figure 2).

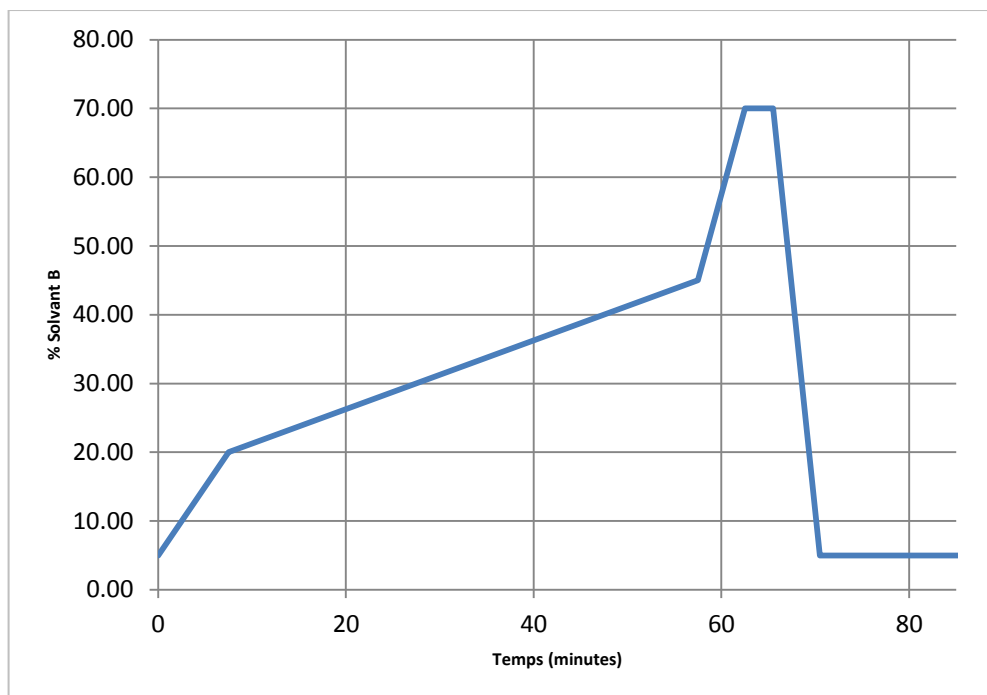


Figure 2 : Gradient appliqué avec A :  $\text{H}_2\text{O}$ + 0.1 % FA et B : ACN

La séparation HPLC mise au point était ensuite, soit couplée avec l'analyseur Orbitrap précédé d'une source ESI (décrit dans le point suivant), soit couplée avec un robot permettant de déposer l'éluat de la séparation chromatographique sur une plaque d'analyse MALDI.

L'automatisation du dépôt de l'éluat de la chromatographie sur plaque MALDI est réalisée au moyen du robot (Probot Micro Fraction Collector géré via le logiciel  $\mu\text{Carrier}$ , Dionex-Thermo Fisher Scientific). La fréquence de dépôt est ajustée en fonction de la séparation HPLC. La fréquence de dépôt, pour les échantillons environnementaux, est de 20 secondes. Chaque goutte est constituée par l'éluat de la chromatographie pour 1/3 et d'un solvant d'entraînement constitué d'eau acidifiée par 0.1 % d'acide formique (le make-up flow) pour 2/3. Le rôle du make-up flow est de permettre d'augmenter la fréquence de dépôt avec un volume de goutte suffisant sans augmenter le débit de la chromatographie. Le débit de make-up flow est de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  et le débit de la phase mobile HPLC est de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Chaque goutte a un volume de 1  $\mu\text{L}$ . Le dépôt est effectué sur une plaque MALDI de type AnchorChip™ (Bruker) avec ancrés de 800  $\mu\text{M}$  de diamètre. La séparation HPLC est répétée et déposée à deux reprises. Les deux séries de

dépôts sont ensuite respectivement additionnés de 1  $\mu$ L de matrice 2,5-DHB 20 mg/mL et de 1  $\mu$ L de matrice 1,5-DAN saturé dilué à 50 % – en solution dans ACN/H<sub>2</sub>O + 0.1 % FA 50/50. La comparaison des signaux obtenus via l'utilisation de la matrice MALDI 2,5-DHB et 1,5-DAN permettra l'identification rapide des dépôts contenant une ou plusieurs microcystines, grâce à la réduction de la double liaison présente sur l'acide aminé en position 7 du cycle.

L'analyse des chromatogrammes, spectres et données a été réalisée avec les logiciels Xcalibur 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific), Data Analysis 3.4, FlexAnalysis 3.0 et Biotoools (Bruker Daltonics).

La Figure 3 est une photo de l'équipement utilisé pour les manipulations. On peut y voir le système HPLC, le robot déposant sur une plaque MALDI au sortir de la chromatographie et les ordinateurs pilotant l'HPLC et le robot.



Figure 3 : Photographie du montage HPLC-Robot-MALDI (LSM - ULiège)

### 3.4 Paramètres MS (et MS/MS)

Les spectres présentés dans ce chapitre ont été enregistrés soit sur un analyseur à temps de vol précédé d'une source MALDI en mode manuel (Ultraflex II – Bruker Daltonics), soit sur un analyseur hybride de type Quadripôle-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) précédé d'une source ESI couplée à une séparation HPLC soit sur un analyseur à transformée de Fourier de type FT-ICR, précédé d'une source MALDI (Solarix – Bruker Daltonics). Tous les spectres MS et MS/MS sont enregistrés en mode positif. L'analyse des chromatogrammes, spectres et données a été réalisée avec les logiciels Xcalibur 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific), Data Analysis 3.4, FlexAnalysis 3.0 et Biotoools (Bruker Daltonics).

## 4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 4.1 Nettoyage et préparation des échantillons environnementaux

#### 4.1.1 Extraction

Les échantillons provenant du lac du Ry Jaune, en région Wallonne, ont été extraits selon la procédure décrite dans la littérature, à quelques adaptations mineures près, lesquelles, ainsi que la procédure, sont détaillées dans le point relatif aux méthodes d'extraction<sup>36</sup>.

Les échantillons du lac du Ry Jaune (NRJ2-NRJ12) ont été extraits selon la procédure susmentionnée. Notons que les échantillons prélevés en semaine 1 et 10 n'étaient pas disponibles et n'ont donc pas pu intégrer l'analyse. Les échantillons ont été repris dans 100  $\mu$ L d'une solution de MeOH 75 % contenant les standards P1-Ala, P2-Dha et P3-Dhb à 10  $\mu$ M. Ces standards ont été ajoutés à l'échantillon de référence afin d'être en mesure de vérifier l'efficacité de la matrice 1,5-DAN, pour chaque dépôt. En effet nous avons montré (Chapitre 1) que ces trois peptides synthétiques présentent chacun une réduction spécifique lorsqu'ils sont analysés par MALDI-TOF-MS en utilisant la matrice 1,5-DAN. La vérification des massifs isotopiques d'intérêt permet de s'assurer de l'efficacité de réduction moléculaire dépôt par dépôt.

### 4.2 Screening par MALDI-TOF

Les extraits environnementaux sont analysés par MALDI-TOF (Ultraflex II, Bruker). La stratégie adoptée pour cette analyse environnementale est de procéder, en première approche, à un screening des échantillons via MALDI-TOF en matrice classique 2,5-DHB et en matrice réductrice 1,5-DAN. Si l'analyse en matrice réductrice met en évidence la réduction de double liaisons, potentiellement indicatrices de la présence du groupement Dha ou MDha caractéristiques de la majorité des microcystines, l'analyse peut être complétée par l'injection de ces échantillons particuliers en HPLC-MALDI-FT et HPLC-ESI-Orbitrap.

Les extraits NRJ sont donc analysés par MALDI-TOF, en exploitant la matrice 2,5-DHB, laquelle s'était révélée, lors de la mise au point, la plus adéquate pour les petites toxines de type peptidique telles les microcystines (Chapitre 1).

La Figure 4 montre le spectre de masse de l'extrait NRJ centré sur une gamme de masse de 500-1200 Da, l'objectif étant de se focaliser sur les contaminations en cyanotoxines, et particulièrement les microcystines, lesquelles ont des masses généralement situées entre 900 et 1150 Da.

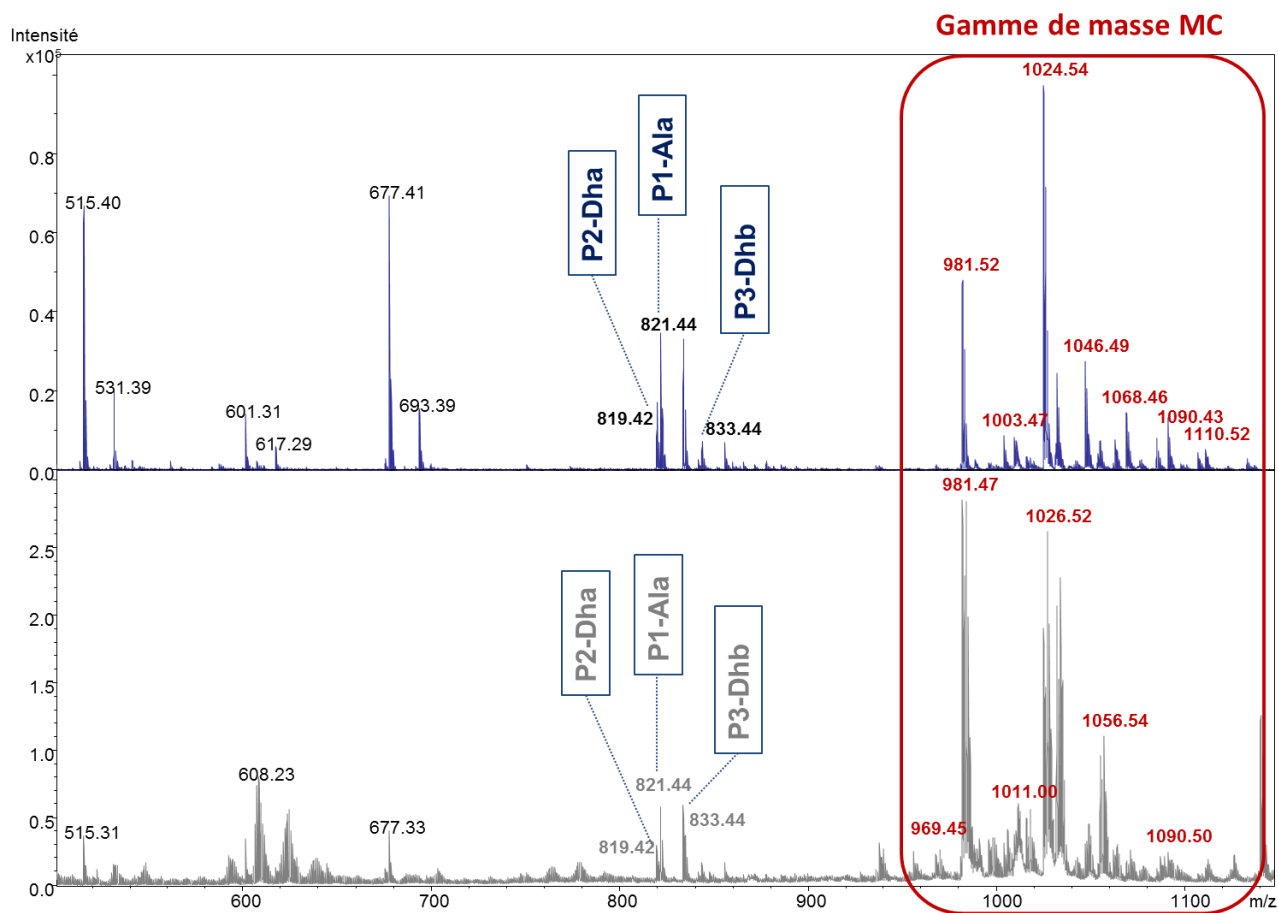


Figure 4 : Spectre MALDI-MS d'extrait NRJ enregistré sur 2,5-DHB (haut de l'image) et 1,5-DAN (bas de l'image).

Le spectre, outre la présence des standards P1 P2 P3 (aux  $m/z = 819.42$ ,  $821.44$  et  $833.44$  Da) présente une grande richesse de pics et notamment dans la gamme de masse 950-1150 Da.

Afin d'estimer la contamination en microcystines réductibles de l'échantillon, l'extrait est déposé et ionisé par la matrice 1,5-DAN (Figure 4). Sur cette figure, la gamme de  $m/z$  correspondant aux microcystines est encadrée en rouge. La Figure 5 représente un agrandissement de la gamme de masse cible pour les microcystines.

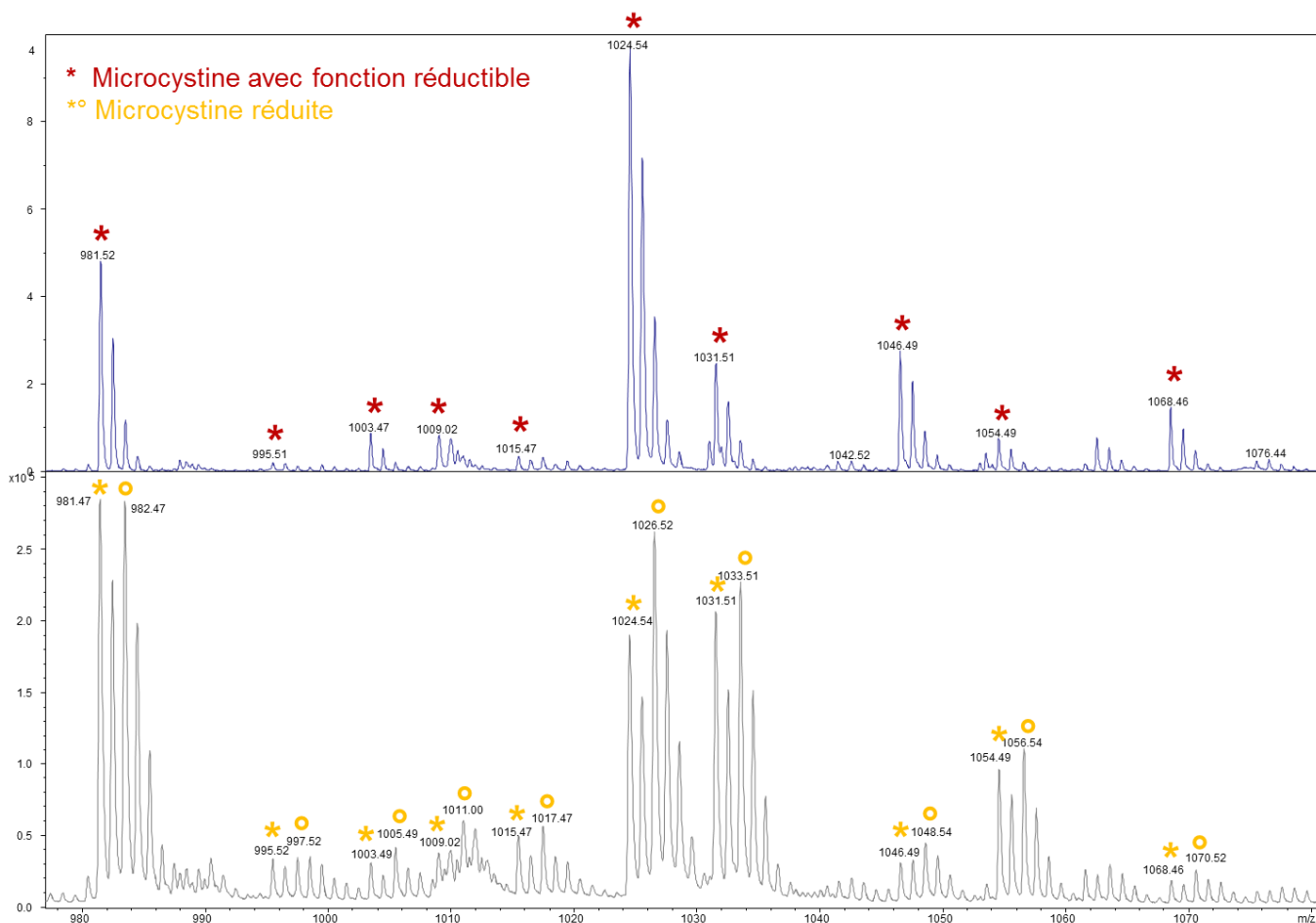


Figure 5 : Agrandissement de la zone 975-1080 Da du spectre MALDI-MS d'extrait NRJ enregistré sur 2,5-DHB (haut de l'image) et 1,5-DAN (bas de l'image)

La comparaison des spectres MALDI-TOF enregistrés sur 2,5-DHB et 1,5-DAN fait apparaître clairement, dans la zone 950-1150 Da, la présence de composés réductibles par la matrice 1,5-DAN. En effet, l'analyse via cette matrice conduit à une augmentation importante du pic à  $[M+H+2]^+$  pour de nombreux composés de cette zone, correspondant à la réduction d'une liaison C=C par la matrice (Chapitre 1).

Deux pics sont très majoritaires, il s'agit des masses 981.50 et 1024.52. Une revue de littérature permet de supposer qu'il pourrait s'agir, en première approche, des microcystines  $[Dha^7]$ -MC-LR et  $[Dha^7]$ -MC-RR. D'autre part, l'analyse de la zone 950-1150 permet de constater que d'autres pics, également réduits par 1,5-DAN, sont présents dans le spectre de masse. Une investigation plus poussée permettra d'obtenir plus d'informations quant au profil de fragmentation de ces composés, et donc leur composition (voir ci-après). Notons que la fragmentation au sein de l'appareil à temps de vol, si elle est efficace et possible, a été évaluée mais abandonnée. En effet, la sélection du parent, afin de lier les fragments au parent, se doit d'être la plus exacte possible or, au sein de l'appareil dont nous disposons, la sélection du parent ne pouvait être réalisée parfaitement à moins de 5Da (10 Da en routine pour conserver un signal suffisant).

Etant donné la richesse du spectre de masse sur une gamme aussi restreinte, cette technique ne permet pas d'attribuer avec certitude un profil de fragmentation à un ion précurseur déterminé.

Après analyse par MALDI-TOF-MS à l'aide de la matrice 1,5-DAN, les ions qui présentent une réduction par la matrice seront investigués par HPLC-MALDI-FT-ICR et HPLC-ESI-Orbitrap. Leur fragmentation au sein de l'analyseur FT-MS et Orbitrap sera effectuée afin de profiter de la complémentarité des deux techniques pour obtenir un maximum d'informations structurales.

Avant l'analyse par HPLC et afin de réduire au maximum le risque de saturation ou d'obturation de la colonne analytique HPLC, une étape de purification de l'extrait environnemental sur micro-colonne C18 de type ZipTip® a été préalablement effectuée.

#### 4.2.1 Purification via Zip-tip

La composition de solvants permettant l'élution de 3 toxines, choisies pour représenter l'ensemble des toxines suivies dans ce travail à savoir la nodularine, la microcystine RR et la microginine a été évaluée.

Les toxines, après prélèvement dans la solution mère et dessalage, sont éluées successivement dans des fractions de solvant de composition croissante en acétonitrile dans l'eau acidifiée par 0.1 % d'acide formique. Les différentes fractions sont présentées dans le graphique d'élution sélective de la Figure 6. Notons que la solution mère après prélèvement ainsi que les fractions de dessalage, ont également été analysées en MALDI-TOF-MS afin de s'assurer de l'absence de toxines dans ces fractions.

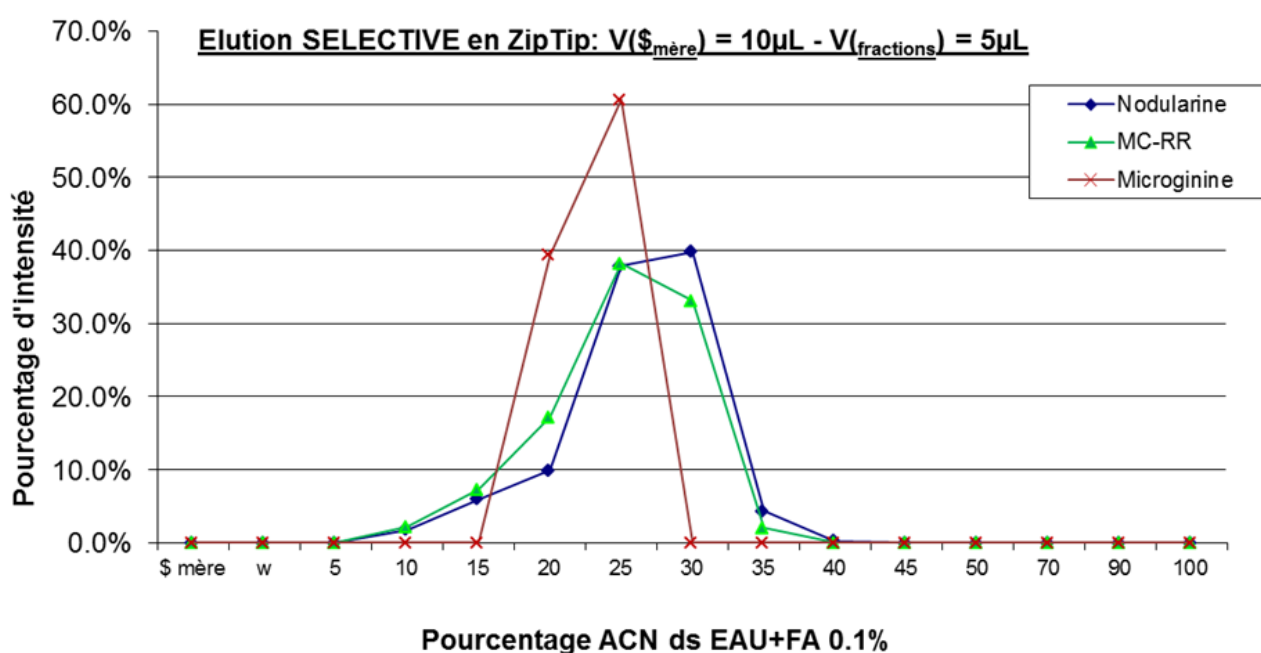


Figure 6 : Pourcentage d'acétonitrile en fonction de l'intensité relative (%) des toxines Nodularine, MC-RR et Microginine

Les résultats de cette évaluation, présentés dans la Figure 6, montrent qu'avec un pourcentage de 35 % d'acétonitrile, la majorité du contenu en toxines est élué. L'augmentation du pourcentage d'acétonitrile au-delà de 35 %, pourrait permettre un rendement d'extraction des toxines maximum mais il augmenterait également le pourcentage d'élué de composés annexes et interférents, dont on souhaite s'affranchir pour obtenir un échantillon purifié. En conséquence, les purifications d'extraits d'échantillons environnementaux seront réalisées avec les micropipettes de type ZipTip® dans solvant d'élué constitué de 35 % d'acétonitrile dans l'eau acidifiée par 0.1 % d'acide formique.

### 4.3 Analyse par HPLC-MS et MS/MS

Les extraits environnementaux ayant révélé la présence d'une contamination en microcystines après analyse par MALDI-TOF-MS, la séparation des constituants du mélange, par HPLC suivie de leur transfert au sein d'analyseurs à haute résolution (Orbitrap et FT-ICR) est réalisée.

L'objectif en séparant les constituants du mélange est de permettre d'isoler les microcystines majoritaires et de détecter idéalement d'autres microcystines, minoritaires, mais qui pourraient aussi être plus toxiques. D'autre part, les analyseurs Orbitrap et FT-ICR, comme décrit en annexe, sont des analyseurs à transformée de Fourier, qui permettent l'obtention de pouvoirs de résolution de l'ordre de  $10^5$ , rendant possible l'identification au moyen de la masse exacte. En outre, nous l'avons précédemment évoqué, l'ionisation via électrospray permet l'obtention d'une large gamme d'ions multichargés lesquels présentent généralement, par rapport à leurs homologues monochargés, une fragmentation plus efficace. De son côté, l'ionisation MALDI, en exploitant la matrice réductrice 1,5-DAN, permet d'accéder à des informations quant à la présence de liaison réductible dans la structure de la microcystine d'intérêt.

Les extraits environnementaux, après purification et concentration sur ZipTip®, sont injectés en nanoHPLC, sur la colonne C18 Atlantis et élués par un gradient binaire ACN/H<sub>2</sub>O + 0.1 % FA. Au sortir de l'HPLC, deux options ont été exploitées, à savoir le couplage online avec une source ESI couplée à l'analyseur Orbitrap et le couplage avec un robot permettant de déposer l'éluat sur une plaque MALDI (robot « spotter ») suivi de l'analyse par MALDI-FT-MS et MS/MS.

L'échantillon est injecté en deux temps. La première injection dans l'analyseur Orbitrap s'effectue en mode DDA (Data Dependand-Acquisition). Le principe du DDA est que le spectromètre, en mode MS, sélectionne les composés les plus intenses sur un intervalle de temps prédéterminé (duty cycle) et enregistre leur spectre MS<sup>2</sup>. Dans notre cas, les 10 ions de m/z dont l'intensité de signal est la plus grande sur 200 ms sont fragmentés. Cette technique est intéressante lorsque la composition de l'échantillon est inconnue ou méconnue, et que les temps de rétention des composés d'intérêts sont inconnus a priori. L'inconvénient du mode DDA est qu'il n'enregistre la MS<sup>2</sup> que des composés dont le signal est le plus intense. Les composés minoritaires ne pas être

fragmentés lorsque l'analyseur opère en mode DDA. La fragmentation MS/MS a été réalisée en mode HCD (High Energy Dissociation)

Sur base de l'analyse des spectres MS et MS/MS enregistrés en DDA, une liste de masses correspondant à des microcystines est dressée. La seconde injection de l'échantillon est réalisée en mode « targeted », c'est-à-dire avec une MS suivie de la MS<sup>2</sup> des masses programmées dans la liste d'inclusion. Afin de maximiser le rapport signal sur bruit, les fenêtres de temps au sein desquelles chacune des masses cibles devait être fragmentée sont ajoutées à la liste d'inclusion, sur base de leur temps de rétention respectif. Par ailleurs, les masses des ions dont nous possédons le standard ont également été incluses dans la liste afin de pouvoir, le cas échéant, comparer les traces MS/MS des ions inconnus avec les standards passés en HPLC.

Le spectromètre MALDI-FT-ICR-MS a permis l'enregistrement de spectres MS et la MS/MS (mode CID). La séparation HPLC a, dans le cas du couplage MALDI, été réalisée en duplicata, l'une étant additionnée de la matrice 2,5-DHB et l'autre, de la matrice 1,5-DAN. Cette étape a permis de vérifier la présence d'une ou plusieurs liaisons réductibles, lors de la présence d'une microcystine.

Le Tableau 1 résume les masses mises en évidence par le screening MALDI-TOF-MS/MS d'échantillons environnementaux NRJ, réalisés à l'aide de l'Ultraflex II, ainsi que leur conversion en ions dichargés, pour un suivi à l'ESI-Orbitrap. En effet, le signal en masse des microcystines, en ESI, a souvent été majoritaire sous la forme dichargée<sup>193,194</sup>. Leur MS/MS sera donc suivie préférentiellement.

Comme cela apparaît dans le Tableau 1, il est arrivé que plusieurs composés soient détectés à la même masse nominale, bien que la masse exacte permette aisément de constater qu'il ne s'agit pas d'isobares. Ces composés sont donc nommés  $M_x(1)$  et  $M_x(2)$  afin de les distinguer dans le texte.

La Figure 7 présente le chromatogramme TIC obtenu pour l'injection HPLC avec détection ESI-Orbitrap-MS de l'extrait purifié NRJ4. Les composés sont numérotés de 1 à 43 pour faciliter la lecture et la corrélation avec leur nom y est détaillée

Tableau 1 : Masses suivies en MS/MS en HPLC-MS/MS sur l'Orbitrap lors de l'injection des échantillons environnementaux NRJ

Nom	Formule brute	Masse monoisotopique (Da)	Charge (z)	m/z	Début fenêtre (min)	Fin fenêtre (min)	Energie collision	Standard	Echantillon NRJ
M <sub>966</sub>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	966.5175	2	484.2660	26.0	36.5	25		x
M <sub>980</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	980.5331	2	491.2738	33.0	36.0	25		x
M <sub>994</sub>	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	994.5488	2	498.2817	33.0	39.0	25		x
M <sub>1009</sub>	C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1009.5345	2	505.7745	20.0	25.5	25		x
M <sub>1014 (1)</sub>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S	1014.4834	2	508.2495	28.0	30.5	25		x
M <sub>1014 (2)</sub>	C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	1014.5175	2	508.2660	36.0	38.5	25		x
M <sub>1016</sub>	C <sub>50</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	1016.4967	2	509.2556	25.0	34.5	25		x
M <sub>1023</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1023.5502	2	512.7824	23.5	26.5	28		x
M <sub>1030</sub>	C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	1030.5124	2	516.2635	31.5	34.5	25		x
M <sub>1037 (1)</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	1037.5294	2	519.7720	21.0	25.5	25		x
M <sub>1037 (2)</sub>	C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1037.5658	2	519.7902	24.0	26.5	25		x
M <sub>1039</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	1039.5451	2	520.7798	20.0	25.5	25		x
M <sub>1041</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	1041.5607	2	521.7876	21.0	25.0	25		x
M <sub>1044</sub>	C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	1044.5280	2	523.2713	31.5	39.0	25		x
M <sub>1053</sub>	C <sub>53</sub> H <sub>71</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	1053.5284	2	527.7715	37.0	39.5	25		x
MC-LR	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	994.5488	2	498.2817	33.0	35.5	25	x	
Nodularine	C <sub>41</sub> H <sub>60</sub> N <sub>8</sub> O <sub>10</sub>	824.4432	1	825.4505	28.5	29.5	25	x	
MC-RR	C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1037.5658	2	519.7902	24.0	26.0	25	x	
MC-YR	C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	1044.5280	2	523.2713	32.0	33.5	25	x	
MC-LA	C <sub>46</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	909.4848	1	910.4921	50.0	52.0	25	x	
[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HtyHty	C <sub>56</sub> H <sub>71</sub> N <sub>7</sub> O <sub>14</sub>	1065.5059	1	1066.5132	51.5	53.5	25	x	
[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1023.5502	2	512.7824	23.0	26.5	25	x	

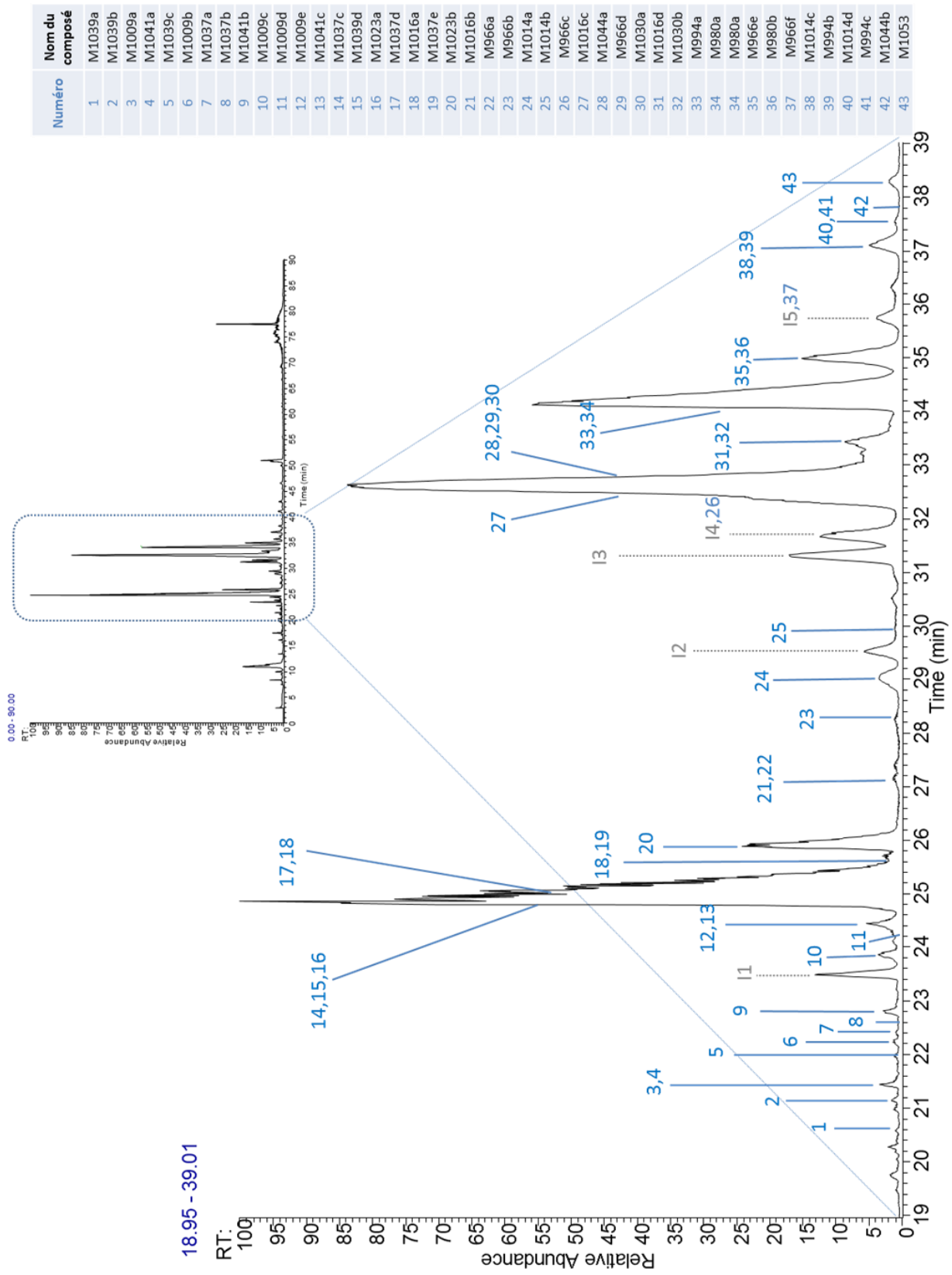


Figure 7 : Chromatogramme TIC de l'échantillon environnemental NRJ4, agrandi sur la zone d'éluion des MC (19-39 min)

Le chromatogramme de l'échantillon NRJ4 a révélé la présence de plus de 200 composés dont plus de 40 variants de microcystines. Ces variants des MC sont nommés dans la Figure 7. Pour chaque m/z appartenant potentiellement à la famille des MC, le chromatogramme est reconstitué (Reconstructed Ion Chromatogram – RIC). Lorsque la reconstruction du chromatogramme d'un m/z donne lieu à plusieurs temps d'éluion différents, les différents pics chromatographiques sont nommés, selon la nomenclature suivante : M (pour microcystine) – masse atomique du composé non ionisé - a à z (si plusieurs composés de même masse exacte sont détectés à différents temps de rétention). Ainsi, par exemple, si le RIC des ions de m/z = 519.78 Da (avec z = 2) donne lieu à 4 pics chromatographiques à des temps de rétention différents, ces pics seront nommés: M<sub>1037a</sub>, M<sub>1037b</sub>, M<sub>1037c</sub> et M<sub>1037d</sub>.

Par rapport au premier screening, en l'absence de séparation HPLC, le nombre de microcystines détectées a plus que doublé. En effet, la séparation HPLC a permis d'isoler les microcystines très majoritaires et de révéler certaines nouvelles microcystines non détectées lors du screening. Dans la gamme des temps de rétention caractéristiques des microcystines, seuls 5 pics (I1-I5) sont imputables à des composés inconnus et non répertoriés dans la liste des microcystines identifiées à ce jour (Annexe III et 4,51,195). Les microcystines sont éluées entre la minute 20 et la minute 39.

Outre la spécificité de la méthode d'extraction, laquelle était destinée à l'analyse des microcystines, les temps de rétention au sortir de l'HPLC sont cohérents avec les temps de rétention standards de microcystines, ainsi que nous l'avons vérifié précédemment lors de la mise au point de la méthode HPLC sur des standards de cyanotoxines (Chapitre 2). Enfin, les ions fragments caractéristiques de la présence des microcystines à m/z = 135 Da, ont été utilisés en tant qu'ions diagnostiques pour cibler les MC dans le chromatogramme. La Figure 8 illustre le chromatogramme reconstruit sur base de la masse des microcystines M<sub>1009a-e</sub>, M<sub>1023a-b</sub>, M<sub>1039a-d</sub> et M<sub>1053</sub> et les spectres MS/MS associés, caractérisés par la présence des ions de m/z = 135 Da (Ph-CH<sub>2</sub>CH(OMe)).

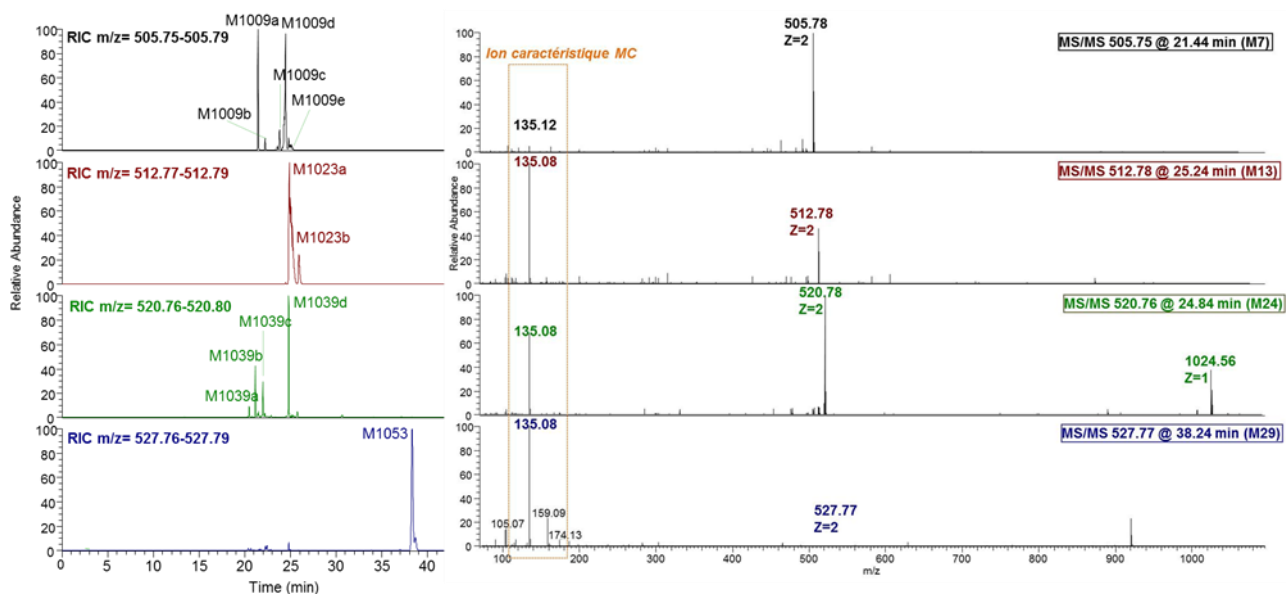


Figure 8 : Chromatogrammes reconstruits (RIC) sur les masses 505.75, 512.78, 520.76 et 527.77 Da de l'échantillon NRJ4 et spectres MS/MS associés

Au cours de l'analyse du chromatogramme de l'échantillon environnemental, comme évoqué précédemment, nous avons observé qu'à un même  $m/z$  correspondait généralement plusieurs pics d'élution, espacés sur toute la gamme d'élution des microcystines. Ainsi, à plusieurs reprises, la reconstruction du chromatogramme sur base d'une masse cible menait à l'apparition de plusieurs pics d'élution comme illustré sur la Figure 8 pour les microcystines  $M_{1009a-e}$ ,  $M_{1023a-b}$ ,  $M_{1039a-d}$  et  $M_{1053}$ . La première hypothèse est que ces composés sont des isomères, étant donné leur masse identique et leur temps d'élution différents. Du fait de ces probables isomères, les 15 masses finalement apparues significativement dans le spectre de masse, correspondent à plus de 40 pics chromatographiques et donc, plus de 40 microcystines potentiellement différentes.

La Figure 9 illustre le spectre de masse extrait sur l'ensemble de l'intervalle de temps d'élution des microcystines ( $t_R$  : 19-39 minutes).

L'ensemble des microcystines identifiées lors du screening par MALDI-TOF-MS est effectivement présent dans le chromatogramme et le spectre de masse de l'échantillon NRJ. La séparation HPLC, nous l'avons mentionné, a permis en outre, de mettre en évidence la présence de microcystines minoritaires et/ou masquées par les adduits de microcystines majoritaires (adduits Na, K). Enfin, la séparation HPLC a également permis de mettre en évidence, à priori, la présence d'isomères.

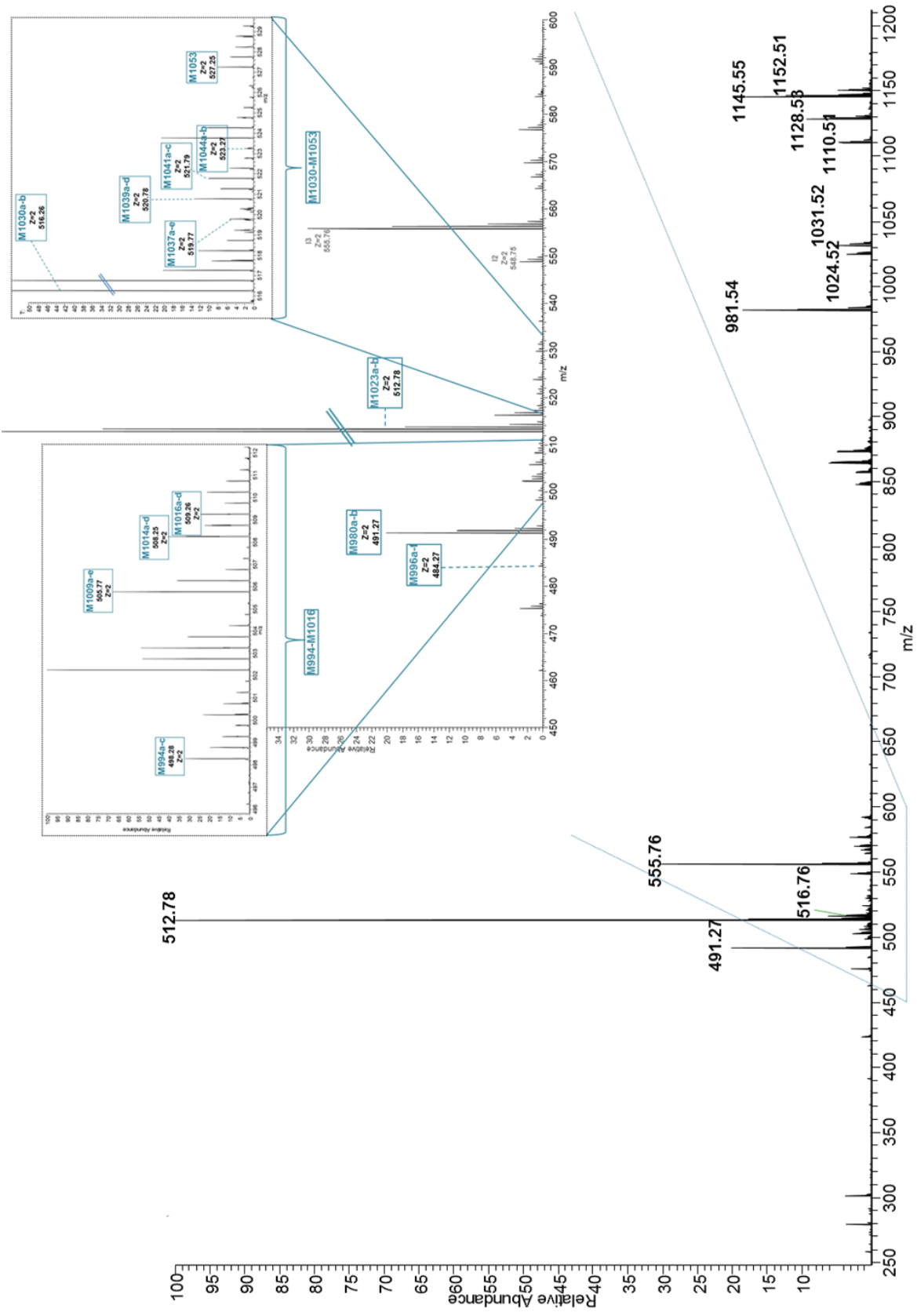


Figure 9 : Spectre de masse de l'échantillon NRJ pour les fractions HPLC éluées entre 19 et 39 minutes de gradient et zoom sur la gamme de masse 450-600 Da

### 4.3.1 Caractérisation des microcystines par HPLC-MS(/MS)

Les critères d'identification des microcystines sont l'étape d'extraction spécifique, les temps de rétention, l'observation d'un massif isotopique modifié par réduction suite à l'utilisation de la matrice 1,5-DAN, la présence des ions caractéristiques de  $m/z = 135$  Da dans le profil de fragmentation, la masse exacte et le profil de fragmentation MS/MS en ESI-CID réalisée dans l'Orbitrap.

Pour rappel, les microcystines sont des peptides cycliques constitués de 7 acides aminés. La séquence de base de chaque microcystine est cyclo(D-Ala<sup>1</sup>-L-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-L-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-Glu<sup>6</sup>-MDha<sup>7</sup>) où X et Z sont les deux acides aminés L variables dont l'abréviation en une lettre est utilisée en tant que suffixe du nom de la microcystine (MC-XZ), avec les acides aminés D-Ala (Alanine D), l'acide méthylaspartique (D-MeAsp), Adda - un acide  $\beta$ -aminé (acide (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phenyl-deca-4,6diénoïque), l'acide D-glutamique (D-Glu) et la N-méthylhydroalanine (MDha) (Figure 10).

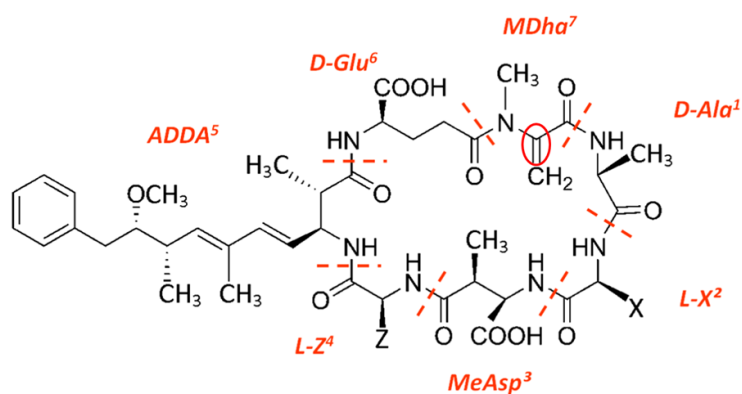


Figure 10 : Structure générale de la microcystine MC-XZ

D'un point de vue nomenclature, les acides aminés L en position 2 et 4 sont variables, de même que les acides aminés 1, 3, 5, 6 et 7 mais la nomenclature diffère pour ces derniers. Différentes variations au niveau de la structure des variants de microcystines peuvent également se manifester par la présence ou l'absence de groupement(s) méthyle(s) à différentes positions le long du cycle peptidique. Le Tableau 2 résume les modifications qui seront rencontrées au cours de ce travail, et la liste récente des microcystines répertoriées à ce jour est disponible en annexe ainsi que dans la publication de Bortoli<sup>195</sup>.

Tableau 2 : Structure des microcystines potentiellement présentes dans les échantillons environnementaux NRJ

Intitulé	AA 1	AA 2	AA 3	AA 4	AA 5	AA 6	AA 7
MC-XZ	D-Ala	L-X	D-MeAsp	L-Z	Adda	D-Glu	MDha
MC-LR	D-Ala	L-Leu	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-LR	D-Ala	L-Leu	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR	D-Ala	L-Leu	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha
[ADMAdda <sup>5</sup> ]-MC-LR	D-Ala	L-Leu	D-MeAsp	L-Arg	ADMAdda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR	D-Ala	L-Leu	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha
[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR	D-Ala	L-Leu	D-Asp	L-Arg	DMAdda	D-Glu	Dha
[Gly <sup>1</sup> , D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-LR	D-Gly	L-Leu	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> , D-Glu(OMe) <sup>6</sup> ]-MC-LR	D-Ala	L-Leu	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu(OMe)	MDha
[Gly <sup>1</sup> , D-Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> ]-MC-LR	D-Gly	L-Leu	D-Asp	L-Arg	ADMAdda	D-Glu	MDha
[(6Z)-Adda <sup>5</sup> ]-MC-LR	D-Ala	L-Leu	D-MeAsp	L-Arg	(6Z)-Adda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> , (E)(Z)-Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HilR	D-Ala	L-Hil	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	(E)(Z)-Dhb
MC-RR	D-Ala	L-Arg	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-RR	D-Ala	L-Arg	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-RR	D-Ala	L-Arg	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha
[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-RR	D-Ala	L-Arg	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha
[Gly <sup>1</sup> , D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-RR	D-Gly	L-Arg	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> , (E)(Z)-Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	D-Ala	L-Arg	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	(E)(Z)-Dhb
[Gly <sup>1</sup> , D-Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> ]-MC-RR	D-Gly	L-Arg	D-Asp	L-Arg	ADMAdda	D-Glu	MDha
[L-Ser <sup>7</sup> ]-MC-RR	D-Ala	L-Arg	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Ser
[D-Asp <sup>3</sup> , L-MeSer <sup>7</sup> ]-MC-RR	D-Ala	L-Arg	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	MeSer
MC-FR	D-Ala	L-Phe	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-FR	D-Ala	L-Phe	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	D-Ala	L-Phe	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha
MC-YR	D-Ala	L-Tyr	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-YR	D-Ala	L-Tyr	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-YR	D-Ala	L-Tyr	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha
[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-YR	D-Ala	L-Tyr	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha
MC-HtyR	D-Ala	L-Hty	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-HtyR	D-Ala	L-Hty	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-HtyR	D-Ala	L-Hty	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha
[D-Asp <sup>3</sup> , (E)(Z)-Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HtyR	D-Ala	L-Hty	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	(E)(Z)-Dhb
[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-HtyR	D-Ala	L-Hty	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha
MC-M(O)R	D-Ala	L-Met(O)	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	D-Ala	L-Met(O)	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
MC-WR	D-Ala	L-Trp	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-WR	D-Ala	L-Trp	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	MDha
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	D-Ala	L-Trp	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Dha

Avec ADMAdda : O-Acetyl-O-demethyl Adda ; Dha : Déhydroalanine ; Dhb : Acide déhydrobutyrique, Hil : Homoisoleucine ; Hty : Homotyrosine ; M(O) : Methionine-S-Oxyde, (E)(Z) : stéréochimie absolue au niveau de la double liaison

L'analyse attentive des séquences des différentes microcystines (Tableau 2) permet de constater le nombre important de composés de mêmes masses (isomères) – distingués uniquement par la position d'un méthyle (en 3 ou 7 pour MeAsp et MDha par exemple) ou dont la seule différence consiste en une modification de la stéréochimie absolue au niveau des doubles liaisons d'un acide aminé (stéréo-isomères). Ces stéréoisomères (diastéréoisomères et énantiomères) possèdent tous la même masse, la même formule brute mais présentent cependant des toxicités différentes et des propriétés physiques (temps de rétention notamment) différentes.

Après analyse du chromatogramme et isolement des candidats potentiels sur base de l'analyse des spectres de masse MS et MS/MS, chaque microcystine est confrontée à la littérature afin d'effectuer une pré-identification sur seule base de la masse moléculaire. Ainsi la masse exacte, calculée sur base de la formule brute estimée, est comparée à la masse expérimentale mesurée sur un appareil à haute résolution et précision de mesure. Une erreur supérieure à 5 ppm est considérée comme indicatrice d'une mauvaise identification. La dernière étape discriminante est l'analyse des spectres MS/MS de chaque composé, si celle-ci est disponible. En effet, la MS/MS n'est réalisée au sein de l'analyseur que si le suivi est programmé ou si le signal d'un composé est suffisant, ce qui n'est pas toujours le cas, surtout en cas de co-élution avec un composé majoritaire.

A ce jour, bien que plus de 240 microcystines aient été décrites dans la littérature, de nombreux variants n'ont pas encore été décrits/découverts. Ainsi par exemple, dans ce travail, les microcystines M<sub>1016a</sub> (t<sub>R</sub> : 25.7 min), M<sub>1016b</sub> (t<sub>R</sub> : 26.95 min), M<sub>1016c</sub> (t<sub>R</sub> : 32.28 min) et M<sub>1016d</sub> (t<sub>R</sub> : 33.35 min) ont une masse monoisotopique correspondant, à 0.3, 0.7 et 2.3 ppm près, à la masse de la microcystine YR modifiée [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-YR ou [DMAdda<sup>5</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-YR (double deméthylation en position 3 et 7 ou en position 5 et 7). Toutefois, à ce jour, ces deux variants n'ont pas encore été décrits dans la littérature, bien que les variants mono-déméthylés aient été décrits<sup>195</sup>, de même que les variants doublement déméthylés des microcystines LR et RR par exemple<sup>51</sup>. Il s'agit donc d'hypothèses de travail, très probables mais concernant des composés n'ayant jamais été observés et/ou décrits.

Notons enfin que, ainsi qu'il est aisément observable dans le Tableau 2 et la Figure 9, l'échantillon contient un grand nombre de microcystines différentes concentrées sur une gamme de masse très réduite (43 microcystines entre 484 et 535 Da). La première problématique liée à cette concentration de microcystines est la différenciation entre le deuxième, troisième ou quatrième pic d'une distribution isotopique d'une microcystine abondante avec la masse monoisotopique d'une autre microcystine. En outre, d'un point de vue technique, les spectromètres de masses ne peuvent sélectionner exactement un ion précurseur. Dans le cas de l'Orbitrap Q Exactive, en mode MS/MS, cette précision est de 2 Da. Il est donc très important, lors de l'analyse, de ne jamais perdre de vue ces deux aspects dans l'analyse du profil de fragmentation de la microcystine cible. Notons enfin que la spécificité de sélection de l'appareil en MS/MS a également plus d'impact lorsqu'il s'agit de la sélection d'ions dichargés par rapport aux monochargés. En effet, la précision de la sélection est de 2 Da, qu'il s'agisse d'ions mono ou multichargés. Enfin, le spectre de masse est également riche d'adduits cationiques, qui doivent être identifiés afin d'éviter la confusion avec une nouvelle microcystine.

La Figure 11 illustre par un exemple, une situation rencontrée au cours de l'analyse des chromatogrammes des échantillons environnementaux. Dans ce cas, l'objectif était de reconstruire le chromatogramme de la masse 520.77 Da, correspondant aux composés M<sub>1039a-d</sub>. On peut constater, sur la Figure 11 qu'en reconstruisant le courant sur base de la masse 520 (gamme de masse 520.76-520.79), le chromatogramme contient également la contribution du second isotope des ions de m/z = 519.77 Da. Cet ion correspond également à une microcystine M<sub>1037a-e</sub>. Cet exemple souligne également le fait que, sur un intervalle de temps de 0.08 secondes, le composé majoritaire dans le spectre de masse peut passer de M<sub>1037c</sub> à M<sub>1039d</sub>. Dans ce cas, bien que la chromatographie apporte une sélectivité importante, elle ne permet donc pas de séparer ces deux microcystines de masses et temps d'éluion très proches. Nous constatons enfin sur cette figure, qu'un autre composé de m/z très proche (2 Da) co-élué avec M<sub>1039d</sub>. Il s'agit de M<sub>1041c</sub>. Toutefois, avec une capacité de sélection de 2 Da, le risque que les fragments de la toxine M<sub>1039d</sub> soient attribuables à la toxine M<sub>1041c</sub> est nettement moindre dans ce cas.

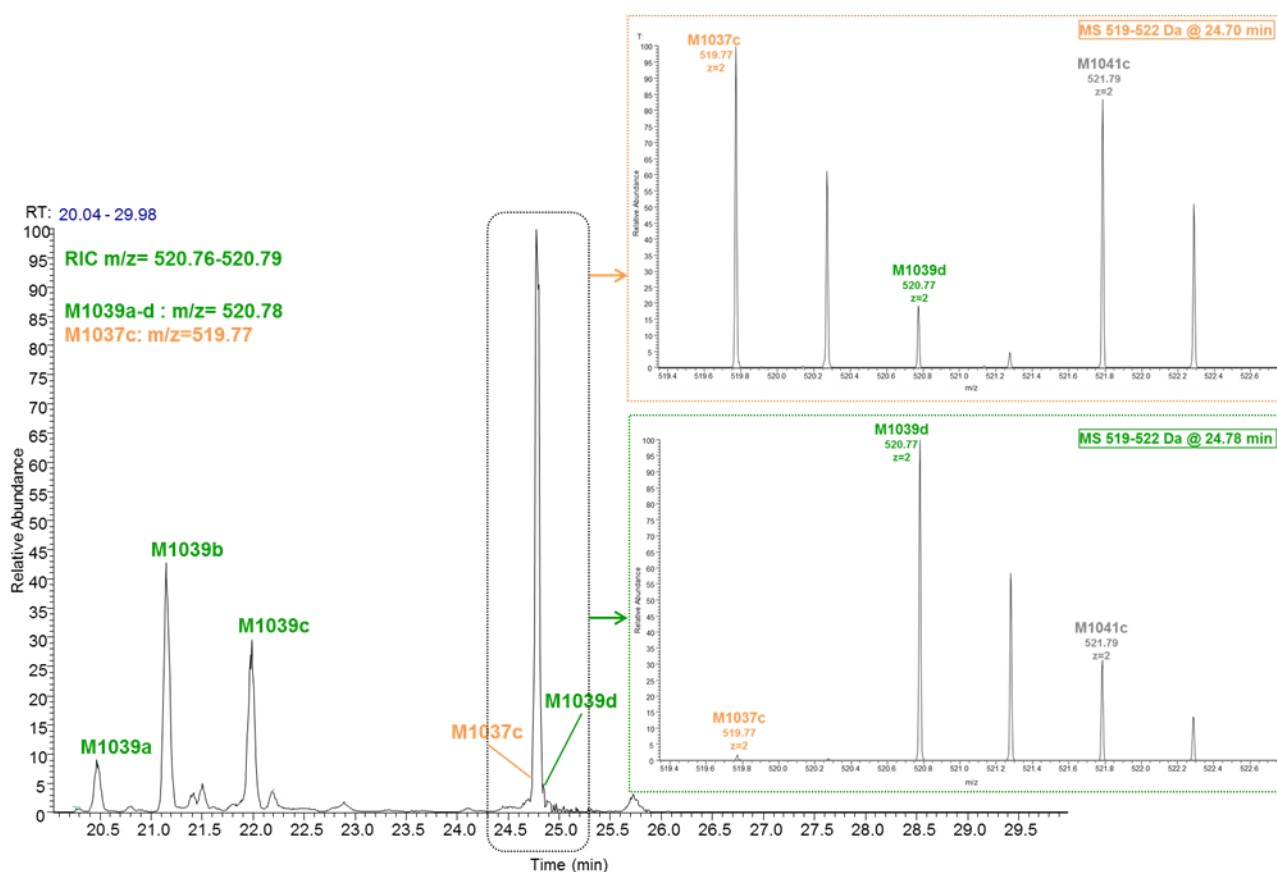


Figure 11 : Chromatogramme reconstruit sur la masse 520.7 de l'échantillon NRJ4 et spectres MS/MS associés

Le point suivant présente les résultats de l'identification des microcystines de l'échantillon environnemental.

## 4.4 Identification de microcystines environnementales

### 4.4.1 *Préambule et stratégie analytique*

Une partie importante de ce travail a été l'élaboration d'une base de données de microcystines et de leurs fragments. La littérature recense en effet de nombreuses microcystines et détaille quelques profils de fragmentation mais elle est nettement insuffisante pour permettre l'identification de microcystines inconnues.

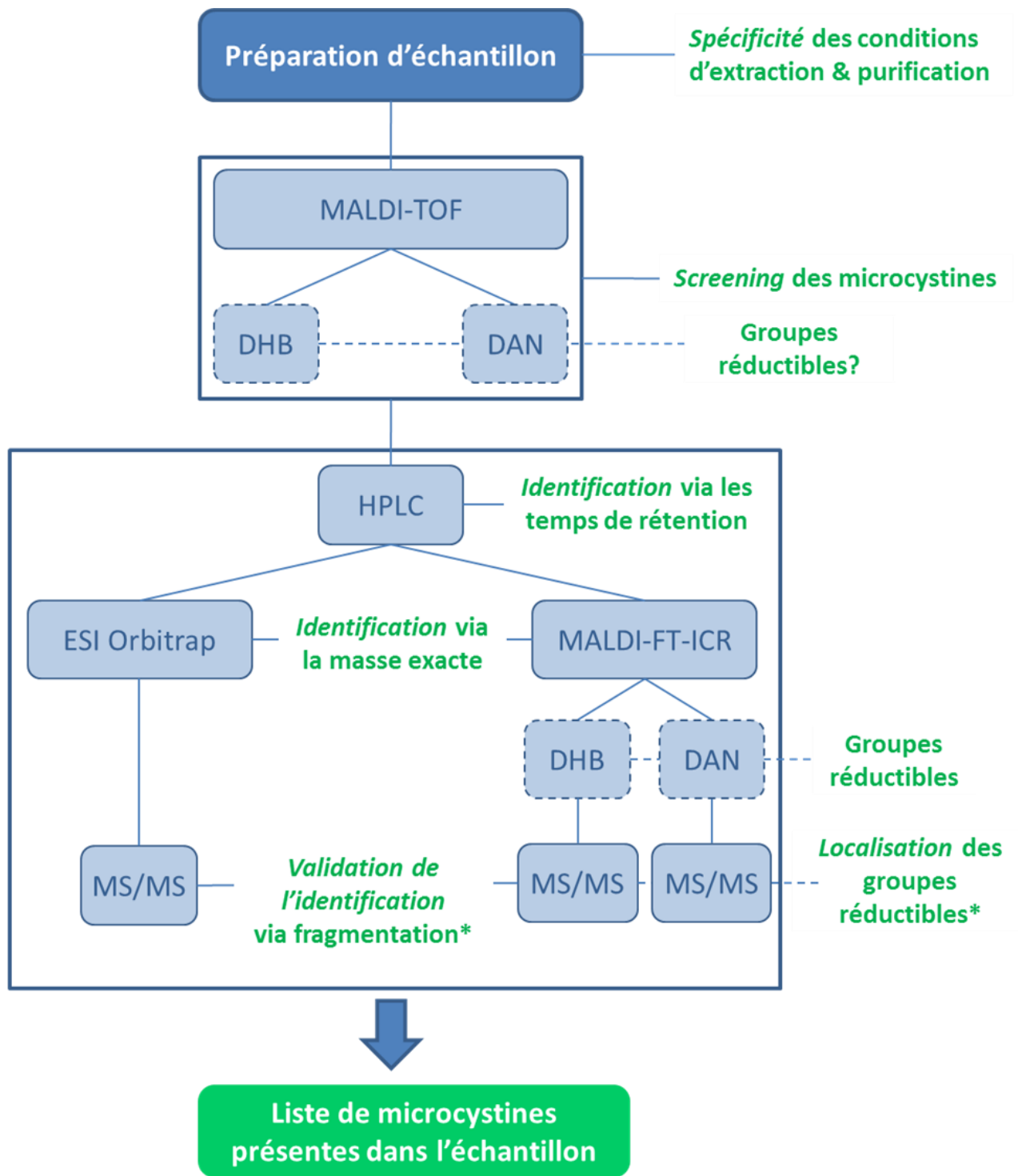
Suite à ce constat, et afin d'exploiter au maximum les performances en termes de résolution obtenues au sein des deux analyseurs que sont l'Orbitrap et le FT-ICR, nous avons décidé de constituer une base de données interne. Sur base des fragments décrits dans la littérature, sur base de fragments non encore décrits, mais dont l'occurrence est très probable, et sur base des familles de microcystines potentiellement présentes dans notre échantillon, une liste d'une centaine de fragments – calculés pour une cinquantaine de variants possibles de microcystines, a été établie. Les structures de certaines microcystines étant parfois tellement proches, nous avons souhaité ajouter un critère d'identification supplémentaire en exploitant les possibilités de masse exacte offertes par les deux analyseurs utilisés.

Le résultat, disponible en Annexe III, est un outil puissant, et inaccessible par ailleurs, qui permet d'exploiter au maximum la haute résolution tant en MS qu'en MS/MS pour parvenir à l'identification de microcystines connues ou inconnues, sur base, entre autres, de leur profil de fragmentation.

La stratégie analytique de cette application environnementale est résumée sur la Figure 12. L'échantillon environnemental est extrait, tel que nous l'avons décrit dans les points précédents, selon un protocole spécifique aux microcystines. Par ailleurs, l'étape de purification, via ZipTip®, est destinée à éluer les microcystines tout en les séparant de co-extraits non élués. Les étapes de préparation d'échantillon contribuent donc à la spécificité de la méthode globale.

Les extraits sont ensuite analysés par MALDI-TOF-MS, en matrice classique 2,5-DHB et en matrice réductrice 1,5-DAN. Cette étape est cruciale car elle permet, via la masse, d'évaluer la présence de microcystines connues dans l'échantillon. Enfin, l'utilisation combinée de matrices classiques et réductrices permet, via comparaison des spectres MS, de déterminer si certains composés possèdent un ou plusieurs groupements réductibles. Cette information peut ensuite être corrélée, le cas échéant, avec la présence de microcystines réductibles.

Si la présence de microcystines est avérée après screening en MALDI-TOF, les échantillons sont analysés par HPLC. La séparation chromatographique, réalisée sur une même colonne, est ensuite analysée, online, par ESI-MS au sein de l'Orbitrap et off-line par MALDI-MS, au sein de l'analyseur FT-ICR. Cette étape permet d'accéder à deux critères d'identification supplémentaires, via le temps de rétention de la microcystine en HPLC d'une part, et via la haute résolution sur la masse dans les analyseurs Orbitrap et FT-ICR.



\* Base de données de fragments en masse exacte

Figure 12 : Représentation schématique de la stratégie analytique

L'analyse de la fragmentation MS/MS au sein de l'Orbitrap permet, si la fragmentation est suffisamment riche et spécifique, la validation de l'hypothèse et l'identification de la microcystine.

D'autre part, l'analyse des spectres MS et MS/MS obtenus en MALDI, sur les matrices classiques et réductrices permet quant à elle d'obtenir, outre une identification via la fragmentation MS/MS, une localisation de la position de la double liaison – si elle existe.

La combinaison de ces étapes permet, au terme de l'analyse des données, l'identification d'un nombre significatif de microcystines dans l'échantillon environnemental.

#### **4.4.2 Identification des microcystines MC-LR et apparentées**

##### *4.4.2.1 Composés de masse MW:966.52*

L'analyse du chromatogramme a mis en évidence, à plusieurs temps de rétention, un composé de masse moléculaire 966.52. La première étape est la reconstruction du chromatogramme, sur base du courant des ions suivis. En ESI-Orbitrap, les ions majoritaires étaient les ions dichargés  $[M+2H]^{2+} = 484.27$  Da. La Figure 13 représente le tracé chromatographique reconstruit sur base du courant produit par les ions de  $m/z$  compris entre 484.25-484.29 Da.

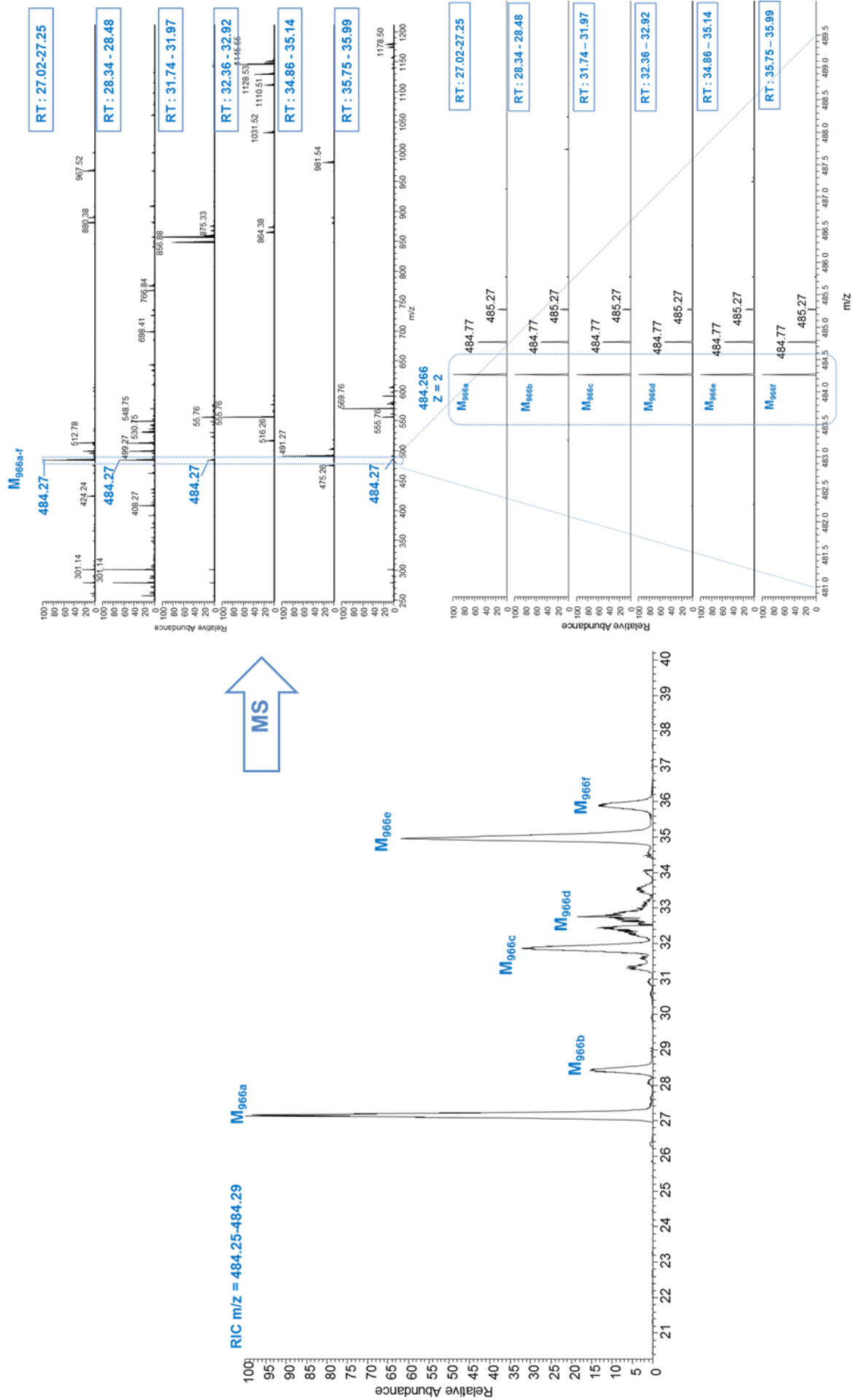


Figure 13 : RIC de la masse 484.27 et spectres de masse associés aux 6 pics d'éluion du RIC

Six composés, M<sub>966a-f</sub>, de même masse moléculaire, éluent entre la minute 27 et la minute 36 sur le chromatogramme.

La formule moléculaire de ces composés (C<sub>47</sub>H<sub>70</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>) est déterminée sur base de la masse exacte obtenue dans le spectre ESI-MS (Orbitrap). Les critères d'attribution de la composition élémentaire sont les suivants : C45-55, H60-82, N6-14 et O11-15, à moins de 5 ppm près. Ces critères sont basés sur la composition élémentaire de l'ensemble des microcystines décrites dans la littérature à ce jour<sup>195</sup>. Le nombre de candidats potentiels pour chaque formule moléculaire variait entre 1 et 5. Les composés inconnus étant versés, en raison de la présence de l'ion diagnostique [Ph-CH<sub>2</sub>-CH=OR]<sup>+</sup> dans le spectre MS<sup>2</sup>, dans la famille des microcystines, la détermination de la formule moléculaire a été effectuée par comparaison des candidats avec les formules brutes des microcystines rapportées dans la littérature.

La fragmentation MS/MS, acquise via l'analyse à l'Orbitrap avec liste d'inclusion, est disponible pour l'ensemble des six microcystines. Toutefois, seule la fragmentation MS/MS de M<sub>966a</sub> via MALDI-FT-ICR est disponible car les composés inconnus initialement n'ont pas été fragmentés dans les différents dépôts HPLC-MALDI lors de notre analyse.

L'ion de m/z = 484.27 Da pourrait correspondre à deux microcystines *connues* au moment de l'analyse: [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR<sup>195,196</sup> et [Gly<sup>1</sup>, D-Asp<sup>3</sup>]-MC-LR<sup>195,197</sup>. Globalement, la formule brute correspond à un variant de la microcystine LR doublement déméthylé. Nous l'avons vu, outre les microcystines déjà décrites, les positions sur lesquelles le groupement méthyle est particulièrement labile sont généralement la position 1 (Ala remplacé par Gly), la position 3 (MeAsp ou Asp), la position 5 (Adda ou DMAdda) et la position 7 (MDha ou Dha). Les spectres MS/MS sont présentés en Figure 14 et Figure 15. Les fragments apportant une information significative quant aux acides aminés présents dans la microcystine M<sub>966a</sub> sont mis en évidence par un code couleur. Ainsi, la leucine en position 2 apparaît en mauve, l'acide aminé MeAsp en position 3 en gris dans le spectre, la présence de l'acide aminé Adda déméthylé (DMAdda) est soulignée en vert et enfin, les fragments contenant Dha apparaissent en orange.

#### 4.4.2.1.1 Identification M<sub>966a</sub>

La première information importante est l'absence des ions de m/z = 135.08 Da couplée à la présence des ions m/z = 121.06 Da ([Ph-CH<sub>2</sub>-CH=OH]<sup>+</sup>), indiquant que l'un des acides aminés déméthylé peut être le groupement DMAdda. En effet, ainsi qu'illustré sur le schéma de fragmentation (Figure 16), l'ion diagnostique m/z = 135 Da correspond à un fragment de l'acide aminé Adda non modifié.

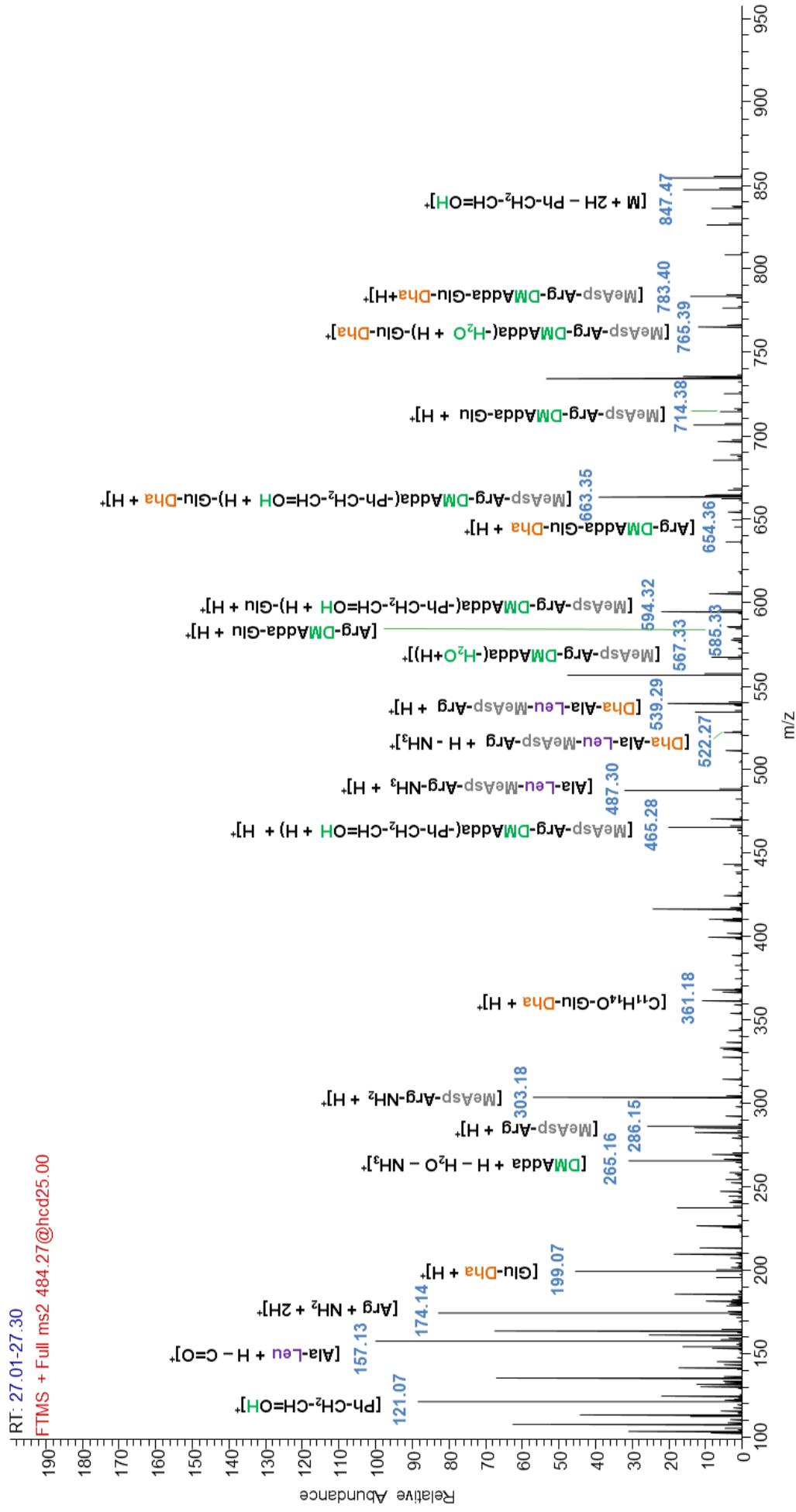


Figure 14 : MS<sup>2</sup> de M<sub>966a</sub> à m/z = 484.27 Da via ESI-HCD-MS<sup>2</sup> (Orbitrap Q Exactive)

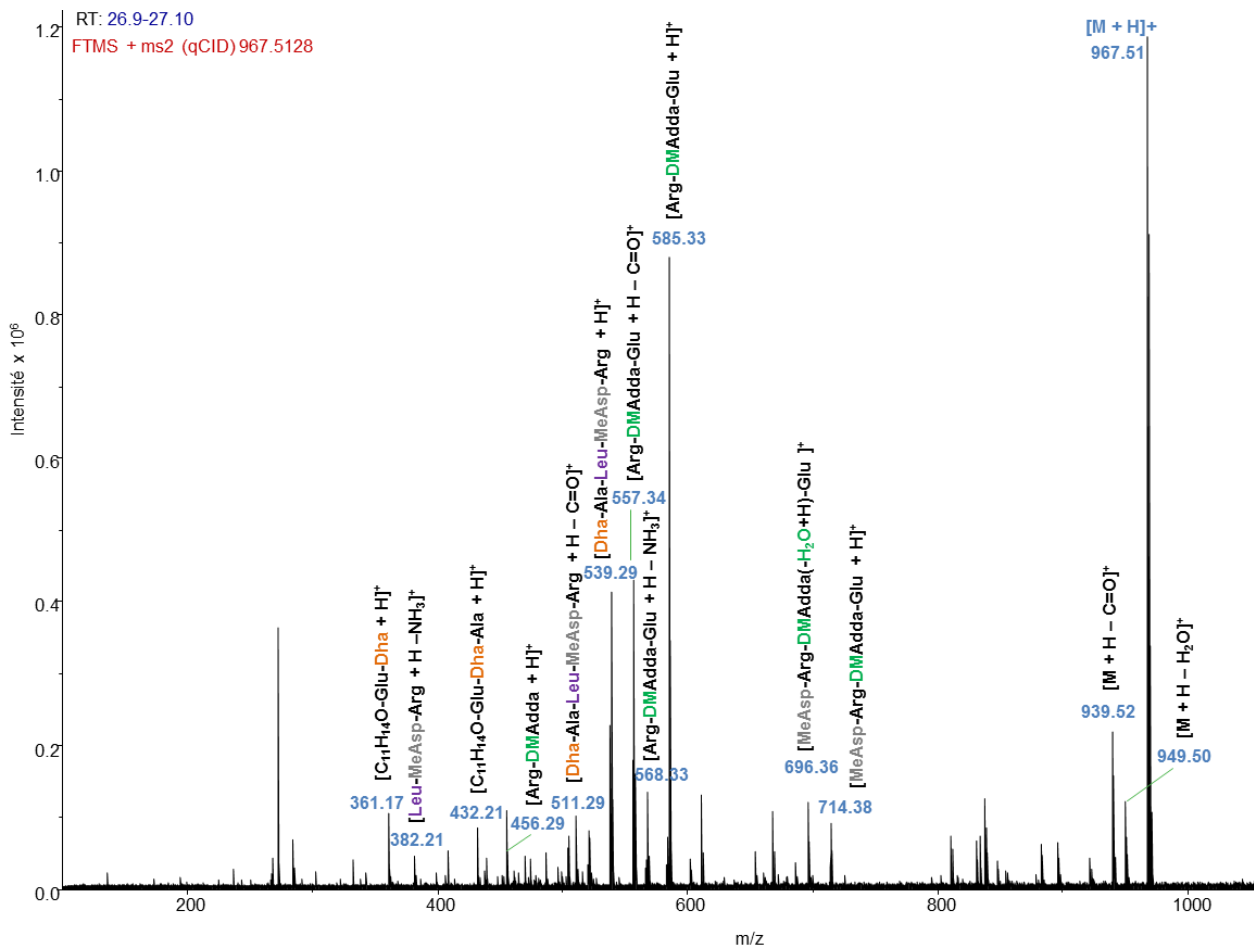


Figure 15 : MS<sup>2</sup> de M<sub>966a</sub> à m/z = 484.27 Da via MALDI-CID-MS (FT-ICR Solarix)

Par ailleurs, les ions de m/z = 157.13 Da ([Ala-Leu + H - C=O]<sup>+</sup>) est indicatif de la présence du groupement Ala en position 1 et de la présence de l'acide aminé Leucine. En outre, les ions de m/z = 286.15 Da ([MeAsp-Arg+H]<sup>+</sup>), 303.18 Da ([MeAsp-Arg-NH<sub>2</sub> + 2H]<sup>+</sup>) et 487.30 Da ([Ala-Leu-MeAsp-Arg-NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>) indiquent la présence de l'acide aminé MeAsp en position 3. D'autre part, les ions diagnostiques à m/z = 361.17 Da ([C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O-Glu-Dha + H]<sup>+</sup>) et m/z = 432.21 Da ([Ala-Leu-MeAsp-Arg + H]<sup>+</sup>) indiquent la présence de l'acide aminé Dha en position 7, à la place de MDha dans la structure de base. La confirmation de la présence du groupement DMAdda en position 5 est apportée par les fragments de m/z = 557.32 Da ([Arg-DMAdda-Glu + H - CO]<sup>+</sup>), 568.3322 Da ([Arg-DMAdda-Glu+H - NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), et 714,38 Da ([MeAsp-Arg-DMAdda-Glu + H]<sup>+</sup>) détectés dans les spectres de fragmentation obtenus au moyen du couplage ESI-MS/MS (Orbitrap) et MALDI-FT-ICR-MS/MS. L'analyse du schéma de fragmentation complet de M<sub>966a</sub> (Figure 14 et Figure 15) mène à son identification, à savoir la microcystine [DMAdda<sup>5</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR. Ce composé n'a, à notre connaissance, jamais été décrit dans la littérature.

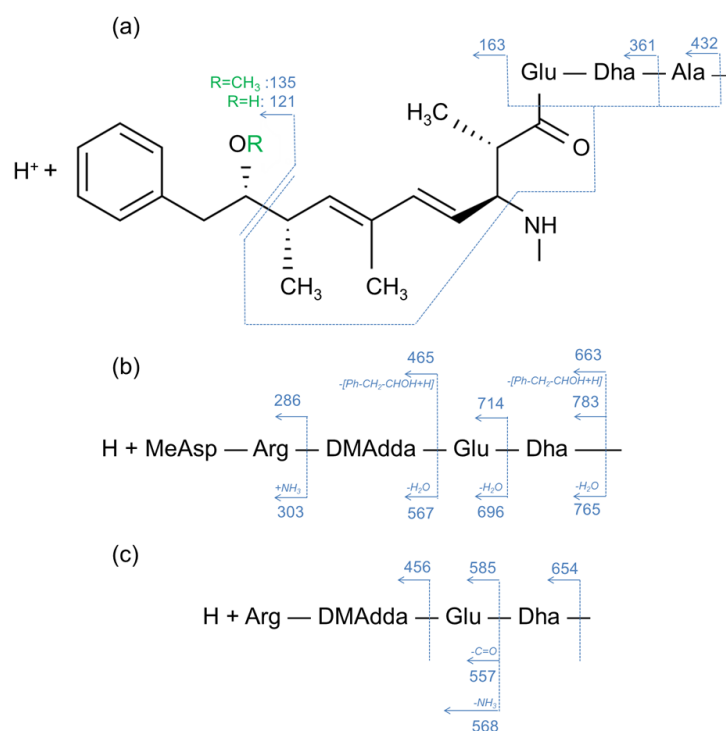


Figure 16 : Schémas de fragmentation observés dans le spectre de masse MS/MS (CID/HCD) de  $M_{966a}$  (ions exprimés en  $m/z$ )

Au cours de l'identification de  $M_{966a}$ , quelques fragments apparemment contradictoires ont été recensés dans le spectre MS/MS. En effet, la masse 135.12 apparaissait dans le spectre MS/MS, faisant penser à la présence du groupement Adda, dont  $m/z = 135$  Da est l'ion diagnostique. Toutefois, grâce à la masse exacte, tant dans le spectre de masse que dans la base de données, nous avons pu clarifier ce point. En effet, les ions  $[\text{Ph-CH}_2\text{-CH=OCH}_3]^+$  de formule brute  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}$  ont une masse exacte de 135.08099 Da. Les ions apparaissant dans le spectre MS/MS présentaient une différence de masse de plus de 200 ppm (269 ppm), ce qui exclut qu'ils correspondent au fragment  $[\text{Ph-CH}_2\text{-CH=OCH}_3]^+$ .

Le Tableau 3 présente l'ensemble des fragments présents dans les spectres de fragmentation des ions de  $m/z = 484.27$  Da, en ESI-MS<sup>2</sup> pour les six microcystines de  $m/z = 966.52$  Da. Le Tableau 3 présente également les fragments obtenus, pour le composé  $M_{966a}$ , via MALDI-MS<sup>2</sup>. Le spectre MS/MS en MALDI-MS<sup>2</sup> est moins riche que le spectre de fragmentation acquis au sein de l'Orbitrap, toutefois il est très informatif. En effet, dans le cas de  $M_{966a}$ , 40% des fragments observés en MALDI-MS<sup>2</sup> étaient absents dans le spectre ESI-CID-MS enregistré dans l'Orbitrap. Les deux techniques se révèlent donc complémentaires.

Tableau 3 : Fragments de  $M_{966a-f}$  en ESI-HCD-MS<sup>2</sup> (Orbitrap) et  $M_{966a}$  en MALDI-CID-MS<sup>2</sup> (FT-ICR)

Composition de l'ion	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-LR		[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-LR		$M_{966a}$ tr : 27.17min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	$M_{966a}$ tr : 27.13 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	$M_{966b}$ tr : 28.41 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	$M_{966c}$ tr : 31.87 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	$M_{966d}$ tr : 32.76 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	$M_{966e}$ tr : 34.96 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	$M_{966f}$ tr : 35.89 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap											
	121.0648	135.0804	141.0659	157.1335								163.1117	174.1349	199.0713	265.1587	254.1499	270.1084	286.1510	303.1775	361.1758	382.2085	432.2129
[Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>+</sup>	121.0648	135.0804			121.0650 <sup>(a)</sup>	-	135.080 <sup>(b)</sup>	135.0801 <sup>(b)</sup>	135.080 <sup>(b)</sup>	135.0800 <sup>(b)</sup>	135.0800 <sup>(b)</sup>											
[Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	141.0659	141.0659	141.0659		141.0660	-	141.0657	141.0655	-	141.0654	-											
[Ala-Leu + H - C=O] <sup>+</sup>	157.1335	157.1335	157.1335		157.1337	-	157.1332	157.1330	157.1332	157.1330	157.1332											
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O + H] <sup>+</sup>	163.1117	163.1117	163.1117		163.1119	-	163.1112	-	-	163.1111	163.1108											
[Arg + NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	174.1349	174.1349	174.1349		174.1351	-	174.1344	174.1346	174.1344	174.1345	174.1344											
[Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	199.0713	199.0713	199.0713		199.0715	-	199.0708	199.0706	199.0706	199.0706	199.0706											
[Adda + H - ROH - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	265.1587	265.1587	265.1587		265.1588	-	265.1585	265.1575	265.1578	265.1578	265.1578											
[Dha-Ala-Leu + H] <sup>+</sup>	254.1499	254.1499	254.1499		254.1906	-	254.1499	-	-	-	-											
[Glu-Dha-Ala+H] <sup>+</sup>	270.1084	270.1084	270.1084		270.1085	-	-	-	-	-	-											
[MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup>	286.1510	272.1353	286.1511	286.1505	286.1511	286.1505	-	286.1501	286.1506	272.1345 <sup>(d)</sup>	272.1333 <sup>(d)</sup>											
[MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	303.1775	289.1619	303.1777	303.1748	303.1777	303.1748	303.1770	303.1770	303.1767	289.1609 <sup>(d)</sup>	289.1612 <sup>(d)</sup>											
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	361.1758	361.1758	361.1762	361.1733	361.1762	361.1733	-	-	-	-	-											
[Leu-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	382.2085	368.1928	-	382.2057	-	382.2057	-	-	-	-	-											
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	432.2129	432.2129	432.2131	432.2095	432.2131	432.2095	-	-	-	-	-											
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR+H)+ H] <sup>+</sup>	465.2820	451.2663	465.2824	-	465.2824	-	-	465.3055 <sup>(a)</sup>	465.2802 <sup>(a)</sup> 451.2641 <sup>(b,d)</sup>	465.2802 <sup>(a)</sup> 451.3142 <sup>(b,d)</sup>	-											
[Ala-Leu-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	470.2722	456.2565	470.2721	470.2684	470.2721	470.2684	-	-	-	-	-											
[Arg-Adda + H] <sup>+</sup>	456.2969	470.3126	-	456.2930 <sup>(e)</sup>	-	456.2930 <sup>(e)</sup>	-	-	-	-	-											
[Ala-Leu-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	487.2987	473.2831	487.2991	487.2258	487.2991	487.2258	487.2966	487.2974	487.2975	473.2823 <sup>(d)</sup>	473.2806 <sup>(d)</sup>											
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg + H - CO] <sup>+</sup>	511.2987	497.2831	-	511.2943	-	511.2943	-	-	497.2845 <sup>(d)</sup>	497.2845 <sup>(d)</sup>	-											
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	522.2671	508.2514	522.2674	-	522.2674	-	-	522.2665	-	508.2504 <sup>(d)</sup>	-											
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	539.2936	525.2780	539.2941	539.2890	539.2941	539.2890	-	539.2915	539.2927	525.2765 <sup>(d)</sup>	-											
[MeAsp-Arg-Adda(-ROH+H)] <sup>+</sup>	567.3289	553.3133	567.3294	-	567.3294	-	-	553.3114 <sup>(d)</sup>	553.3113 <sup>(d)</sup>	553.3100 <sup>(d)</sup>	-											

Composition de l'ion	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-LR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-LR	M <sub>966a</sub> tr : 27.17min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>966a</sub> tr : 27.13 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>966b</sub> tr : 28.41 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>966c</sub> tr : 31.87 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>966d</sub> tr : 32.76 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>966e</sub> tr : 34.96 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>966f</sub> tr : 35.89 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	556.3202	542.3045	556.3206	556.3150	556.3185	556.3184	556.3193	542.3028 <sup>(d)</sup>	542.2997 <sup>(d)</sup>
[Arg-Adda-Glu + H - CO] <sup>+</sup>	557.3446	571.3602	-	557.3398 <sup>(e)</sup>	557.2741	557.3028	557.3233	-	-
[Arg-Adda-Glu+H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	568.3130	582.3286	-	568.3079 <sup>(e)</sup>	-	-	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR+H)-Glu + H] <sup>+</sup>	594.3246	580.3089	594.3252	-	-	-	-	580.3077 <sup>(d)</sup>	-
[Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup>	585.3395	599.3552	585.3400 <sup>(e)</sup>	585.3342 <sup>(e)</sup>	-	-	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR+H)-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	663.3461	649.3304	663.3464	-	-	-	-	-	-
[Glu-Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	668.3362	654.3206	668.3356	668.3703	-	-	-	-	-
[Arg-Adda-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	654.3610	682.3923	654.3620 <sup>(e)</sup>	-	-	-	654.3598 <sup>(c)</sup>	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(-ROH+H)-Glu] <sup>+</sup>	696.3715	682.3559	696.3718	696.3647	696.3698	682.3556 <sup>(d)</sup>	682.3550 <sup>(d)</sup>	682.3541 <sup>(d)</sup>	-
[MeAsp-Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup>	714.3821	714.3821	714.3816 <sup>(e)</sup>	714.3750 <sup>(e)</sup>	-	-	-	-	-
[Ala-Leu-MeAsp-Arg-Adda(-ROH) + H] <sup>+</sup>	751.4501	737.4345	-	-	-	-	737.4325 <sup>(d)</sup>	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(-ROH+H)-Glu-Dha] <sup>+</sup>	765.3930	751.3774	765.3932	-	-	751.3725 <sup>(d)</sup>	751.3765 <sup>(d)</sup>	751.3750 <sup>(d)</sup>	-
[MeAsp-Arg-Adda-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	783.4036	783.4036	783.4035	-	783.3955	783.4003	783.4052	783.3999	-
[MeAsp-Arg-Adda(-ROH+H)-Glu-Dha-Ala] <sup>+</sup>	836.4301	822.4145	-	-	-	822.4101 <sup>(d)</sup>	822.4117 <sup>(d)</sup>	822.4103 <sup>(d)</sup>	-
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-Adda + H - CO] <sup>+</sup>	-	-	-	810.4813	-	-	-	-	-
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>+</sup>	847.4672	833.4516	847.4667 <sup>(e)</sup>	-	-	833.4480 <sup>(b)</sup>	833.4495 <sup>(b)</sup>	833.4487 <sup>(b)</sup>	833.4496 <sup>(b)</sup>
[M + H - CO] <sup>+</sup>	939.5298	939.5298	-	939.5191	-	-	-	-	-
[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	949.5142	949.5142	-	949.5028	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>R = H (DMAdda), <sup>b</sup>R = CH<sub>3</sub> (Adda), <sup>c</sup> contient DMAdda au lieu de Adda, <sup>d</sup> contient D-Asp<sup>3</sup> au lieu de MeAsp<sup>3</sup>

Isomère et/ou mélange  
[DMAdda<sup>5</sup>,  
Dha<sup>7</sup>-MC-LR

Isomère et/ou mélange  
[Asp<sup>3</sup>,  
Dha<sup>7</sup>-MC-LR

Isomère et/ou mélange  
[Asp<sup>3</sup>,  
Dha<sup>7</sup>-MC-LR

#### 4.4.2.1.2 Identification M<sub>966e</sub> et M<sub>966f</sub>

Comme nous l'avons mentionné précédemment, plusieurs microcystines de même formule brute ont été mises en évidence dans le chromatogramme, à 6 temps de rétention différents. L'analyse du spectre de fragmentation a permis l'identification de la première d'entre elles, M<sub>966a</sub>. M<sub>966b-f</sub> ont également fait l'objet d'une analyse MS<sup>2</sup> et les fragments significatifs sont présentés dans le Tableau 3. Les masses théoriques des ions fils correspondant à la fragmentation de [DMAdda<sup>5</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR et [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR sont présentées dans les deux premières colonnes de ce Tableau 3.

Un code couleur est utilisé : la couleur verte correspond à un fragment issu des ions précurseurs de structure [DMAdda<sup>5</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR, la couleur bleue indique un fragment issu de [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR et la couleur grise est un fragment qui peut correspondre à chacune des deux structures envisagées.

Notons que seuls deux isomères ont été envisagés dans ce cas de figure, bien que d'autres combinaisons d'acides aminés soient possibles. Toutefois, le profil de fragmentation obtenu menait uniquement à ces deux structures.

Dans le cas de M<sub>966e</sub> et M<sub>966f</sub>, les ions de m/z = 135.08 Da [Ph-CH<sub>2</sub>-CH=OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> correspondant à un fragment de l'acide aminé Adda, sont présents dans le spectre MS<sup>2</sup>. La présence de ce fragment est un signal qu'il s'agit sans doute d'un isomère présentant une structure différente de M<sub>966a</sub>.

Les ions de m/z = 157.13 Da ([Ala-Leu + H - C=O]<sup>+</sup>) sont indicatifs de la présence du groupement Ala en position 1 et de la présence de l'acide aminé Leucine. En outre, les ions de m/z = 272.14 Da ([AspArg+H]<sup>+</sup>), 289.16 Da ([Asp-Arg-NH<sub>2</sub> + 2H]<sup>+</sup>) et 473.28 Da [Ala-Leu-Asp-Arg-NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup> combinés à l'absence de pic aux masses de 14 Da supérieures, indiquent la présence de l'acide aminé Asp en position 3. Il s'agit de la seconde différence par rapport à M<sub>966a</sub>, laquelle contenait l'acide aminé MeAsp dans sa structure. D'autre part, les ions de m/z = 141.07 Da ([Dha-Ala + H]<sup>+</sup>) et m/z = 199.07 Da ([Glu-Dha + H]<sup>+</sup>) indiquent la présence de l'acide aminé Dha en position 7, comme c'était le cas pour M<sub>966a</sub>. Les ions de m/z = 497.28 Da ([Dha-Ala-Leu-Asp-Arg + H - CO]<sup>+</sup>) confirment la présence simultanée, dans la structure de M<sub>966e</sub>, de l'acide aminé Asp<sup>3</sup> et de l'acide aminé Dha<sup>5</sup>. Enfin, la confirmation de la présence du groupement Adda en position 5 est apportée notamment par les ions fragments de m/z = 783.40 Da ([Asp-Arg-Adda-Glu-Dha + H]<sup>+</sup>).

L'analyse du spectre de fragmentation complet de M<sub>966e</sub> et M<sub>966f</sub> (Tableau 3) mène donc à la structure d'une microcystine correspondant à [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR. Ce composé a, à la différence de [DMAdda<sup>5</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR, fait l'objet de plusieurs publications<sup>141,195,198,199</sup>.

Un point important à soulever est que les composés M<sub>966e</sub> et M<sub>966f</sub> présentent la même masse exacte, le même profil de fragmentation mais des temps de rétention, résolus, et différant de 1 minute (t<sub>R</sub> : 34.97 min pour M<sub>966e</sub> et t<sub>R</sub> : 35.89 min pour M<sub>966f</sub>). L'analyse de leur profil de fragmentation conduit, pour les deux composés, à la même structure - [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR. A ce stade de l'analyse, nous ne disposons pas d'informations suffisantes pour différencier ces deux composés. Nous pouvons faire l'hypothèse qu'il s'agit de stéréo-isomères, donnant lieu aux mêmes ions fils lors d'une analyse MS<sup>2</sup> mais présentant un comportement physico-chimique légèrement différent

lors de la séparation HPLC. Notons que cet échantillon a, nous l'évoquerons dans les perspectives de ce travail, été analysé en HPLC-IMS-TOF mais que la mobilité ionique n'a pas pu, dans les conditions du test, résoudre les stéréo-isomères présents dans l'échantillon.

#### *4.4.2.1.3 Profil de fragmentation de $M_{966b}$ , $M_{966c}$ et $M_{966d}$*

L'analyse du tableau des fragments montre que si trois composés sont identifiés formellement, sur base d'une fragmentation cohérente menant à une identification, les microcystines  $M_{966b}$ ,  $M_{966c}$  et  $M_{966d}$  présentent un profil de fragmentation ambigu. En effet, l'ion diagnostique de  $m/z = 135.08$  Da, signe de la présence du groupement Adda, est présent dans le spectre MS<sup>2</sup> des trois microcystines  $M_{966b-d}$ , combiné à l'absence des ions de  $m/z = 121.06$  Da (diagnostiques de l'acide aminé Adda déméthylé). Par ailleurs,  $M_{966c}$  et  $M_{966d}$  possèdent le fragment  $[\text{MeAsp-Arg} + \text{H}]^+$  à  $m/z = 286.15$  Da, indiquant la présence dans leur structure de la version méthylée de l'acide aspartique en position 3. En outre, les spectres MS/MS de  $M_{966c}$  et  $M_{966d}$  présentent les traces de  $m/z = 451.26$  et  $465.28$  Da, attribuables aux ions  $[\text{MeAsp-Arg-Adda}(-\text{Ph-CH}_2-\text{CH}=\text{OCH}_3+\text{H}) + \text{H}]^+$  déméthylés pour la trace  $m/z = 451.26$  Da et méthylés pour la seconde trace. Le Tableau 3 présente l'ensemble des ions fragments identifiés pour les composés  $M_{966b}$ ,  $M_{966c}$  et  $M_{966d}$ . La conclusion de ce tableau est qu'il est impossible d'identifier ces trois variants sur base de leur spectre de fragmentation. L'analyse du spectre de fragmentation mène à la conclusion que soit le composé est inconnu, soit chacun des trois composés  $M_{966b}$ ,  $M_{966c}$  et  $M_{966d}$  est constitué d'un mélange d'isomères, ce qui expliquerait la contradiction des profils de fragmentation.

#### *4.4.2.2 Composés de masse MW:980.53 et 994.55*

L'analyse du chromatogramme a permis de mettre en évidence, à plusieurs temps de rétention, les composés de  $m/z = 980.53$  et  $994.55$  Da. La première étape est la reconstruction du chromatogramme, sur base du courant des ions suivis. En ESI-MS (Orbitrap), les ions majoritaires étaient les ions dichargés  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  à  $m/z = 491.27$  et  $498.28$  Da.

La Figure 17 représente le tracé chromatographique reconstruit sur base du courant produit par les ions de  $m/z$  compris entre  $491.27$  et  $491.28$  Da et  $498.28$  et  $498.29$  Da.

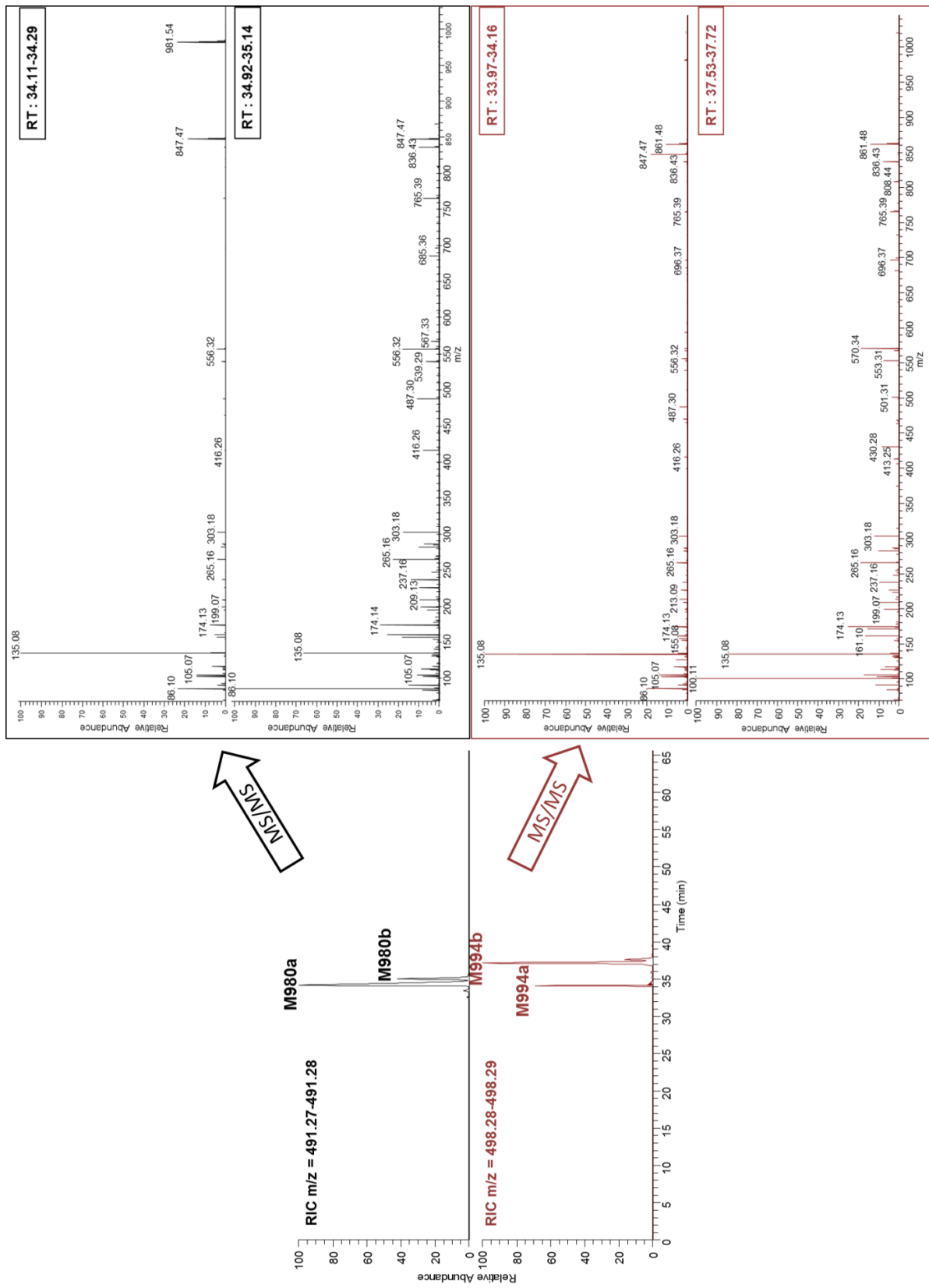


Figure 17 : RIC des ions de  $m/z = 491.27$  et  $498.28$  Da et spectres de masse ESI-MS (Orbitrap) associés aux pics d'éluion du RIC

Deux composés, M<sub>980a</sub> et M<sub>980b</sub>, de même masse moléculaire, éluent entre la minute 34 et la minute 35.5 sur le chromatogramme et deux composés, M<sub>994a</sub> et M<sub>994b</sub>, éluent entre la minute 33.5 et la minute 38.5.

La formule moléculaire de ces composés (C<sub>48</sub>H<sub>72</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub> et C<sub>49</sub>H<sub>74</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>) est déterminée sur base de la masse exacte obtenue dans le spectre ESI-MS (Orbitrap).

La fragmentation MS/MS, réalisée au sein de l'Orbitrap avec liste d'inclusion, est disponible pour chaque microcystine cependant, seule la fragmentation MS/MS de M<sub>980a</sub> et M<sub>994b</sub> via MALDI-FT-ICR est disponible car les composés inconnus initialement n'ont pas été fragmentés dans les différents dépôts HPLC-MALDI lors de notre analyse.

L'ion de m/z = 491.27 Da pourrait correspondre à six microcystines *connues* au moment de l'analyse : [D-Asp<sup>3</sup>]-MC-LR, [D-Asp<sup>3</sup>, (E)/(Z)-Dhb<sup>7</sup>]-MC-LR, [DMAdda<sup>5</sup>]-MC-LR, [Dha<sup>7</sup>]-MC-LR<sup>195,196</sup> et [Gly<sup>1</sup>, D-Asp<sup>3</sup>]-MC-LHar<sup>195,197</sup>. Globalement, la formule brute correspond à un variant de la microcystine LR déméthylé.

L'ion à m/z = 498.27 Da pourrait correspondre, quant à lui, à 10 microcystines répertoriées dans la littérature, dont la plus connue de toutes, la microcystine LR. Les autres variants reportés présentant la même formule brute sont : [(6Z)-Adda<sup>5</sup>]-MC-LR<sup>12</sup>, [Gly<sup>1</sup>, D-Asp<sup>3</sup>, ADMAdda<sup>5</sup>]-MC-LHar<sup>12</sup>, [D-Asp<sup>3</sup>, D-Glu(OCH<sub>3</sub>)<sup>6</sup>]-MC-LR et [D-Asp<sup>3</sup>, (E)-Dhb<sup>7</sup>]-MC-HilR<sup>195,196</sup>. Globalement, la formule brute correspond à un variant de la microcystine LR.

#### 4.4.2.2.1 Identification M<sub>980</sub> et M<sub>994</sub>

Le Tableau 4 présente le détail de la fragmentation des microcystines M<sub>980a,b</sub> et M<sub>994a,b</sub>. L'analyse de la fragmentation permet de constater qu'il s'agit de variants de la famille de la microcystine LR, raison pour laquelle les fragments ont été rassemblés dans une même table. Les trois premières colonnes du tableau listent les masses des fragments des microcystines MC-LR, [Dha<sup>7</sup>]-MC-LR et [Dha<sup>7</sup>]-MC-HilR. Les colonnes suivantes listent l'ensemble des fragments détectés dans les spectres MS/MS des composés M<sub>980a,b</sub> et M<sub>994a,b</sub>, en ESI et MALDI-MS/MS.

L'ion à m/z = 135.08 Da ([Ph-CH<sub>2</sub>-CH=OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), est présent dans les spectres MS/MS des 4 composés (M<sub>980a,b</sub> et M<sub>994a,b</sub>). L'ion de m/z = 157.13 Da ([Ala-Leu + H - C=O]<sup>+</sup>) est indicatif de la présence du groupement Ala en position 1 et de la présence de l'acide aminé Leucine dans les MS/MS de M<sub>980a</sub>, M<sub>980b</sub> et M<sub>994a</sub>. Par contre, le spectre MS/MS de M<sub>994b</sub> ne contient pas les ions de m/z = 157.13 Da mais bien les ions de m/z = 171.1488 Da, attribués au fragment ([Ala-Hil + H - C=O]<sup>+</sup>), Hil étant l'acide aminé homoisoleucine. Les ions de m/z = 213.08 Da ([Glu-MDha + H]<sup>+</sup>) dans le spectre de M<sub>994a</sub> indiquent la présence de l'acide aminé MDha en position 7 tandis que les 3 autres composés possèderaient plutôt l'acide aminé déméthylé en position 7 (Dha). En effet, les M<sub>980a</sub>, M<sub>980b</sub> et M<sub>994b</sub> présentent chacune, dans leur MS<sup>2</sup>, les ions fragments de m/z = 199.07 Da correspondant à [Glu-Dha + H]<sup>+</sup>.

En outre, les ions de m/z = 286.15 Da ([MeAsp-Arg+H]<sup>+</sup>) et 303.18 Da ([MeAsp-Arg-NH<sub>2</sub> + 2H]<sup>+</sup>), combinés à l'absence de pic aux masses de 14 Da inférieures, indiquent la présence de l'acide aminé MeAsp en position 3. Dans le cas de variants déméthylés, l'acide aminé déméthylé n'est donc pas situé en position 3, mais le plus vraisemblablement en position 7 (Dha).

Par ailleurs, l'acide aminé Hil, rarement rencontré, est confirmé par la présence de plusieurs fragments caractéristiques. Ainsi, les ions de  $m/z = 396.22$  Da ( $[\text{Hil-MeAsp-Arg} + \text{H} - \text{NH}_3]^+$ ),  $413.25$  Da ( $[\text{Hil-MeAsp-Arg} + \text{H}]^+$ ),  $484.29$  Da ( $[\text{Ala-Hil-MeAsp-Arg} + \text{H}]^+$ ) et  $501.3144$  Da ( $[\text{Ala-Hil-MeAsp-Arg-NH}_3 + \text{H}]^+$ ) indiquent la présence de l'acide aminé Hil dans le spectre MS<sup>2</sup> de M<sub>994b</sub>. En parallèle, les spectres MS/MS des trois autres composés indiquent la présence de la leucine dans le squelette de la microcystine. En effet, les fragments rapportés ci-dessous pour Hil apparaissent tous, à des masses 14 Da inférieures. Ainsi, les ions de  $m/z = 382.21$  Da ( $[\text{Leu-MeAsp-Arg} + \text{H} - \text{NH}_3]^+$ ),  $399.24$  Da ( $[\text{Leu-MeAsp-Arg} + \text{H}]^+$ ),  $470.27$  Da ( $[\text{Ala-Leu-MeAsp-Arg} + \text{H}]^+$ ) et  $487.27$  Da ( $[\text{Ala-Leu-MeAsp-Arg-NH}_3 + \text{H}]^+$ ) – signifiant la présence de l'acide aminé Leucine, sont identifiés pour les trois MC restantes à savoir M<sub>980a</sub>, M<sub>980b</sub> et M<sub>994a</sub>.

L'analyse du schéma de fragmentation complet de M<sub>980a</sub>, M<sub>980b</sub>, M<sub>994a</sub> et M<sub>994b</sub> (Tableau 4) mène donc aux structures suivantes : [Dha<sup>7</sup>]-MC-LR pour les composés M<sub>980a</sub> et M<sub>980b</sub>, MC-LR pour M<sub>994a</sub> et [Dha<sup>7</sup>]-MC-HilR pour M<sub>994b</sub>.

En conclusion les composés M<sub>980a</sub> et M<sub>980b</sub> présentent la même masse exacte, le même profil de fragmentation mais bien qu'ils aient des temps de rétention différents, résolus, et différant de 0.9 minute (34.1 pour M<sub>980a</sub> et 35.0 pour M<sub>980b</sub>), l'analyse de leur profil de fragmentation conduit, pour les deux composés, à la même structure - [Dha<sup>7</sup>]-MC-LR. A ce stade de l'analyse, nous ne disposons pas d'informations suffisantes pour différencier ces deux composés. De la même façon que nous l'avons fait pour les microcystines M<sub>966</sub>, nous pouvons faire l'hypothèse qu'il s'agit de stéréoisomères, donnant lieu aux mêmes ions fils lors d'une analyse MS<sup>2</sup> mais présentant un comportement physico-chimique légèrement différent lors de la séparation HPLC. Enfin, nous l'évoquons dans le paragraphe d'identification de M<sub>966</sub>, cet échantillon a été analysé en HPLC-IMS-TOF sans toutefois que la mobilité ionique ne puisse, dans les conditions du test, résoudre les stéréoisomères présents dans l'échantillon. Les microcystines M<sub>994a</sub> et M<sub>994b</sub> quant à elles ont pu être identifiées, via leur spectre de fragmentation. L'identification, dans ce cas, mène à deux microcystines apparentées, de même formule brute mais de séquences qui diffèrent au niveau des acides aminés en position 2 (Leu et Hil) et en position 7 (MDha et Dha) dans MC-LR (M<sub>994a</sub>) et [Dha<sup>7</sup>]-MC-HilR pour M<sub>994b</sub>.

Ce résultat est intéressant car le couplage HPLC-ESI permet la résolution de deux microcystines de structures très semblables mais ayant potentiellement des propriétés biologiques et toxicologiques différentes en raison de leurs différences de structure.

Tableau 4 : Identification des pics ESI-HCD-MS<sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS<sup>2</sup> (FT-ICR) des composés M<sub>980a</sub>, M<sub>980b</sub>, M<sub>994a</sub> et M<sub>994b</sub>

Composition de l'ion	MC-LR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-HHR	M <sub>980a</sub> t <sub>R</sub> : 34.12 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>980a</sub> t <sub>R</sub> : 34.30 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>980b</sub> t <sub>R</sub> : 34.99 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>994a</sub> t <sub>R</sub> : 34.07 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>994b</sub> t <sub>R</sub> : 37.12 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>994b</sub> t <sub>R</sub> : 37.05 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR
[Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	135.0804	135.0804	135.0804	135.0806	-	135.0806	135.0806	135.0802	-
[MDha-Ala + H] <sup>+</sup>	155.0815	141.0659(a)	141.0659(a)	141.0659(a)	-	141.0660(a)	155.0800	141.0656(a)	-
[Arg + H] <sup>+</sup>	157.1084	157.1084	157.1084	-	-	-	-	157.1080	157.1300
[Ala-Leu + H - C=O] <sup>+</sup>	157.1335	157.1335	171.1492(b)	157.1333	-	157.1330	157.1332	171.1488(b)	-
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O + H] <sup>+</sup>	163.1117	163.1117	163.1117	163.1117	-	164.1111	163.1100	163.1113	163.1100
[Arg + NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	174.1349	174.1349	174.1349	174.1349	-	174.1349	174.1300	174.1345	174.1300
[Glu-MDha + H] <sup>+</sup>	213.0870	199.0713(a)	199.0713(a)	199.0714(a)	199.07046(a)	199.0715(a)	213.0870	199.0710(a)	-
[Adda + H - CH <sub>3</sub> OH - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	265.1587	265.1587	265.1587	265.1586	265.1577	265.1588	265.1600	265.1580	-
[MDha-Ala-Leu-MeAsp-Arg+2H] <sup>2+</sup>	277.1583	270.1504(a)	277.1583(a,b)	-	-	-	277.1576	-	-
[Adda + H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>	282.1852	282.1852	282.1852	282.1849	-	282.1842	282.1846	282.1846	-
[MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup>	286.1510	286.1510	286.1510	286.1508	286.1499	286.1512	286.1508	286.1501	-
[MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	303.1775	303.1775	303.1775	303.1773	303.1773	303.1773	303.1774	303.1768	-
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-MDha + H] <sup>+</sup>	375.1914	361.1758(a)	361.1758(a)	361.1750(a)	361.1740(a)	361.1755(a)	375.1913	-	361.1740(a)
[Leu-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	382.2085	382.2085	396.2241(b)	382.2063	382.2066	382.2058	382.2082	-	396.2217(b)
[Glu-MDha-Ala-Leu + H] <sup>+</sup>	397.2082	383.1925(a)	397.2082(a,b)	-	383.2098(a)	383.2005(a)	397.2029	-	-
[MDha-Ala-Leu-MeAsp + H] <sup>+</sup>	397.2082	383.1925(a)	397.2082(a,b)	-	-	383.2005(a)	397.2029	-	-
[Leu-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	399.2350	399.2350	413.2507(b)	399.2344	399.2330	399.2353	399.2350	413.2518(b)	413.2482(b)
[Leu-MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	416.2616	416.2616	430.2778(b)	-	-	-	416.2612	430.2761(b)	-
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup>	446.2286	432.2129(a)	432.2129(a)	432.2129(a)	432.2108(a)	432.1270(a)	-	-	432.2105(a)
[Arg-Adda+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	453.2860	453.2860	453.2860	-	453.2835	-	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> +H)+ H] <sup>+</sup>	465.2820	465.2820	465.2820	465.2812	-	465.2988	465.2824	465.2807	-
[Ala-Leu-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	470.2722	470.2722	484.2878(b)	470.2710	-	470.2702	470.2711	484.2865(b)	484.2849(b)
[M + 2 H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>2+</sup>	482.2686	475.2607	482.2686	475.2596	-	475.2702	-	-	-

Composition de l'ion	MC-LR	[Dha $\gamma$ ]-MC-LR	[Dha $\gamma$ ]-MC-HHR	M <sub>980a</sub> tr : 34.12 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>980a</sub> tr : 34.30 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>980b</sub> tr : 34.99 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>994a</sub> tr : 34.07 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>994b</sub> tr : 37.12 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>994b</sub> tr : 37.05 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR
[Ala- <u>Leu</u> -MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	487.2987	487.2987	501.3144 <sup>(b)</sup>	487.2984	487.2277	487.2989	487.2987	501.3148 <sup>(b)</sup>	-
[M + 2 H] <sup>2+</sup>	498.2817	491.2738	498.2817	-	-	-	498.2809	-	-
[MDha-Ala- <u>Leu</u> -MeAsp-Arg +H - CO] <sup>+</sup>	525.3144	511.2987 <sup>(a)</sup>	525.3144 <sup>(a,b)</sup>	511.3007 <sup>(a)</sup>	511.2964 <sup>(a)</sup>	511.3004 <sup>(a)</sup>	525.3147	525.3145 <sup>(a,b)</sup>	525.3104 <sup>(a,b)</sup>
[MDha-Ala- <u>Leu</u> -MeAsp-Arg +H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	536.2827	522.2671 <sup>(a)</sup>	536.2827 <sup>(a,b)</sup>	522.2669 <sup>(a)</sup>	-	522.2659 <sup>(a)</sup>	536.2839	536.2824 <sup>(a,b)</sup>	536.2808 <sup>(a,b)</sup>
[MDha-Ala- <u>Leu</u> -MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	553.3093	539.2936 <sup>(a)</sup>	553.3093 <sup>(a,b)</sup>	539.2934 <sup>(a)</sup>	539.2910 <sup>(a)</sup>	539.2942 <sup>(a)</sup>	553.3094	553.3097 <sup>(a,b)</sup>	553.3067 <sup>(a,b)</sup>
[Arg-Adda-Glu + H - COOH] <sup>+</sup>	554.3575	554.3575	554.3575	-	554.3312	-	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)] <sup>+</sup>	567.3289	567.3289	567.3289	567.3287	-	567.3298	567.3287	567.3280	-
[MDha-Ala- <u>Leu</u> -MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	570.3358	556.3202 <sup>(a)</sup>	570.3358 <sup>(a,b)</sup>	556.3201 <sup>(a)</sup>	556.3170 <sup>(a)</sup>	556.3209 <sup>(a)</sup>	570.3353	570.3349 <sup>(a,b)</sup>	570.3334 <sup>(a,b)</sup>
[Arg-Adda-Glu + H - CO] <sup>+</sup>	571.3602	571.3602	571.3602	-	571.3577	-	-	-	-
[Arg-Adda-Glu + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	582.3286	582.3286	582.3286	-	582.3256	-	-	-	582.3256
[Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup>	599.3552	599.3552	599.3552	-	599.3523	599.3513	599.3548	-	599.3522
[Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-Glu-MDha-Ala + 3H] <sup>+</sup>	620.3640	606.3484 <sup>(a)</sup>	606.3484	606.3379 <sup>(a)</sup>	-	606.3354 <sup>(a)</sup>	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR+H)-Glu-MDha + H] <sup>+</sup>	677.3617	663.3461 <sup>(a)</sup>	663.3461 <sup>(a)</sup>	-	-	663.9316 <sup>(a)</sup>	-	663.3476 <sup>(a)</sup>	-
[Glu-MDha-Ala- <u>Leu</u> -MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	682.3519	668.3362 <sup>(a)</sup>	682.3519 <sup>(a,b)</sup>	668.3345 <sup>(a)</sup>	-	668.3343 <sup>(a)</sup>	682.3502	682.3525 <sup>(a,b)</sup>	-
[Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>+</sup>	682.3923	668.3766 <sup>(a)</sup>	668.3766 <sup>(a)</sup>	668.3345 <sup>(a)</sup>	668.3732 <sup>(a)</sup>	668.3343 <sup>(a)</sup>	-	668.3737 <sup>(a)</sup>	668.3727 <sup>(a)</sup>
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu] <sup>+</sup>	696.3715	696.3715	696.3715	696.3709	-	696.3728	696.3712	696.3698	-
[MeAsp-Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup>	728.3978	728.3978	728.3978	-	728.3941	-	728.3977	-	728.3949
[Ala- <u>Leu</u> -MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH) + H] <sup>+</sup>	751.4501	751.4501	765.4658 <sup>(b)</sup>	-	-	751.4479	751.4528	-	-
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup>	753.4294	739.4137 <sup>(a)</sup>	739.4137 <sup>(a)</sup>	-	739.4089 <sup>(a)</sup>	739.4073 <sup>(a)</sup>	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu-MDha] <sup>+</sup>	779.4087	765.3930 <sup>(a)</sup>	765.3930 <sup>(a)</sup>	765.3914 <sup>(a)</sup>	-	765.3931 <sup>(a)</sup>	779.4052	765.3906 <sup>(a)</sup>	-

Composition de l'ion	MC-LR	[Dha7]-MC-LR	[Dha7]-MC-HIR	M <sub>980a</sub> tr : 34.12 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>980a</sub> tr : 34.30 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>980b</sub> tr : 34.99 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>994a</sub> tr : 34.07 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>994b</sub> tr : 37.12 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>994b</sub> tr : 37.05 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR
[Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu-MDha-Ala-Leu-MeAsp + H] <sup>+</sup>	808.4365	794.4209 <sup>(a)</sup>	808.4365 <sup>(a,b)</sup>	-	-	-	-	808.4329 <sup>(a,b)</sup>	-
[MeAsp-Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>+</sup>	811.4349	797.4192 <sup>(a)</sup>	797.4192 <sup>(a)</sup>	-	-	-	-	797.4116 <sup>(a)</sup>	-
[MDha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-Adda + H - CO] <sup>+</sup>	838.5185	824.5029 <sup>(a)</sup>	838.5185 <sup>(a,b)</sup>	-	824.50063 <sup>(a)</sup>	-	-	-	838.5154 <sup>(a,b)</sup>
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-Leu + H - CO] <sup>+</sup>	838.5185	824.5029 <sup>(a)</sup>	838.5185 <sup>(a,b)</sup>	-	-	-	-	-	838.5154 <sup>(a,b)</sup>
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	844.4563	830.4407	844.4563	830.4472	-	-	-	844.4566	844.4524
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu-MDha-Ala] <sup>+</sup>	850.4458	836.4301 <sup>(a)</sup>	836.4301 <sup>(a)</sup>	836.4296 <sup>(a)</sup>	-	836.4266 <sup>(a)</sup>	-	836.4268 <sup>(a)</sup>	-
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	861.4829	847.4672	861.4829	847.4665	-	847.4673	861.4824	861.4820	861.4716
[M + H - CO] <sup>+</sup>	967.5611	953.5455	967.5611	953.54197	-	-	-	-	967.5575
[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> - [M - OH] <sup>+</sup>	977.5455	963.5298	977.5455	963.5305	-	-	-	-	977.5389

Les acides aminés soulignés sont variables

(a) contient Dha7 au lieu de MDha7

(b) contient Hii2 (Homoisoleucine) au lieu de Leu2

#### 4.4.2.3 Comparaison de profils de fragmentation ESI-HCD-MS/MS et MALDI-CID-MS/MS

Depuis le début de cette thèse, l'instrumentation scientifique disponible a massivement évolué. Deux caractéristiques importantes de la spectrométrie de masse ont été popularisées : le pouvoir de résolution, qui peut à présent dépasser le million, et la précision en masse qui descend en routine en-dessous du ppm. Par ailleurs, des techniques de fragmentation ont été implémentées sur des spectromètres commerciaux, en particulier l'activation par collisions à plus haute énergie. Ces améliorations permettent une identification plus fiable des composants d'un mélange complexe.

En ce qui concerne la première étape de l'identification, à savoir l'obtention d'une formule brute, la précision en masse et la résolution disponibles à présent permettent de réactualiser le concept de masse de Kendrick qui prend comme référence non plus 1/12 de la masse de l'isotope 12 du carbone mais la masse du groupement CH<sub>2</sub> égale à 14. D'autres référentiels sont possibles. Associé à la masse exacte, le défaut de masse de Kendrick permet d'émettre une hypothèse crédible sur la famille de composé à laquelle appartient une formule brute<sup>200</sup>.

Cet exercice est réalisé ci-dessous avec une des molécules d'intérêt, à savoir le composé M<sub>966a</sub> (Figure 18). La masse exacte nous permet d'obtenir une formule brute et une masse de Kendrick. Une recherche rapide en base de données NORINE, développée par l'Université de Lille<sup>200,201</sup>, mène au défaut de masse de Kendrick qui variera avec la nature des atomes ajoutés à partir de cette formule. Une analyse du ratio H/C par rapport au ratio O/C (Représentation de van Krevelen), pourrait nous renseigner sur la famille de la molécule.

Une base de données de spectres MS/MS permettrait de soumettre les fragments à une analyse similaire et obtenir une identification du composé, ce qui n'est cependant pas le but de ce paragraphe

Dans le cadre de cet exercice, l'échantillon environnemental, après extraction et purification, a été analysé par deux techniques complémentaires de spectrométrie de masse, utilisant des énergies d'activation différentes pour estimer le gain en information obtenu grâce à des profils de fragmentation complémentaires.

Nous soulignerons ci-après les différences entre les résultats obtenus lors de l'analyse par ESI-HCD-MS/MS grâce à un spectromètre de type Orbitrap muni d'une cellule de collision à « plus haute » énergie », les ions étant produits par électrospray et par MALDI-CID-MS/MS sur un spectromètre de type FT-ICR-MS, à plus basse énergie de collision. Dans les deux cas, la source d'ionisation est découplée de l'analyseur ce qui permet d'ignorer le mode d'ionisation dans la comparaison, à l'exception de son impact sur la charge

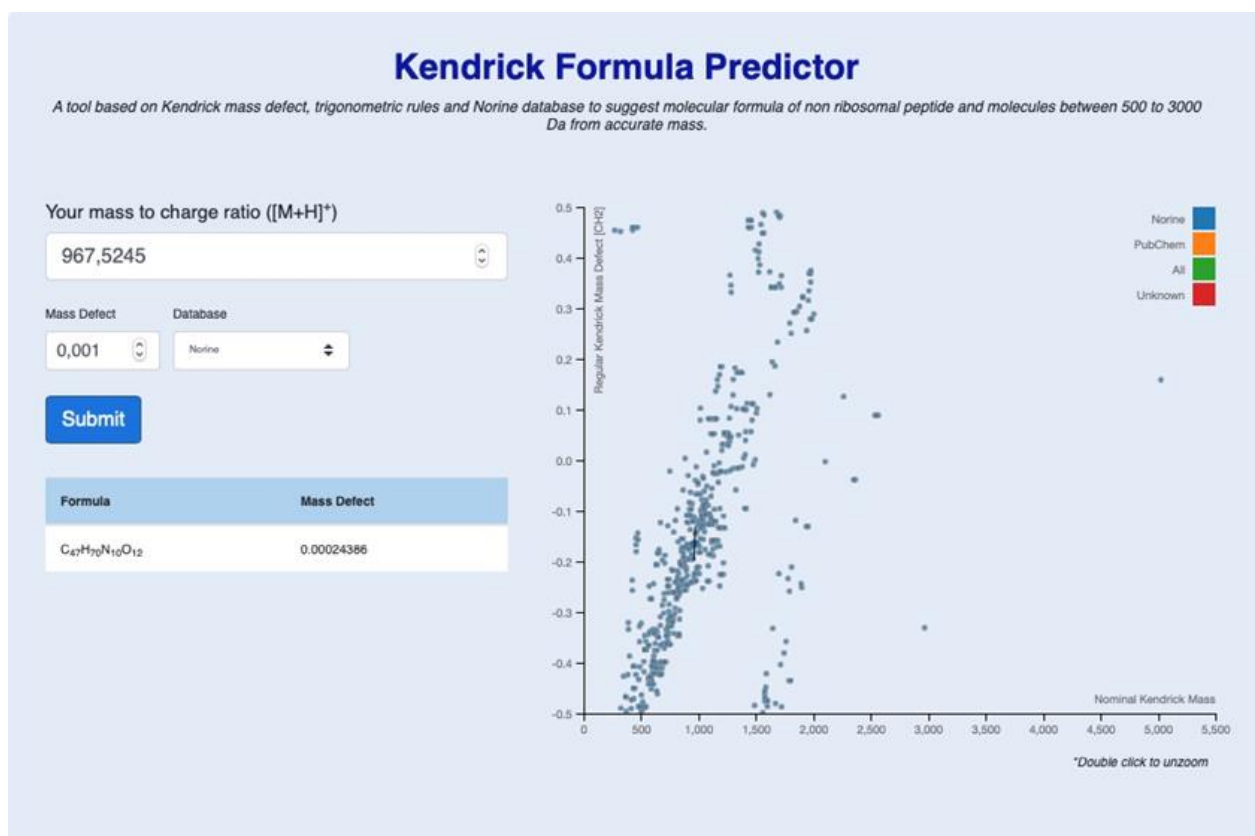


Figure 18 : Calcul du défaut de masse de Kendrick pour le composé  $M_{966a}$  sur base de la masse exacte

Il faut en effet noter que selon la méthode d'ionisation, les ions précurseurs sont respectivement des ions multichargés (ESI) ou des précurseurs monochargés (MALDI). Le nombre de charges des ions est un paramètre important qui augmente l'énergie interne des ions suite à la répulsion entre charges. A la même énergie de collision, la fragmentation sera favorisée par un état de charge plus élevé.

Pour réaliser des spectres MS/MS, les ions précurseurs sont activés et donnent lieu à des réactions de fragmentation. En règle générale, les ions à couche complète produisent des fragments à couche complète, ce qui suppose un réarrangement et/ou la perte d'une molécule neutre. Le réarrangement implique la rupture de deux liaisons. Les règles de fragmentation classiques des ions de nature peptidique sont illustrées en Annexe et rappelées dans la Figure 19.

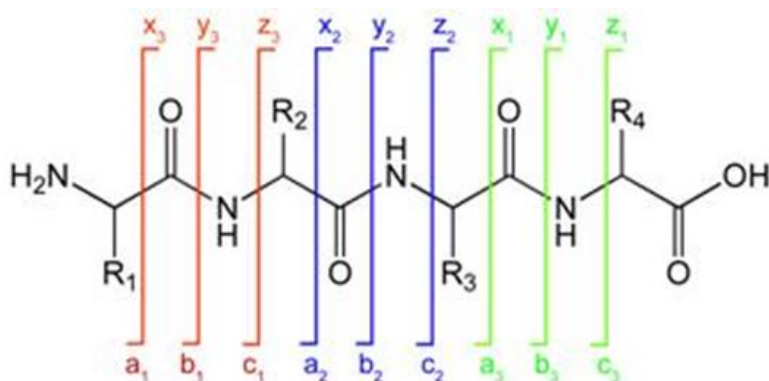


Figure 19 : Nomenclature de Roepstorff et Biemann pour la fragmentation au sein de la chaîne peptidique

Dans le cas de la fragmentation des peptides cycliques la situation est différente. En effet, afin de commencer la fragmentation du squelette peptidique, une première rupture de liaison menant à l'ouverture du cycle peptidique doit avoir lieu. Cette « fragmentation » se produit à masse constante et peut avoir comme position un des sites protonés. Il en résulte une complication des spectres, chaque ouverture donnant lieu à une série de pics. Un exemple théorique est détaillé dans le paragraphe suivant.

Une base de données de spectres MS/MS permettrait de soumettre les données et obtenir une identification du composé, ce qui n'est cependant pas le but de ce paragraphe.

La présence d'un site d'ouverture préférentiel restreindrait la diversité des fragments et constitue un élément d'information intéressant. Ainsi, si une liaison est rompue préférentiellement (peptidique ou pas) pour l'ouverture du cycle, elle doit être à l'origine des fragments de fragments majeurs. Pour chacune des techniques, l'intensité relative des ions fragments est rapportée (Tableau 5). A noter que, dans le cas de l'analyse MALDI, le pic parent était très majoritaire, complexifiant la comparaison en termes d'intensité relative avec la fragmentation HCD. L'intensité relative a, dès lors, été recalculée sur base de l'intensité du pic de l'ion fragment le plus intense. Dans le cas de l'ion qui nous intéresse, il n'y a pas d'ouverture unique.

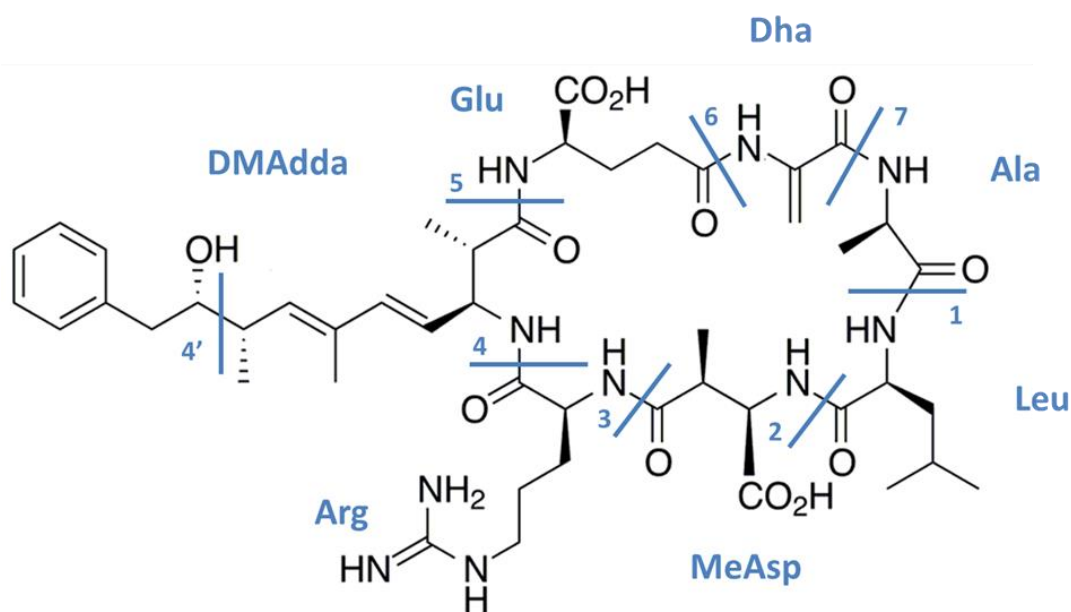


Figure 20 : Microcystine [DMAdda<sup>5</sup>-Dha<sup>7</sup>]-MC-LR et nomenclature de rupture des liaisons

Dans la comparaison présentée, la structure de la molécule est connue et une ouverture de cycle entre DMAdda et Glu (liaison 5 sur la Figure 20) donnerait la séquence suivante, du N-terminal au C-terminal : Glu-Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-DMAdda. Une ouverture entre l'arginine et la MeAsp donnerait la séquence Arg-DMAdda-Glu-Dha-Ala-Leu-MeAsp.

Des séquences translátées d'un résidu correspondent aux ouvertures selon 7, 1, 2, 3, 4 seraient à l'origine de fragments de masses différentes (Figure 20).

Les fragments obtenus par les deux méthodes sont comparés dans la Figure 21 qui présente les spectres MS/MS obtenus en ESI-HCD et MALDI-CID.

Tableau 5 : Comparatif des profils et intensités de fragmentation obtenues lors de l'analyse MS/MS de  $M_{966a}$  en ESI-HCD-MS<sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS<sup>2</sup> (FT-ICR)

Composition de l'ion	Liaison rompue	$M_{966a}$ ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	Intensité relative ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	$M_{966a}$ MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	Intensité relative MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR
[Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OH] <sup>+</sup>	4'	121.0650	86.32	-	-
[Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	1-7	141.0660	17.65	-	-
[Ala-Leu + H - C=O] <sup>+</sup>	2-7	157.1337	100	-	-
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O + H] <sup>+</sup>	4'	163.1119	68.11	-	-
[Arg + NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	3-4	174.1351	84.31	-	-
[Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	5-7	199.0715	44.96	-	-
[DMAdda + H - H <sub>2</sub> O - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	4-5	265.1588	31.18	-	-
[Dha-Ala-Leu + H] <sup>+</sup>	2-6	254.1500	4.64	-	-
[Glu-Dha-Ala+H] <sup>+</sup>	1-5	270.1085	2.58	-	-
[MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup>	2-4	286.1511	25.3	286.1505	1.8 (0.4)
[MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	2-4	303.1777	55.27	303.1748	2.2 (0.4)
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	4-4'-7	361.1762	10.55	361.1733	4.1 (0.8)
[Leu-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	1-4	-	-	382.2057	3.8 (0.8)
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	1-4-4'	432.2131	0.74	432.2095	6.3 (1.3)
[MeAsp-Arg-DMAdda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OH+H)+ H] <sup>+</sup>	2-4'-5	465.2824	20.59	-	-
[Ala-Leu-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	4-7	470.2721	8.31	470.2684	3.3 (0.7)
[Arg-DMAdda + H] <sup>+</sup>	3-5	-	-	456.2930(c)	4.3 (0.9)
[Ala-Leu-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	4-7	487.2991	31.85	487.2258	1.9 (0.4)
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg +H - CO] <sup>+</sup>	4-6	-	-	511.2943	3.2 (0.7)
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg +H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	4-6	522.2674	4.88	-	-
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	4-6	539.2941	20.24	539.2890	37.4 (7.7)

Composition de l'ion	Liaison rompue	M <sub>966a</sub> ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	Intensité relative ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>966a</sub> MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	Intensité relative MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR
[MeAsp-Arg-DMAdda(-H <sub>2</sub> O+H)] <sup>+</sup>	2-5	567.3294	8.35	-	-
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	4-6	556.3206	48.57	556.3150	18.9 (3.9)
[Arg-DMAdda-Glu + H - CO] <sup>+</sup>	3-6	-	-	557.3398	16.7 (3.4)
[Arg-DMAdda-Glu+H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	3-6	-	-	568.3079	6.3 (1.3)
[MeAsp-Arg-DMAdda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OH+H)-Glu + H] <sup>+</sup>	2-DMAdda-6	594.3252	21.68	-	-
[Arg-DMAdda-Glu + H] <sup>+</sup>	3-6	585.3400	4.22	585.3342	100 (20.5)
[MeAsp-Arg-DMAdda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OH+H)-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	2-Intra-7	663.3464	38.56	-	-
[Glu-Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	4-5	668.3356	2.40	668.3703	7.7 (1.6)
[Arg-DMAdda-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	3-7	654.3620	4.08	-	-
[MeAsp-Arg-DMAdda(-H <sub>2</sub> O+H)-Glu] <sup>+</sup>	2-DMAdda-6	696.3718	6.73	696.3647	15.6 (3.2)
[MeAsp-Arg-DMAdda-Glu + H] <sup>+</sup>	2-6	714.3816	5.9	714.3750	9.7 (2)
[Ala-Leu-MeAsp-Arg-DMAdda(-H <sub>2</sub> O) + H] <sup>+</sup>	DMAdda-5-7	-	-	-	-
[MeAsp-Arg-DMAdda(-H <sub>2</sub> O+H)-Glu-Dha] <sup>+</sup>	2-DMAdda-7	765.3932	11.44	-	-
[MeAsp-Arg-DMAdda-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	2-7	783.4035	13.73	-	-
[MeAsp-Arg-DMAdda(-H <sub>2</sub> O +H)-Glu-Dha-Ala] <sup>+</sup>	1-2	-	-	-	-
[Dha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-DMAdda + H - CO] <sup>+</sup>	5-6	-	-	810.4813	3.6 (0.7)
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OH] <sup>+</sup>	M-DMAdda frag	847.4667	15.37	847.4576	10.3 (2.1)
[M + H - CO] <sup>+</sup>	M-CO	-	-	939.5191	23.2 (4.8)
[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	M-H <sub>2</sub> O	-	-	949.5028	25.32 (5.2)
		[DMAdda <sup>5</sup> , Dha7]-MC-LR		[DMAdda <sup>5</sup> , Dha7]-MC-LR	

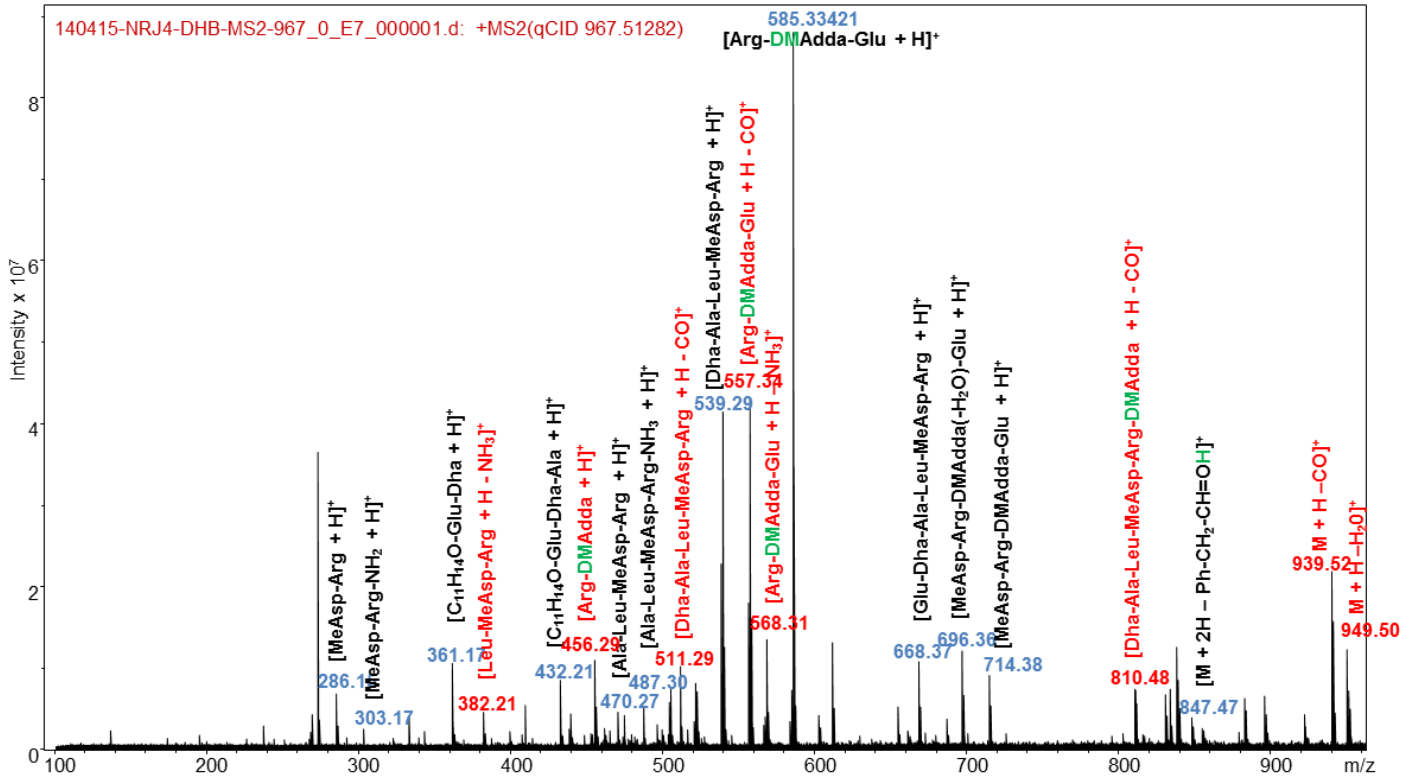
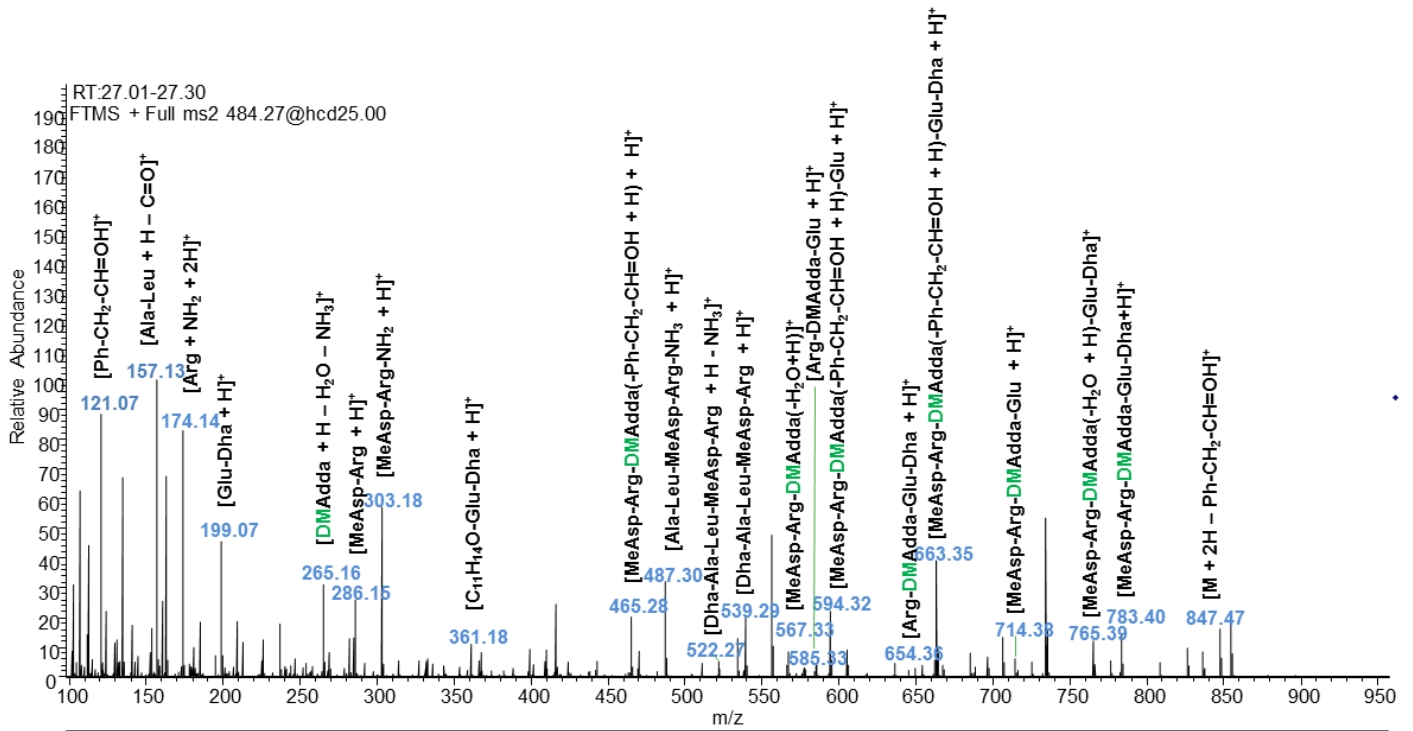
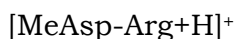
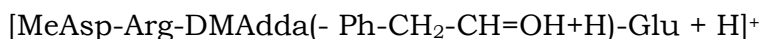
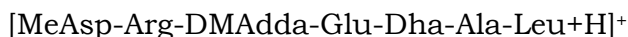
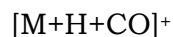


Figure 21 : Spectres de fragmentation de *M*<sub>966a</sub> obtenus en ESI-HCD-MS<sup>2</sup> (haut) et MALDI-CID-MS<sup>2</sup> (bas)

Reprenons par exemple les ions, résumés dans le Tableau 6:



Ils correspondent à une ouverture de cycle en 2 avec perte de Leu-CO pour donner des ions de type a, puis successivement, en 1, en 7, en 6, en 5, etc. Le groupement DMAdda peut perdre une molécule d'eau sans qu'il soit possible de déterminer si la perte a lieu avant ou après l'ouverture du cycle.

D'autres séries sont également observées. Les deux types de spectres sont utiles et une analyse de la fragmentation en fonction de l'énergie de collision constituerait un apport mécanistique intéressant.

Tableau 6 : Fragments successifs après ouverture du cycle de [DMAdda<sup>5</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-LR au niveau de la liaison 2 (Leu-MeAsp)

Composition de l'ion	Liaison rompue	M <sub>966a</sub> ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	Intensité relative ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>966a</sub> MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	Intensité relative MALDI-MS <sup>2</sup> FT ICR
[MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup>	2-4	286.1511	25.3	286.1505	1.8 (0.4)
[MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	2-4	303.1777	55.27	303.1748	2.2 (0.4)
[MeAsp-Arg-DMAdda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OH+H)+ H] <sup>+</sup>	2-4'-5	465.2824	20.59	-	-
[MeAsp-Arg-DMAdda(-H <sub>2</sub> O+H)] <sup>+</sup>	2-5	567.3294	8.35	-	-
[MeAsp-Arg-DMAdda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OH+H)-Glu + H] <sup>+</sup>	2-DMAdda-6	594.3252	21.68	-	-
[MeAsp-Arg-DMAdda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OH+H)-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	2-Intra-7	663.3464	38.56	-	-
[MeAsp-Arg-DMAdda(-H <sub>2</sub> O+H)-Glu] <sup>+</sup>	2-DMAdda-6	696.3718	6.73	696.3647	15.6 (3.2)
[MeAsp-Arg-DMAdda-Glu + H] <sup>+</sup>	2-6	714.3816(c)	5.9	714.3750(c)	9.7 (2)
[MeAsp-Arg-DMAdda(-H <sub>2</sub> O+H)-Glu-Dha] <sup>+</sup>	2-DMAdda-7	765.3932	11.44	-	-
[MeAsp-Arg-DMAdda-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	2-7	783.4035	13.73	-	-
[M + H - CO] <sup>+</sup>	M-CO	-	-	939.5191	23.2 (4.8)

Comme attendu, l'augmentation de l'énergie de collision modifie l'intensité des fragments vers des voies de fragmentation les plus énergétiques. À ce niveau d'information, il n'est pas possible d'exclure des réactions de fragmentations multiples après l'ouverture du cycle. Une étude mécanistique de la fragmentation bénéficierait

d'une analyse plus détaillée de la nature et de l'origine des fragments. Pour des fins analytiques, deux énergies de collision comme dans le cas présent, permettent une identification fiable. L'existence de logiciels d'analyse de spectres couplée au recours à l'analyse de Kendrick de la masse des fragments permettrait d'automatiser cette dernière.

#### **4.4.3 Identification des microcystines MC-RR et apparentées**

La démarche suivie pour l'identification de l'ensemble des microcystines de l'échantillon environnemental est rigoureusement identique à la description exhaustive faite pour la famille des MC-LR. En effet, après avoir mis en évidence la présence d'un composé spécifique dans le chromatogramme TIC, la reconstruction du chromatogramme sur base du courant ionique du composé susmentionné permet de déterminer la plage de temps de rétention au sein de laquelle les microcystines de même  $m/z$  sont éluées.

La formule moléculaire des microcystines est ensuite déterminée sur base de la masse exacte obtenue dans le spectre ESI-MS (Orbitrap) et sur base des critères suivants : C45-60, H60-90, N6-15 et O10-16, à moins de 5 ppm près. Ces critères sont basés sur la composition élémentaire de l'ensemble des microcystines décrites dans la littérature à ce jour<sup>195</sup>, ainsi que par confrontation avec la base de données interne de microcystines, développée dans le cadre de ce travail.

##### *4.4.3.1 Identification $M_{1009}$ et $M_{1023}$*

Grâce à cette base de données de fragments de microcystines, l'analyse séquentielle du chromatogramme de l'échantillon environnemental a été poursuivie, menant à l'hypothèse de la présence de dérivés de la microcystine RR. Après reconstitution du chromatogramme, sur base du courant des ions suivis, 7 traces chromatographiques distinctes, correspondant à 7 microcystines dérivées de la MC-RR ont été mises en évidence, à savoir les microcystines  $M_{1009a,b,c,d,e}$  et  $M_{1023a-b}$ . En ESI-Orbitrap, les ions majoritaires étaient les ions dichargés  $[M+2H]^{2+} = 505.77$  et  $512.78$ .

Il est à noter que les ions de  $m/z = 512.78$  Da, dont l'identification sera détaillée dans la suite de ce paragraphe, ont été détectés avec une intensité nettement majoritaire par rapport aux autres composés. A ce titre, il a fait l'objet des premières recherches tant aux prémices de cette analyse, son signal cachait le signal de toutes les autres toxines. Ce n'est qu'après une analyse détaillée, fine et fouillée que d'autres microcystines minoritaires ont pu être mises en évidence.

Les spectres MS/MS de chacun des 7 composés, obtenus par fragmentation au sein de l'Orbitrap ont permis l'élaboration d'hypothèses quant à l'identification de ces composés. Par ailleurs, les spectres MS/MS obtenus en LC-MALDI pour le composé  $M_{1023}$  ont apporté un critère d'identification complémentaire.

Pour la caractérisation des ions de  $m/z = 505.77$  Da, une revue de la littérature couplée au calcul de fragments (voir base de données de fragmentation complète en annexe) des microcystines de l'échantillon permet de proposer, a priori, 5 microcystines isomères dérivées de la microcystine RR, à savoir : [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-RR, [D-Asp<sup>3</sup>, DMAdda<sup>5</sup>]-MC-RR, [DMAdda<sup>5</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-RR, [Gly<sup>1</sup>, D-Asp<sup>3</sup>]-MC-RR et [Gly<sup>1</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-

RR. Globalement, les ions précurseurs de  $m/z = 505.77460$  Da  $[M+2H]^{2+}$  ou  $1010.54049$  Da  $[M+H]^+$  correspondent à la formule moléculaire  $C_{47}H_{71}N_{13}O_{12}$ . Il s'agit à priori de variants de la microcystine RR, doublement déméthylés et dont la position peut être déterminée sur base de l'analyse des fragments MS/MS de chaque microcystine.

Les ions de  $m/z = 512.78$  Da quant à eux, présentent une formule brute calculée de  $C_{48}H_{73}N_{13}O_{12}$ . Sur base des microcystines rapportées dans la littérature et d'hypothèses de travail, la microcystine pourrait correspondre à plus de huit structures de microcystines, toutes isomères, dérivées déméthylées de la MC-RR ou de la MC-HarR (Har correspondant à une microcystine RR au sein de laquelle l'arginine R est remplacée par l'homoarginine en position 2 du cycle heptapeptidique). Globalement, la caractérisation des fragments devra permettre de clarifier la position de la déméthylation ainsi que l'identité de l'acide aminé en position 2 (Arginine ou Homoarginine).

Le Tableau 7 présente le détail de la fragmentation des microcystines  $M_{1009a-e}$ , et  $M_{1023a,b}$ . L'analyse de la fragmentation permet de constater qu'il s'agit de variants de la famille de la microcystine RR, raison pour laquelle les fragments ont été rassemblés dans une même table.

En effet, la présence, notamment, des ions  $[Arg-MeAsp-Arg + H - NH_3]^+$  pour  $M_{1023b}$ , des ions  $[Dha-Ala-Arg-MeAsp-Arg + H (- NH_3)]^+$  et  $[Glu-Dha-Ala-Arg-MeAsp-Arg + H]^+$  dans les spectres MS/MS de  $M_{1009a-e}$  et  $M_{1023a-b}$  indiquent la présence de l'acide aminé Arg en position 2 et 4, ce qui correspond au squelette de la microcystine RR.

Ainsi que détaillé dans ce Tableau 7, en dépit de la richesse du profil de fragmentation obtenu, l'identification de l'ensemble de microcystines n'a pu être réalisée. En effet, dans le cas des microcystines  $M_{1009c}$  et  $M_{1009d}$ , la présence de fragments contradictoires n'a pas permis d'identifier formellement le composé. L'information la plus détaillée que nous avons pu dégager de l'analyse est que  $M_{1009c}$  et  $M_{1009d}$  correspondent à une microcystine RR doublement déméthylée sans certitude quant à la position des sites déméthylés. En effet, les fragments de  $m/z = 141.07$  Da ( $[Dha-Ala + H]^+$ ),  $297.17$  Da ( $[Dha-Ala-Arg + H]^+$ ) et  $426.21$  Da ( $[Glu-Dha-Ala-Arg + H]^+$  ou  $[Dha-Ala-Arg-MeAsp + H]^+$ ) indiqueraient la présence du groupement Dha (déméthylation de MDha en position 7). Par ailleurs, la présence des ions de  $m/z = 135.08$  Da, correspondant au traceur  $[Ph-CH_2-CH=OCH_3]^+$  indique la présence, dans le cycle, de l'acide aminé Adda intact. D'autre part, les ions fragments de  $m/z = 711.35$  Da correspondraient à la structure  $[Glu-Dha-Ala-Arg-MeAsp-Arg + H]^+$  ou  $[Glu-MDha-Ala-Arg-Asp-Arg + H]^+$ , l'acide aminé déméthylé pouvant être MDha ou MeAsp. Par ailleurs, le profil de fragmentation de  $M_{1009c}$  et  $M_{1009d}$  n'est pas identique à celui de  $M_{1009a}$  et  $M_{1009b}$  (MC-RR déméthylée sur les acides aminés Adda et Dha), ni identique à celui de  $M_{1009e}$  (identifiée comme  $[Asp^3, Dha^7]$ -MC-RR). Ces microcystines ont par contre la même formule brute et la même masse exacte.

Il s'agit peut-être d'un mélange de deux ou plusieurs microcystines mais en résumé, les outils disponibles n'ont permis de trancher pour l'identification de  $M_{1009c}$  et  $M_{1009d}$ .

Cinq autres microcystines ont par contre pu être formellement identifiées, sur base d'un profil de fragmentation parfaitement cohérent. Ainsi, les microcystines  $M_{1009a}$  et  $b$  correspondent à  $[DMAdda^5, Dha^7]$ -MC-RR tandis que  $M_{1009e}$  correspond à  $[Asp^3, Dha^7]$ -MC-RR. Enfin,  $M_{1023a}$  et  $M_{1023b}$  correspondent à la structure de  $[Dha^7]$ -MC-RR.

Nous retrouvons une nouvelle fois, pour une même microcystine, deux ou plusieurs pics chromatographiques. Nous n'expliquons cette différence de temps de rétention que par l'hypothèse (non encore rapportée) de légères modifications de type stéréoisomérisation. Ainsi, une possibilité pourrait être que les acides aminés présentant une activité optique (D et L) soient présents en proportions variables au sein des microcystines. Ceci conduirait à des fragments de masses identiques mais pourrait expliquer de légères différences de temps de rétention. Une solution pour vérifier l'hypothèse serait d'effectuer une analyse d'acides aminés de l'échantillon. Ceci pourrait être réalisé ultérieurement et utilisé en complément de la méthode afin d'obtenir une identification parfaitement complète. Enfin, l'analyse de cet échantillon en HPLC-IMS-TOF n'a pas permis, dans les conditions du test, de résoudre les stéréoisomères présents dans l'échantillon.

Tableau 7 : Identification des pics ESI-HCD-MS<sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS<sup>2</sup> (FT-ICR) des composés M<sub>1009a-e</sub>, M<sub>1023a</sub> et M<sub>1023b</sub>

Composition de l'ion	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-RR	[Dha <sup>7</sup> -MC-RR	M <sub>1009a</sub> tr : 21.44 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1009b</sub> tr : 22.23 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1009c</sub> tr : 23.82 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1009d</sub> tr : 24.28 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1009e</sub> tr : 24.44 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1023a</sub> tr : 24.86 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1023a</sub> tr : 24.66 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>1023b</sub> tr : 25.88 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap
[Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	121.0648 <sup>(a)</sup>	135.0804	135.0804	121.0646 <sup>(a)</sup>	121.0647 <sup>(a)</sup>	135.0800	135.0800	135.0801	135.0809	-	135.0807
[Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	141.0659	141.0659	141.0659	141.0655	141.0653	141.0658	141.0654	141.0654	141.0663	-	141.0660
[Arg + H] <sup>+</sup>	157.1084	157.1084	157.1084	157.1088	157.1079	157.1079	157.1081	157.1080	157.1089	-	157.1086
[Ala-Arg + H - C=O] <sup>+</sup>	200.1506	200.1506	200.1506	-	-	-	-	-	200.1148	-	200.1145
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O + H] <sup>+</sup>	163.1117	163.1117	163.1117	163.1112	163.1111	-	-	163.1112	163.1122	-	163.1119
[Arg + NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	174.1349	174.1349	174.1349	174.1354	174.1347	174.1341	174.1346	174.1344	174.1354	-	174.1352
[Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	199.0713	199.0713	199.0713	199.0709	-	-	199.0712	-	199.0720	-	199.0716
[Adda + H - CH <sub>3</sub> OH - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	265.1587 <sup>(a)</sup>	265.1587	265.1587	265.1581 <sup>(a)</sup>	265.1580 <sup>(a)</sup>	-	-	265.1579	265.1582	-	265.1578
[Dha-Ala-Arg + H] <sup>+</sup>	297.1670	297.1670	297.1670	297.1659	297.1657	297.1664	297.1660	297.1660	297.1677	-	297.1673
[Adda + H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>	282.1852 <sup>(a)</sup>	282.1852	282.1852	282.1847 <sup>(a)</sup>	282.1837 <sup>(a)</sup>	-	-	282.1839	282.1848	-	282.1845
[MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup>	286.1510	272.1353	286.1510	286.1502	-	-	-	-	286.1499	-	286.1502
[Arg-Adda-Glu+2H] <sup>2+</sup>	293.1734 <sup>(a)</sup>	300.1812	300.1812	-	-	-	-	-	300.1731	-	300.1725
[MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	303.1775	289.1619 <sup>(b)</sup>	303.1775	303.1786	303.1760	303.1761	303.1769	289.1618 <sup>(b)</sup>	303.1770	-	303.1766
[Arg-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	425.2255	411.2099 <sup>(b)</sup>	425.2255	-	-	-	-	-	-	-	425.2245
[Glu-Dha-Ala-Arg + H] <sup>+</sup>	426.2096	426.2096	426.2096	426.2081	426.2079	426.2078	426.2081	426.2099	426.2078	426.2081 <sup>(*)</sup>	426.2088
[Dha-Ala-Arg-MeAsp + H] <sup>+</sup>	426.2096	412.1939 <sup>(b)</sup>	426.2096	426.2081	426.2079	426.2078	426.2081	412.1942 <sup>(b)</sup>	426.2078	426.2081 <sup>(*)</sup>	426.2088
[Ala-Arg-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	513.2892	499.2736 <sup>(b)</sup>	513.2892	513.2882	-	-	-	499.2729 <sup>(b)</sup>	-	-	-
[M + 2 H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>2+</sup>	496.7693	489.7614 <sup>(b)</sup>	496.7693	-	-	-	-	-	496.7687	-	496.7685
[M + 2 H - CO] <sup>2+</sup>	491.7771	491.7771 <sup>(b)</sup>	498.7849	491.7781	491.7756	491.7754	491.7758	491.7784 <sup>(b)</sup>	498.7841	-	498.7838
[M + 2 H] <sup>2+</sup>	505.7745	505.7745 <sup>(b)</sup>	512.7824	505.7753	505.7753	505.7753	505.7753	505.7754 <sup>(b)</sup>	512.7837	-	512.7830
[Dha-Ala-Arg-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	565.2841	551.2685 <sup>(b)</sup>	565.2841	565.2808	565.2831	565.2821	565.2832	551.2693 <sup>(b)</sup>	565.2831	-	565.2802

Composition de l'ion	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC- RR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC- RR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC- RR	M <sub>1009a</sub> tr : 21.44 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1009b</sub> tr : 22.23 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1009c</sub> tr : 23.82 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1009d</sub> tr : 24.28 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1009e</sub> tr : 24.44 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1023a</sub> tr : 24.86 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1023a</sub> tr : 24.66 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>1023b</sub> tr : 25.88 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	
[Dha-Ala-Arg-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	582.3107	568.2950 <sup>(b)</sup>	582.3107	582.3085	582.3077	582.3083	582.3111	568.2920 <sup>(b)</sup>	582.3085	582.3263	582.3092	
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)] <sup>+</sup>	567.3289 <sup>(a)</sup>	553.3133 <sup>(b)</sup>	567.3289	-	-	-	-	-	-	567.3262	-	
[Dha-Ala-Arg-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	599.3372	585.3216 <sup>(b)</sup>	599.3372	599.3343	-	599.3367	599.3327	585.3197 <sup>(b)</sup>	-	599.3527	-	
[Arg-Adda-Glu + H - CO] <sup>+</sup>	557.3446 <sup>(a)</sup>	571.3602	571.3602	-	-	-	-	571.3636	571.3613	571.3579	571.3583	
[Adda-Glu-Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	569.2970 <sup>(a)</sup>	583.3126	583.3126	-	-	-	-	-	583.3114	583.3303	583.3138	
[Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup>	585.3395 <sup>(a)</sup>	599.3552	599.3552	585.3380	-	-	-	599.3535	599.3568	599.3527	599.3568	
[Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> )-Glu-Dha-Ala + 3H] <sup>+</sup>	606.3484 <sup>(a)</sup>	606.3484	606.3484	-	-	-	-	-	606.3233	-	606.3236	
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> +H)-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	663.3461 <sup>(a)</sup>	663.3461 <sup>(b)</sup>	677.3617	-	-	-	-	-	-	677.2966	-	
[Glu-Dha-Ala-Arg-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	711.3533	697.3376 <sup>(b)</sup>	711.3533	711.3513	711.3516	711.3486	711.3520	697.3377 <sup>(b)</sup>	711.3522	-	711.3500	
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Dha-Ala-Arg-MeAsp + H] <sup>+</sup>	717.3566	703.3410 <sup>(b)</sup>	717.3566	-	-	-	-	703.3378 <sup>(b)</sup>	717.3536	-	717.3548	
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu] <sup>+</sup>	696.3715 <sup>(a)</sup>	682.3559 <sup>(b)</sup>	696.3715	696.3708 <sup>(a)</sup>	-	-	-	-	-	-	696.3676	
[MeAsp-Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup>	714.3821 <sup>(a)</sup>	714.3821 <sup>(b)</sup>	728.3978	714.3793 <sup>(a)</sup>	-	714.3774 <sup>(a)</sup>	-	-	-	728.3938	728.3981	
[Arg-Adda-Glu-Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	725.3981 <sup>(a)</sup>	739.4137	739.4137	-	-	-	-	-	-	739.4103	-	
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu-Dha] <sup>+</sup>	765.3930 <sup>(a)</sup>	751.3774 <sup>(b)</sup>	765.3930	-	-	-	-	-	-	-	765.3892	
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> - (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CNH] <sup>+</sup>	831.4359 <sup>(a)</sup>	817.4203 <sup>(b)</sup>	831.4359	831.4293 <sup>(a)</sup>	-	817.4186	817.4186	817.4188 <sup>(b)</sup>	831.4312	-	831.4370	
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	873.4577 <sup>(a)</sup>	859.4421 <sup>(b)</sup>	873.4577	873.4554 <sup>(a)</sup>	873.4520 <sup>(a)</sup>	859.4407	859.4404	859.4402 <sup>(b)</sup>	873.4564	-	873.4547	
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	890.4843 <sup>(a)</sup>	876.4686 <sup>(b)</sup>	890.4843	-	-	876.4520	876.4654	876.4669 <sup>(b)</sup>	890.4857	-	890.4850	
[Dha-Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup>	881.4992 <sup>(a)</sup>	881.4992 <sup>(b)</sup>	895.5148	-	-	-	-	-	-	895.5068	-	
Les acides aminés soulignés sont variables												
(a) contient DMAAdda <sup>5</sup> au lieu de Adda <sup>5</sup> (H au lieu de CH <sub>3</sub> )				[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC- RR		DmDm-MC- RR		[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC- RR		[Dha <sup>7</sup> ]-MC- RR		[Dha <sup>7</sup> ]-MC- RR
(b) contient Asp <sup>3</sup> au lieu de MeAsp <sup>3</sup>												
(*) Réduction par 1,5-DAN en MALDI												

#### 4.4.3.2 Caractérisation de $M_{1037}$ , $M_{1039}$ et $M_{1041}$

L'analyse détaillée du chromatogramme de l'échantillon environnemental NRJ4 (Figure 7) a révélé la présence de microcystines (présence des ions diagnostiques de  $m/z = 135.08$  Da ( $[\text{Ph-CH}_2\text{-CH=OR}]^+$  dans le spectre MS/MS) de  $m/z = 1037.52$  Da,  $1037.56$  Da,  $1039.55$  Da et  $1041.56$  Da.

En suivant la même stratégie analytique que celle décrite plus tôt, les chromatogrammes ont été reconstruits, menant, pour ces 4 masses, à 12 traces chromatographiques desquelles chaque spectre MS/MS a été analysé. Cependant, à la différence des composés discutés jusqu'alors, aucune identification n'a pu, dans ce cas précis être effectuée sur base de l'analyse des spectres de fragmentation.

En effet, les spectres de fragmentation étaient, en comparaison avec les autres microcystines identifiées, peu abondants et n'ont pas permis l'identification formelle sur base de plusieurs fragments cohérents

D'autre part, de nombreuses hypothèses ont été élaborées, allant de l'oxydation de microcystines permettant d'expliquer leurs spectres de fragmentation, à leur simple ou double hydroxylation. Ce phénomène d'oxydation a été décrit dans quelques publications mais les conditions particulières de réalisations des expériences, au même titre qu'une couverture de séquence lacunaire des composés inconnus, n'a pas permis de trancher et d'identifier formellement les microcystines<sup>202-208</sup>.

Enfin, bien que la masse exacte corresponde, dans le cas de trois masses, à des microcystines connues ou d'occurrence probable, le spectre MS/MS d'aucune des microcystines inconnues n'a permis de vérifier les hypothèses. L'hétérogénéité de l'échantillon a sans doute constitué un frein à une sélection efficace des ions parents. En effet, les spectres MS étaient très denses sur la gamme de  $m/z$  comprise entre 480 et 530 Da (plusieurs ions différents par unité de masse) de telle sorte que la sélection précise d'un parent a été, malgré la séparation chromatographique préalable, très compliquée.

La méthode a cependant permis d'obtenir de nombreuses informations clés quant à 12 microcystines. En effet, outre le fait établi qu'il s'agisse de dérivés de la microcystine, l'analyse au sein de l'Orbitrap a permis de déterminer la masse exacte des microcystines ainsi que leur formule brute. Ainsi,  $M_{1037\text{a-c}}$  (1) correspond à une formule brute de  $\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{N}_{13}\text{O}_{13}$ ,  $M_{1037\text{d-e}}$  (2) à  $\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$ ,  $M_{1039\text{a-d}}$  à  $\text{C}_{48}\text{H}_{73}\text{N}_{13}\text{O}_{13}$  et  $M_{1041\text{a-d}}$  à  $\text{C}_{48}\text{H}_{75}\text{N}_{13}\text{O}_{13}$ . Enfin, ainsi qu'illustré dans le Tableau 8, chacune des 12 microcystines présente, dans son spectre de fragmentation, plusieurs ions fragments indiquant la présence de deux arginines, aux positions 2 et 4, dans leur structure. Il s'agit donc de dérivés de la microcystine RR, non encore décrites ni identifiées à ce jour.

Tableau 8 : Fragments menant à l'hypothèse de structures dérivées de la MC-RR

Fragment	M <sub>1037a</sub> (1) t <sub>R</sub> : 22.41 min	M <sub>1037b</sub> (1) t <sub>R</sub> : 22.61 min	M <sub>1037c</sub> (1) t <sub>R</sub> : 24.70 min	M <sub>1037d</sub> (2) t <sub>R</sub> : 25.24 min	M <sub>1037e</sub> (2) t <sub>R</sub> : 25.75 min	M <sub>1039a</sub> t <sub>R</sub> : 20.47 min	M <sub>1039b</sub> t <sub>R</sub> : 21.15 min	M <sub>1039c</sub> t <sub>R</sub> : 21.99 min	M <sub>1039d</sub> t <sub>R</sub> : 24.70 min	M <sub>1041a</sub> t <sub>R</sub> : 21.44 min	M <sub>1041b</sub> t <sub>R</sub> : 22.80 min	M <sub>1041c</sub> t <sub>R</sub> : 24.53 min
[MDha-Ala- <b>Arg</b> -MeAsp- <b>Arg</b> + 2H] <sup>2+</sup>	291.17	291.17	291.17	298.18	298.17		291.17	291.17	291.17	291.17	291.17	291.17
[Dha-Ala- <b>Arg</b> -MeAsp- <b>Arg</b> + 2H] <sup>2+</sup>												
[Ala- <b>Arg</b> -MeAsp- <b>Arg</b> + H] <sup>+</sup>				513.29	513.28							
[Dha-Ala- <b>Arg</b> -MeAsp- <b>Arg</b> + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ou [MDha-Ala- <b>Arg</b> -Asp- <b>Arg</b> + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>						565.28	565.29					
[MDha-Ala- <b>Arg</b> -MeAsp- <b>Arg</b> + H] <sup>+</sup>				596.33	596.33							
[Dha-Ala- <b>Arg</b> -MeAsp- <b>Arg</b> + H] <sup>+</sup>	582.31	582.31	582.31			582.31	582.31		582.31	582.31	582.31	582.31
[Glu-Dha-Ala- <b>Arg</b> -MeAsp- <b>Arg</b> + H] <sup>+</sup>		711.35	711.36				711.35					

#### 4.4.4 Identification des microcystines MC-YR et apparentées

La poursuite de l'analyse du chromatogramme a permis de mettre en évidence, à plusieurs temps de rétention, les composés de masse moléculaire 1016.50, 1030.51 et 1044.53 Da. En appliquant une stratégie analytique identique à celle appliquée pour l'identification des microcystines connues, les composés de masse moléculaire 1016, 1030 et 1044 ont pu être identifiés comme faisant partie de la famille des microcystines, et plus précisément des MC-YR. Après reconstitution du chromatogramme, sur base du courant des ions suivis, 8 microcystines dérivées de la MC-YR ont été mises en évidence, à savoir les microcystines  $M_{1016a,b,c,d}$ ,  $M_{1030a-b}$  et  $M_{1044a-b}$ . En ESI-Orbitrap, les ions majoritaires étaient les ions dichargés  $[M+2H]^{2+} = 509.2556, 516.2635$  et  $523.2713$  Da.

La fragmentation MS/MS a été réalisée au sein de l'Orbitrap et les spectres MS/MS sont disponibles pour chaque microcystine de l'échantillon. Par contre, en ce qui concerne l'analyse par MALDI-FT-ICR, un seul dépôt, contenant la microcystine  $M_{1030a}$ , éluee par la HPLC, a été analysé par MS/MS car lors de l'enregistrement des spectres MALDI-FT-ICR, la présence d'isomères d'une même MC, n'était pas connue.

L'ion de  $m/z = 509.26$  Da pourrait correspondre à trois microcystines dérivées de la MC-YR, bien que jamais décrites à ce jour<sup>209</sup> : [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-YR, [D-Asp<sup>3</sup>, DMAdda<sup>5</sup>]-MC-YR et [DMAdda<sup>5</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-YR. Globalement, la formule brute correspond à un variant de la microcystine YR doublement déméthylé.

L'ion de  $m/z = 516.26$  Da pourrait correspondre, quant à lui, à trois microcystines connues au moment de l'analyse, à savoir : [Dha<sup>7</sup>]-MC-YR<sup>210</sup>, [D-Asp<sup>3</sup>]-MC-YR<sup>211</sup> et [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-HtyR<sup>212</sup>.

Enfin, les ions de  $m/z = 523.27$  Da pourraient correspondre à la microcystine MC-YR mais également à ces variants connus au moment de l'analyse : [D-Asp<sup>3</sup>]-MC-HtyR<sup>196</sup>, [Dha<sup>7</sup>]-MC-HtyR<sup>212</sup>, [D-Asp<sup>3</sup>, (E/Z)-Dhb<sup>7</sup>]-MC-HtyR<sup>148,213</sup>.

##### 4.4.4.1 Identification de $M_{1016}$ et $M_{1030}$ et $M_{1044}$

Le Tableau 9 présente le détail de la fragmentation des microcystines  $M_{1016a-d}$ ,  $M_{1030a,b}$  et  $M_{1044a,b}$ . L'analyse de la fragmentation permet de constater qu'il s'agit de variants de la famille de la microcystine YR, raison pour laquelle les fragments ont été rassemblés dans une même table.

Globalement, l'analyse du pattern de fragmentation complet des huit composés mène aux structures suivantes : [DMAdda<sup>5</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-YR pour les composés  $M_{1016a}$  et  $M_{1016b}$ , [D-Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]-MC-YR pour les composés  $M_{1016c}$  et  $M_{1016d}$ , [Dha<sup>7</sup>]-MC-YR pour les composés  $M_{1030a}$  et  $M_{1030b}$ , MC-YR pour le composé  $M_{1044a}$  et [Dha<sup>7</sup>]-MC-HtyR pour le composé  $M_{1044b}$ . On constate une nouvelle fois que bien que certains composés, de même masse exacte, soient résolus par la chromatographie, l'analyse de leur profil de fragmentation conduit, pour chacun, à une seule structure. De la même façon que nous l'avons fait pour les microcystines  $M_{966}$ ,  $M_{980}$  et  $M_{994}$ , nous pouvons faire l'hypothèse qu'il s'agit de stéréoisomères, donnant lieu aux mêmes ions fils lors d'une analyse MS<sup>2</sup> mais présentant un comportement physico-chimique légèrement différent lors de la séparation HPLC. Enfin, l'analyse de cet échantillon en HPLC-IMS-TOF n'a pas permis, dans les conditions du test, de résoudre les stéréoisomères présents dans l'échantillon.

Tableau 9 : Identification des pics ESI-HCD-MS<sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS<sup>2</sup> (FT-ICR) des composés M<sub>1016a</sub>, M<sub>1016b</sub>, M<sub>1016c</sub>, M<sub>1016d</sub>, M<sub>1030a</sub>, M<sub>1030b</sub>, M<sub>1044a</sub>, M<sub>1044b</sub>

Composition de l'ion	M <sub>1016a</sub> tr : 25.70 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1016b</sub> tr : 26.95 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1016c</sub> tr : 32.28 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1016d</sub> tr : 33.35 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1030a</sub> tr : 32.83 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap (*) MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>1030b</sub> tr : 33.43 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1044a</sub> tr : 32.72 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1044b</sub> tr : 37.83 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap
[P <sup>h</sup> -CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	121.0647 <sup>(b)</sup> 135.0802	121.0647 <sup>(b)</sup> 135.0801	135.0800	135.0800	135.0806	135.0800	135.0806	135.0804
[MDha-Ala + H] <sup>+</sup>	141.0655 <sup>(e)</sup>	141.0655 <sup>(e)</sup>	141.0653 <sup>(e)</sup>	-	141.0660 <sup>(e)</sup>	141.0653 <sup>(e)</sup>	155.0818	141.0657 <sup>(e)</sup>
[Arg + H] <sup>+</sup>	157.1079	157.1082	157.1077	-	157.1085	157.1077	-	-
[Ala-Tyr + H - C=O] <sup>+</sup>	207.1123	207.1127	207.1193	-	207.1122 207.1119 <sup>(*)</sup>	207.1119	207.1131	221.1282 <sup>(d)</sup>
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O + H] <sup>+</sup>	163.1112	163.1114	163.1111	163.1119	163.1190	163.1111	163.1119	163.1119
[Arg + NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	174.1345	174.1345	174.1343	174.1342	174.1351	174.1343	174.1352	174.1348
[Glu-MDha + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	-	-	-	-	182.0419 <sup>(e)</sup>	-	-	-
[Glu-MDha + H] <sup>+</sup>	199.0708 <sup>(e)</sup>	199.0708 <sup>(e)</sup>	199.0707 <sup>(e)</sup>	-	199.0715 <sup>(e)</sup> 199.0704 <sup>(*)</sup> <sup>(e)</sup>	199.0706 <sup>(e)</sup>	199.0717 213.0874	199.0761 <sup>(e)</sup>
[Adda + H - CH <sub>3</sub> OH - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	265.1580 <sup>(b)</sup>	265.1578 <sup>(b)</sup>	265.1577	265.1580	265.1580 265.1575 <sup>(*)</sup>	265.1576	265.1590	265.1589
[MDha-Ala-Tyr + H] <sup>+</sup>	304.1287 <sup>(e)</sup>	-	304.1282 <sup>(e)</sup>	-	-	-	-	-
[Adda + H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>	282.1844 <sup>(b)</sup>	282.1847 <sup>(b)</sup>	282.1844	-	282.1846	282.1842	282.1855	282.1853
[Glu-MDha-Ala+H] <sup>+</sup>	270.1081 <sup>(e)</sup>	270.1082 <sup>(e)</sup>	-	-	-	-	-	-
[MDha-Ala-Tyr-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	321.1538 <sup>(*)</sup> <sup>(e)</sup>	-	-	-
[MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup>	286.1503	286.1503	272.1343 <sup>(a)</sup>	-	286.1512 286.1496 <sup>(*)</sup>	286.1509	286.1499	286.1499
[MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	303.1768	303.1766	289.1608 <sup>(a)</sup>	289.1611 <sup>(a)</sup>	303.1777 303.1760 <sup>(*)</sup>	303.1776	303.1779	303.1769
[Adda + H] <sup>+</sup>	300.1958 <sup>(b)</sup>	-	-	-	-	-	-	-
[H <sub>2</sub> C(O)-Glu-MDha-Ala-NH <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	315.1686 <sup>(*)</sup>	-	-	-
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-MDha + H] <sup>+</sup>	361.1758 <sup>(e)</sup>	-	-	-	361.1760 <sup>(e)</sup> 361.1736 <sup>(*)</sup> <sup>(e)</sup> 363.1890 <sup>(*)</sup> 1,5-DAN <sup>(e)</sup>	-	-	-
[Tyr-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	432.1878	-	418.1711 <sup>(a)</sup>	-	432.2421 432.1849 <sup>(*)</sup>	432.1864	432.1885	446.2020 <sup>(d)</sup>
[Tyr-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	449.2120	-	435.1987 <sup>(a)</sup>	-	449.2148 449.2112 <sup>(*)</sup>	449.2130	449.2150	-
[Tyr-MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	466.2400	466.2382	452.2246 <sup>(a)</sup>	-	466.2404	466.2399	-	-

Composition de l'ion	M <sub>1016a</sub> tr : 25.70 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1016b</sub> tr : 26.95 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1016c</sub> tr : 32.28 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1016d</sub> tr : 33.35 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1030a</sub> tr : 32.83 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap (*) MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>1030b</sub> tr : 33.43 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1044a</sub> tr : 32.72 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1044b</sub> tr : 37.83 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	432.1849 <sup>(*)</sup> (e)	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> +H)+ H] <sup>+</sup>	465.2806 <sup>(b)</sup>	-	465.2803 <sup>(a)</sup>	-	465.2823 465.2788 <sup>(*)</sup>	465.2821	-	465.2806
[Ala-Tyr-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	520.2510	-	-	-	520.2524 520.2477 <sup>(*)</sup>	520.2499	520.2525	-
[Arg-Adda + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	470.3269 <sup>(*)</sup>	-	-	-
[M + 2 H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>2+</sup>	-	-	-	-	500.2509	500.2482	-	-
[Ala-Tyr-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	537.2768	537.2753	523.2600 <sup>(a)</sup>	-	537.2784	537.2784	537.2787	551.2922 <sup>(e)</sup>
[M + 2 H] <sup>2+</sup>	509.2567	-	-	509.2558	516.3172	-	-	-
[MDha-Ala-Tyr-MeAsp-Arg + H - CO] <sup>+</sup>	561.2764 <sup>(e)</sup>	-	-	-	561.2787 <sup>(e)</sup> 561.2738 <sup>(*)</sup> (e)	561.2765 <sup>(e)</sup>	-	-
[MDha-Ala-Tyr-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	572.2438 <sup>(e)</sup>	-	-	-	572.2468 <sup>(e)</sup> 572.2435 <sup>(*)</sup> (e)	572.2429 <sup>(e)</sup>	-	-
[MDha-Ala-Tyr-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	589.2714 <sup>(e)</sup>	589.2717 <sup>(e)</sup>	575.2558 <sup>(e)</sup>	-	589.2732 <sup>(e)</sup> 589.2686 <sup>(*)</sup> (e)	589.2734 <sup>(e)</sup>	603.2893 589.2738	603.2878 <sup>(c,d)</sup>
[Arg-Adda-Glu + H - COOH] <sup>+</sup>	-	-	-	-	554.3296 <sup>(*)</sup>	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- CH <sub>3</sub> OH+H)] <sup>+</sup>	567.3277 <sup>(b)</sup>	-	553.3106 <sup>(a)</sup> 567.3249 <sup>(a)</sup>	-	567.3290	567.3268	567.3299	567.3257
[MDha-Ala-Tyr-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	606.2977 <sup>(e)</sup>	606.2971 <sup>(e)</sup>	592.2818 <sup>(b,c)</sup>	-	606.3002 <sup>(e)</sup> 606.2943 <sup>(*)</sup> (e)	606.3005 <sup>(e)</sup>	620.3161 606.3002	620.3169 <sup>(c,d)</sup>
[Arg-Adda-Glu + H - CO] <sup>+</sup>	-	-	-	-	571.3559 <sup>(*)</sup>	-	-	-
[Arg-Adda-Glu+H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	568.3303 <sup>(b)</sup>	-	-	-	582.3242 <sup>(*)</sup>	-	-	-
[Arg-Adda(- CH <sub>3</sub> OH)-Glu + H] <sup>+</sup>	-	583.3239 <sup>(b)</sup>	-	-	-	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> +H)-Glu + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	594.3214	-	-
[Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup>	-	-	580.3085 <sup>(e)</sup>	-	-	-	-	-
[Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup>	585.3389 <sup>(b)</sup>	-	-	-	599.3553 599.3507 <sup>(*)</sup>	599.3493	-	-
[Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> )-Glu-MDha-Ala + 2H] <sup>+</sup>	605.3393 <sup>(b,c)</sup>	-	-	-	-	-	-	-
[Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> )-Glu-MDha-Ala + 3H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	606.3002 <sup>(e)</sup> 606.2943 <sup>(*)</sup> (e)	606.3005 <sup>(e)</sup>	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> +H)-Glu-MDha + H] <sup>+</sup>	663.3441 <sup>(b,c)</sup>	-	-	-	-	-	-	-
[Glu-MDha-Ala-Tyr-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	718.3157 <sup>(e)</sup>	-	704.2972 <sup>(b,c)</sup>	-	718.3233 <sup>(e)</sup>	718.3133 <sup>(e)</sup>	-	-

Composition de l'ion	M <sub>1016a</sub> tr : 25.70 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1016b</sub> tr : 26.95 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1016c</sub> tr : 32.28 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1016d</sub> tr : 33.35 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1030a</sub> tr : 32.83 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap (*) MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>1030b</sub> tr : 33.43 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1044a</sub> tr : 32.72 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1044b</sub> tr : 37.83 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap
[Arg- <u>Adda</u> -Glu- <u>MDha</u> + H] <sup>+</sup>	654.3597 <sup>(b,c)</sup>	-	654.3577 <sup>(c)</sup>	-	668.3758 <sup>(c)</sup> 668.3687 <sup>(*)</sup> <sup>(c)</sup>	668.3743 <sup>(c)</sup>	668.3772	-
[ <u>MeAsp</u> -Arg- <u>Adda</u> (-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu] <sup>+</sup>	696.3682 <sup>(b)</sup>	-	682.3545 <sup>(a)</sup>	-	696.3707	696.3695	696.3723	696.3676
[ <u>MeAsp</u> -Arg- <u>Adda</u> -Glu + H] <sup>+</sup>	714.3807 <sup>(b)</sup>	-	-	-	728.3904 <sup>(*)</sup>	728.3937	-	-
[Ala- <u>Tyr</u> - <u>MeAsp</u> -Arg- <u>Adda</u> (-CH <sub>3</sub> OH) + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	801.4277	-	-
[Arg- <u>Adda</u> -Glu- <u>MDha</u> -Ala + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	739.4117 <sup>(c)</sup>	-	-
[Arg- <u>Adda</u> -Glu- <u>MDha</u> -Ala + 2H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	740.4106 <sup>(c)</sup>	-	-
[ <u>MeAsp</u> -Arg- <u>Adda</u> (-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu- <u>MDha</u> ] <sup>+</sup>	765.3897 <sup>(b,c)</sup>	765.3897 <sup>(b,c)</sup>	751.3723 <sup>(b,c)</sup>	-	765.3934 <sup>(c)</sup> 765.3920 <sup>(*)</sup> <sup>(c)</sup>	765.3899 <sup>(c)</sup>	765.3941 779.4103	765.3895 <sup>(c)</sup>
[ <u>MeAsp</u> -Arg- <u>Adda</u> -Glu- <u>MDha</u> + H] <sup>+</sup>	783.4004 <sup>(b,c)</sup>	-	-	-	797.4143 <sup>(c)</sup>	-	-	-
[ <u>MDha</u> -Ala- <u>Tyr</u> - <u>MeAsp</u> -Arg- <u>Adda</u> (-CH <sub>3</sub> OH) + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	870.4448 <sup>(c)</sup>	870.4454 <sup>(c)</sup>	-	-
[ <u>MDha</u> -Ala- <u>Tyr</u> - <u>MeAsp</u> -Arg- <u>Adda</u> + H - CO] <sup>+</sup>	-	-	-	-	874.4756 <sup>(*)</sup> <sup>(c)</sup>	-	-	-
[Arg- <u>Adda</u> -Glu- <u>MDha</u> -Ala- <u>Tyr</u> + H - CO] <sup>+</sup>	-	-	-	-	874.4756 <sup>(*)</sup> <sup>(c)</sup>	-	-	-
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	-	-	866.4053	-	880.4199 880.4120 <sup>(*)</sup>	880.4227	-	894.4460
[ <u>MeAsp</u> -Arg- <u>Adda</u> (-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu- <u>MDha</u> -Ala] <sup>+</sup>	836.4270 <sup>(b,c)</sup>	-	822.4108 <sup>(b,c)</sup>	-	836.4278 <sup>(c)</sup>	836.4272 <sup>(c)</sup>	836.4311 850.4468	836.4283 <sup>(c)</sup>
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	897.4434 <sup>(b)</sup>	-	883.4272	883.4298	897.4436 897.4385 <sup>(*)</sup>	897.4432	897.4477 911.4640	911.4614
[M + H - CO] <sup>+</sup>	-	-	-	-	1003.5154 <sup>(*)</sup>	-	-	-
[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> - [M - OH] <sup>+</sup>	-	-	-	-	1013.5139 <sup>(*)</sup>	-	-	-
[M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> - [M - NH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	-	-	-	-	1014.9601	-	-	-
[M + H] <sup>+</sup>	-	-	-	-	1031.5217 1031.5098 <sup>(*)</sup>	-	-	-
	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-YR		[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-YR		[Dha <sup>7</sup> ]-MC-YR		MC-YR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-HtyR

Les acides aminés soulignés sont variables

(a) contient Asp<sup>3</sup> au lieu de MeAsp<sup>3</sup>

(b) contient DMAdda<sup>5</sup> au lieu de Adda<sup>5</sup> (si applicable : perd H au lieu de CH<sub>3</sub>)

(c) contient Dha<sup>7</sup> au lieu de MDha<sup>7</sup>

(d) contient Hty<sup>2</sup> (Homotyrosine) au lieu de Tyr<sup>2</sup>

## 4.4.5 Identification des microcystines MC-XR et apparentées

### 4.4.5.1 Identification de $M_{1014(1)}$ et $M_{1014(2)}$

L'analyse du chromatogramme de l'échantillon environnemental a mis en évidence la présence des ions dichargés de  $m/z = 508.3$  Da, avec une intensité substantielle.

La reconstruction du chromatogramme sur base du courant de cet ion fait apparaître deux massifs de pics, nettement éloignés dans le chromatogramme. En effet, les ions  $M_{1014a(1)}$  et  $M_{1014b(1)}$  éluant respectivement à  $t_R : 29$  min et  $t_R : 29.89$  min tandis que dans le second massif, les microcystines  $M_{1014c(2)}$  et  $M_{1014d(2)}$  éluent à  $t_R : 37.09$  min et  $t_R : 37.52$  min (Figure 22).

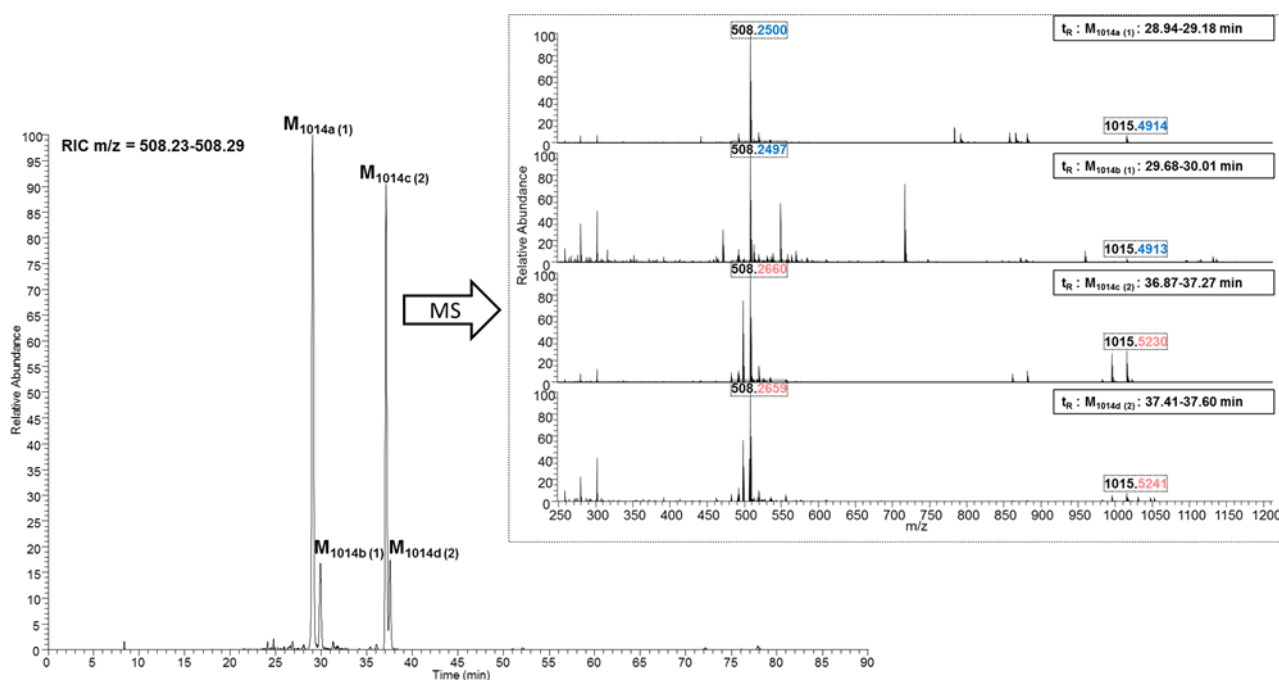


Figure 22 : Chromatogramme des ions de  $m/z$  compris entre 508.23 et 508.29 Da et spectres de masses associés à  $M_{1014a(1)}$ ,  $M_{1014b(1)}$ ,  $M_{1014c(2)}$  et  $M_{1014d(2)}$

Ainsi qu'illustré sur la Figure 22, la masse exacte a permis, dès le début de cette analyse, de discriminer les massifs  $M_{1014a(1)}$  et  $M_{1014b(1)}$  (ion de  $m/z = 508.2497$  Da) des massifs  $M_{1014c(2)}$  et  $M_{1014d(2)}$  (ion de  $m/z = 508.2659$  Da). Bien que cette différence de masse soit faible, elle représente tout de même plus de 30 ppm. Ceci, couplé à la différence de temps de rétention de 8 minutes dans le chromatogramme, suggère que les deux massifs aient des formules brutes différentes.

Le calcul de la formule brute par le logiciel Data Analysis a été effectué avec les mêmes critères que ceux appliqués pour chaque microcystine, à savoir : C45-60, H60-90, N6-15 et O10-16, à moins de 5 ppm près. La formule brute correspondant aux ions de  $m/z = 508.2658$  Da a été aisément déterminée comme étant  $C_{51}H_{70}N_{10}O_{12}$ . En effet, le  $m/z$  théorique de ce composé est de 508.2660 Da, ce qui correspond à une différence inférieure à 0.4 ppm entre la valeur expérimentale et la valeur théorique. En outre, plusieurs microcystines, de formule brute correspondant, sont rapportées à cette masse. Il s'agit notamment des microcystines [Dha<sup>7</sup>]-MC-FR et [D-Asp<sup>3</sup>]-MC-FR<sup>195</sup>.

La détermination de la formule brute correspondant à  $M_{1014a(1)}$  et  $M_{1014b(1)}$  a, quant à elle, été plus problématique. En effet, selon les critères posés pour la recherche de composition élémentaire, aucun des résultats proposés ne pouvait correspondre à la structure générale d'une microcystine. Par ailleurs, les formules brutes proposées ne correspondaient à aucune microcystine décrite.

Après revue de la littérature et en gardant l'hypothèse d'un squelette peu différent de celui d'une microcystine lambda, la conclusion est que la légère différence de masse pourrait être attribuée à la substitution d'un acide aminé par un autre contenant un oxygène supplémentaire ou un autre élément. En effet, certains auteurs ont rapporté la présence, par exemple, de soufre dans la structure de certaines microcystines<sup>195,214</sup>. Le poids moléculaire du soufre étant comparable à celui de l'oxygène, à quelques ppm près, l'hypothèse méritait d'être creusée.

L'acide aminé « M(O) », c'est-à-dire le sulfoxyde de méthionine, a été rapportée, en 1992, par Namkoshi et son équipe, dans la structure d'une microcystine de type MC-XR. La masse moléculaire de la microcystine MC-M(O)R est de 1028.5001 Da – ce qui, sous la forme  $[M+H]^+$  se traduit par des ions de  $m/z = 1028.5073$  Da. Nous avons déjà remarqué, au cours de l'analyse de la composition de l'échantillon environnemental, la présence très majoritaire de l'acide aminé Dha en position 7, au lieu de l'acide aminé MDha. Bien que la microcystine [Dha<sup>7</sup>]-MC-M(O)R n'ait, à ce jour, jamais été rapportée, l'hypothèse de cette structure a été étudiée dans le cadre de l'identification de  $M_{1014a(1)}$  et  $M_{1014b(1)}$ . La masse moléculaire de la variante déméthylée de MC-M(O)R, de formule brute  $C_{47}H_{70}N_{10}O_{13}S$ , serait de 1014.4845 Da, traduit dans le spectre de masse simulé par les ions  $[M+H]^+$  de  $m/z = 1015.4917$  Da et  $[M+2H]^{2+}$  de  $m/z = 508.2495$  Da.

La comparaison avec les masses expérimentales, respectivement de  $m/z = 508.2500$  Da ( $M_{1014a(1)}$ ) et  $508.2497$  Da ( $M_{1014b(1)}$ ) pour les ions dichargés, se traduit par une différence relative inférieure, respectivement, à 1 et 0.4 ppm. La comparaison avec les ions monochargés ( $m/z = 1015.4914$  Da et  $1015.4913$  Da) donne lieu à une différence par rapport à la masse théorique de 0.3 et 0.4 ppm. L'hypothèse, d'un point de vue de la formule brute est renforcée et doit être vérifiée par l'analyse du profil de fragmentation de  $M_{1014a(1)}$  et  $M_{1014b(1)}$ .

L'analyse du spectre de fragmentation de  $M_{1014a,b(1)}$  et  $M_{1014c,d(2)}$  (Tableau 10) confirme les hypothèses établies sur base de la formule brute et des temps de rétention. En effet, le spectre MS/MS de chacun des 4 composés obtenus au sein de l'Orbitrap est très riche et qualitatif. Le spectre MS/MS acquis en MALDI pour  $M_{1014c(2)}$  est, quant à lui, moins riche, mais les fragments obtenus au sein du FT-ICR sont identiques à ceux obtenus dans l'analyseur Orbitrap. Les profils de fragmentation des microcystines composant le massif  $M_{1014a(1)}$  et  $M_{1014b(1)}$  confirment la structure de [Dha<sup>7</sup>]-MC-M(O)R tandis que  $M_{1014c(2)}$  et  $M_{1014d(2)}$  sont identifiées comme étant [Dha<sup>7</sup>]-MC-FR.

Les deux microcystines identifiées ne diffèrent que d'un acide aminé, de masse très proche. Cette différence est surlignée dans le Tableau 10, avec, en couleur gris, les fragments communs (et donc de masse identique) et en couleur bleu et rose, les fragments contenant l'acide aminé variable.

Cette identification est particulièrement intéressante car, bien que de nombreuses microcystines aient actuellement été décrites, toutes ne le sont pas et c'est le cas de [Dha<sup>7</sup>]-MC-M(O)R. Par ailleurs, le nombre de standard commercialement accessible, et

permettant dès lors une identification formelle, est également très restreint. La méthode mise au point, exploitant le screening en MALDI, la séparation HPLC et la haute résolution obtenue dans l'analyseur Orbitrap a permis, avec le support d'une base de données détaillée, l'identification, a posteriori, de microcystines inconnues.

#### 4.4.5.2 *Identification $M_{1053}$*

L'analyse du chromatogramme a mis en évidence, en fin de gradient (38.2 minutes) des ions de  $m/z = 527.77$  Da (dichargés) et 1054.5350 Da (monochargés). La première étape est la reconstruction du chromatogramme, sur base du courant des ions suivis. En ESI-Orbitrap, les ions majoritaires étaient les ions dichargés  $[M+2H]^{2+}$  à  $m/z = 527.77$  Da mais, à la différence de la majorité des microcystines identifiées jusqu'alors, les ions monochargés présentaient également une intensité substantielle à  $[M+2H]^{2+}$  à  $m/z = 527.77$  Da. La Figure 23 représente le tracé chromatographique reconstruit sur base du courant produit par les ions mono- et dichargés.

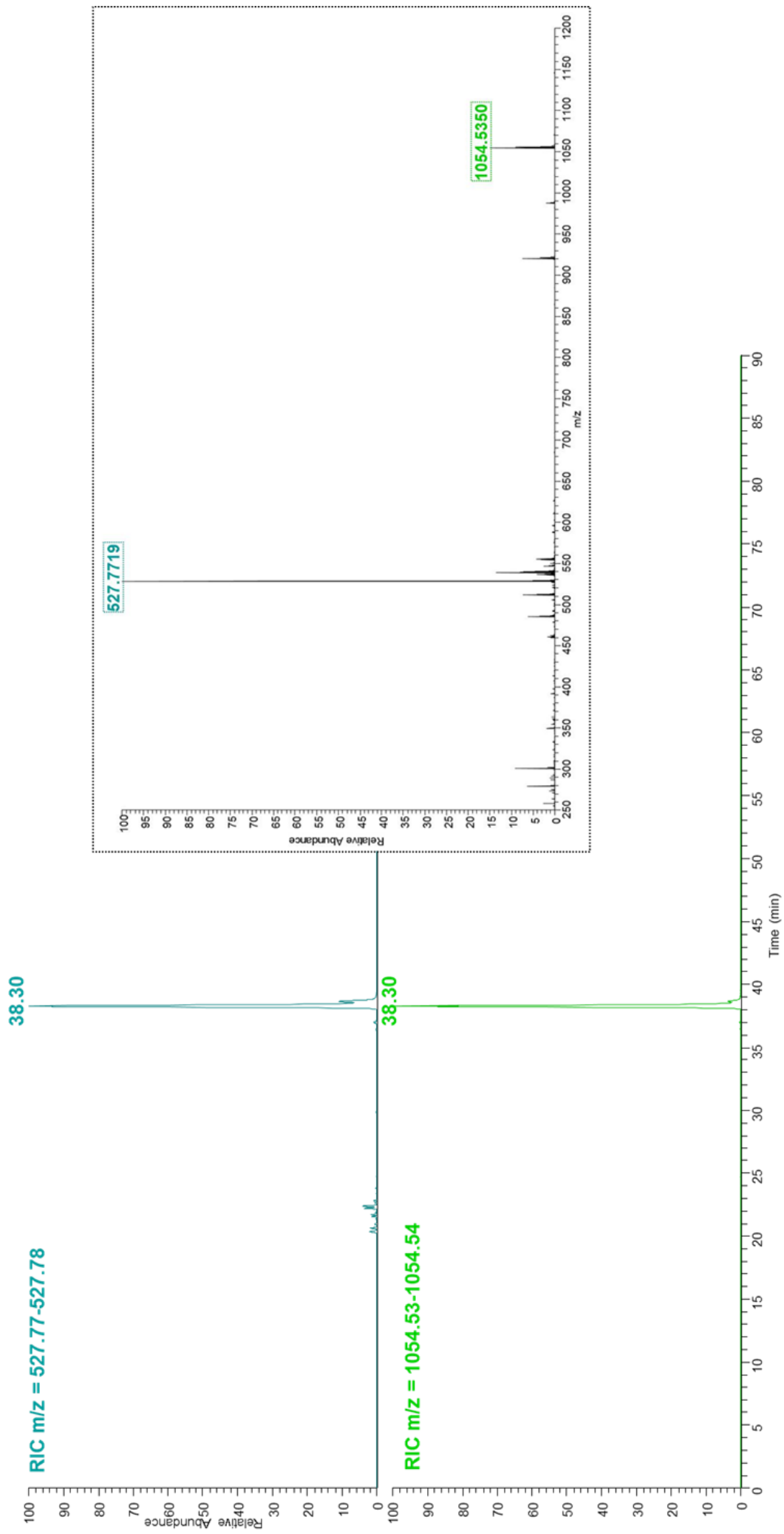


Figure 23 : RIC des ions  $[M+2H]^{2+}$  à 527.77 Da et  $[M+H]^+$  à 1054.54 Da et spectre de masse associé

La formule moléculaire de  $M_{1053}$  ( $C_{53}H_{71}N_{11}O_{12}$ ) est déterminée sur base de la masse exacte obtenue grâce à l'analyse par ESI-MS (Orbitrap). La fragmentation MALDI-FT-ICR MS/MS de  $M_{1053}$  n'est pas disponible car ce composé, inconnu initialement, n'a pas été fragmenté dans les différents dépôts HPLC-MALDI lors de notre analyse.

L'ion de  $m/z$  527.77 (1054.54) pourrait correspondre à un microcystine connue au moment de l'analyse : [D-Asp<sup>3</sup>]-MC-WR<sup>195,215</sup> avec W pour l'acide aminé tryptophane. Nous avons constaté au fil de l'analyse, que l'acide aminé MDha était déméthylé dans de nombreuses microcystines identifiées, tandis que la déméthylation en position 3 était proportionnellement moins importante. Bien que non décrite à ce jour, la microcystine [Dha<sup>7</sup>]-MC-WR pourrait dès lors également correspondre à  $M_{1053}$ .

Le spectre MS/MS est présenté en Figure 24. Les fragments apportant une information significative quant aux acides aminés présents dans la microcystine  $M_{1053}$  sont mis en évidence par un code couleur. Ainsi, le tryptophane en position 2 apparaît en mauve, l'acide aminé MeAsp en position 3 en gris dans le spectre, et enfin, les fragments contenant Dha apparaissent en orange.

La première information importante est la présence de l'ion  $m/z = 135.08$  Da indiquant la présence de l'acide aminé Adda non modifié.

Par ailleurs, les ions de  $m/z = 174.14$  Da ([Arg-NH<sub>2</sub> + 2H]<sup>+</sup>) sont indicatifs de la présence du groupement Arg. En outre, les ions de  $m/z = 303.18$  Da ([MeAsp-Arg-NH<sub>2</sub> + 2H]<sup>+</sup>), 465.28 Da ([MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH<sub>2</sub>-CH=OCH<sub>3</sub>+H)+ H]<sup>+</sup>) et 728.40 Da ([MeAsp-Arg-Adda-Glu + H]<sup>+</sup>) indiquent la présence de l'acide aminé MeAsp en position 3. D'autre part, les ions diagnostiques à  $m/z = 199.07$  Da ([Glu-Dha + H]<sup>+</sup>), 361.17 Da ([C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O-Glu-Dha + H]<sup>+</sup>) et 432.21 Da ([C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O-Glu-Dha-Ala + H]<sup>+</sup>) indiquent la présence de l'acide aminé Dha en position 7, à la place de MDha dans la structure de base. Enfin, la confirmation de l'identité de l'acide aminé en position 2 est apportée, notamment, par les ions fragments de  $m/z = 455.20$  Da ([Trp-MeAsp-Arg + H - NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 472.23 Da ([Trp-MeAsp-Arg + H]<sup>+</sup>), 489.26 Da ([Trp-MeAsp-Arg-NH<sub>2</sub> + 2H]<sup>+</sup>), 560.29 Da ([Ala-Trp-MeAsp-Arg-NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>), 612.29 Da ([Dha-Ala-Trp-MeAsp-Arg + H]<sup>+</sup>) et 629.32 Da ([Dha-Ala-Trp-MeAsp-Arg-NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>). L'analyse du pattern de fragmentation complet de  $M_{1053}$  (Figure 24 et Tableau 10) mène à son identification, à savoir la microcystine [Dha<sup>7</sup>]-MC-WR. Ce composé n'a, à notre connaissance, jamais été décrit dans la littérature.

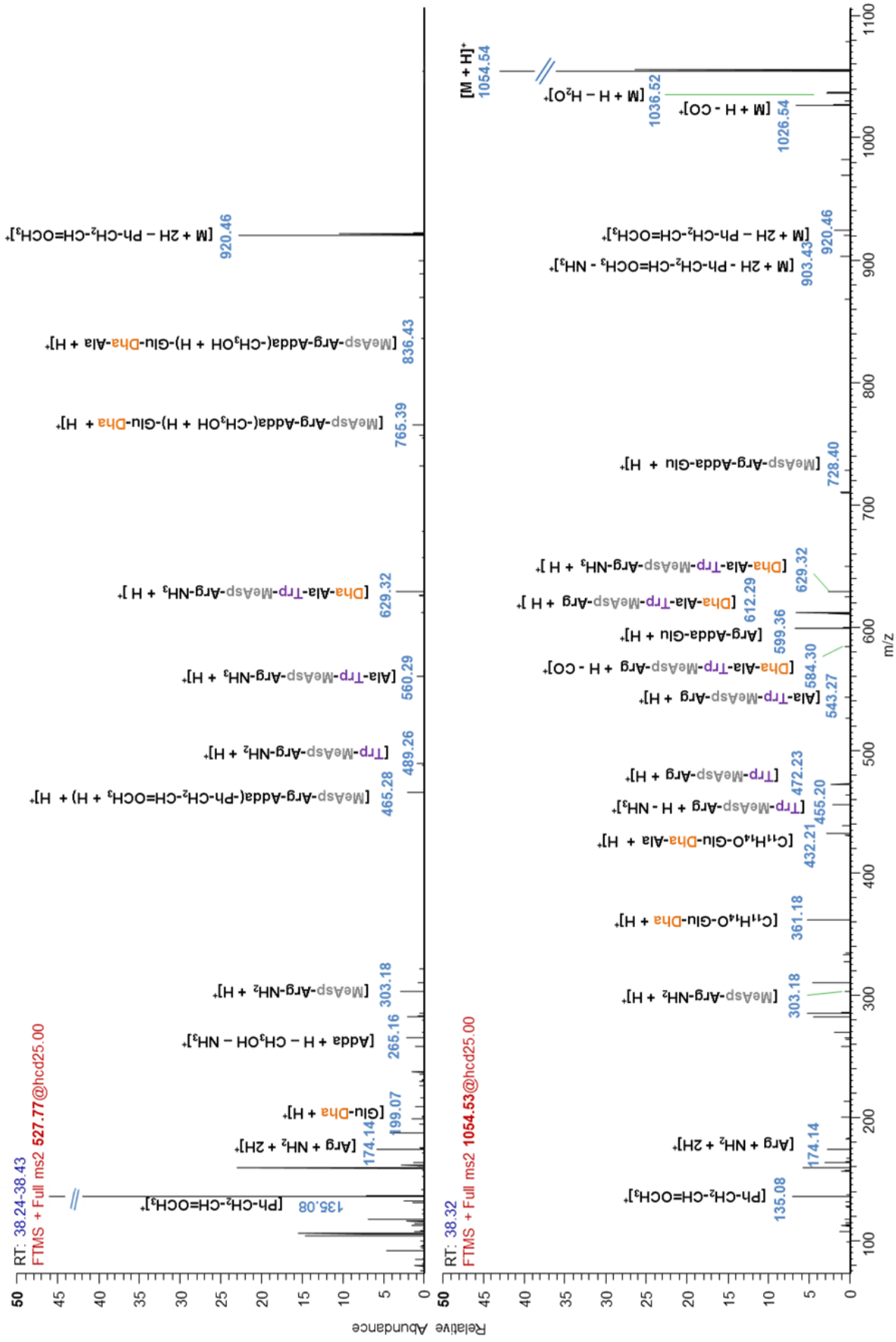


Figure 24 : Spectres MS<sup>2</sup> du composé M<sub>1053</sub> : Fragmentation de l'ion dichargé (haut de l'image : m/z = 527.77 Da) et de l'ion monochargé (bas de l'image : m/z = 1054.54) par ESI-HCD-MS<sup>2</sup> dans l'Orbitrap Q Exactive

Tableau 10 : Identification des pics ESI-HCD-MS<sup>2</sup> (Orbitrap) et MALDI-CID-MS<sup>2</sup> (FT-ICR) des composés M<sub>1014a,b</sub> (1), M<sub>1014c,d</sub> (2) et M<sub>1053</sub>

Composition de l'ion	[Dha <sup>7</sup> -MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> -MC-FR	[Dha <sup>7</sup> -MC-WR	M <sub>1014a</sub> (1) t <sub>R</sub> : 29.0 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1014b</sub> (1) t <sub>R</sub> : 29.9 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1014c</sub> (2) t <sub>R</sub> : 37.09 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1014c</sub> (2) t <sub>R</sub> : 37.09 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>1014d</sub> t <sub>R</sub> : 37.52 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1053</sub> t <sub>R</sub> : 38.30 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap
[Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	135.0804	135.0804	135.0804	135.0801	135.0804	135.0806	-	135.0806	135.0807
[Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	141.0659	141.0659	141.0659	141.0653	-	141.0659	-	-	-
[Arg + H] <sup>+</sup>	157.1084	157.1084	157.1084	157.1074	157.0607	157.1085	-	157.1080	157.1082
[Ala-X + H - C=O] <sup>+</sup>	191.0849(a)	191.1179(b)	230.1288(c)	-	-	191.1179(b)	-	191.1180(b)	-
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O + H] <sup>+</sup>	163.1117	163.1117	163.1117	163.1111	163.1116	163.1118	-	-	163.1118
[Arg + NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	174.1349	174.1349	174.1349	174.1330	174.1348	174.1350	-	174.1349	174.1351
[Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	199.0713	199.0713	199.0713	199.0710	-	199.0714	-	199.0716	199.0715
[Adda + H - CH <sub>3</sub> OH - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	265.1587	265.1587	265.1587	265.1577	265.1583	265.1587	-	265.1593	265.1585
[Dha-Ala-X + H] <sup>+</sup>	288.1013(a)	288.1343(b)	327.1452(c)	-	-	-	-	-	327.1464(e)
[Adda + H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>	282.1852	282.1852	282.1852	282.1846	282.1846	282.1853	-	282.1856	282.1853
[MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup>	286.1510	286.1510	286.1510	286.1502	286.1500	286.1510	-	286.1499	286.1510
[MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	303.1775	303.1775	303.1775	303.1768	303.1771	303.1776	-	303.1772	303.1782
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	361.1758	361.1758	361.1758	-	-	361.1758	361.1747	-	361.1757
[X-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	416.1604(a)	416.1928(b)	455.2037(c)	-	-	416.1931(b)	416.1908(b)	-	455.2037(e)
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu-Dha+H] <sup>2+</sup>	383.2001	383.2001	383.2001	-	-	383.2003	-	-	-
[X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	433.1864(a)	433.2194(b)	472.2303(c)	433.1834(a)	-	433.2196(b)	-	433.2186(b)	472.2323(e)
[X-MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup>	450.2129(a)	450.2459(b)	489.2568(c)	450.2145(a)	-	450.2459(b)	-	450.2460(b)	489.2579(e)
[C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O-Glu-Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	432.2129	432.2129	432.2129	-	-	-	432.2114	-	432.2138
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> +H)+H] <sup>+</sup>	465.2820	465.2820	465.2820	465.2808	465.2819	465.2823	-	-	465.2844
[Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	504.2235(a)	504.2565(b)	543.2674(c)	504.2222(a)	-	504.2566(b)	-	-	543.2672(e)
[Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	521.2500(a)	521.2831(b)	560.2940(c)	521.2487(a)	-	521.2832(b)	-	521.2826(b)	560.2918(e)
[M + 2 H] <sup>2+</sup>	508.2495(a)	508.2660(b)	527.7715(c)	508.2498(a)	508.2498(a)	508.2662(b)	-	508.2662(b)	-
[Dha-Ala-X-MeAsp-Arg + H - CO] <sup>+</sup>	545.2500(a)	545.2831(b)	584.2940(c)	-	-	545.2832(b)	-	-	584.2970(e)

Composition de l'ion	[Dha $\gamma$ ]-MC-M(O)R	[Dha $\gamma$ ]-MC-FR	[Dha $\gamma$ ]-MC-WR	M <sub>1014a</sub> (1) t <sub>R</sub> : 29.0 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1014b</sub> (1) t <sub>R</sub> : 29.9 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1014c</sub> (2) t <sub>R</sub> : 37.09 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1014c</sub> (2) t <sub>R</sub> : 37.09 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>1014d</sub> t <sub>R</sub> : 37.52 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1053</sub> t <sub>R</sub> : 38.30 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap
[Dha-Ala-X-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	556.2184(a)	556.2514(b)	595.2623(c)	556.2170(a)	-	556.2518(b)	-	-	595.2658(c)
[Dha-Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	573.2450(a)	573.2780(b)	612.2889(c)	573.2427(a)	-	573.2781(b)	573.2747(b)	573.2779(b)	612.2884(c)
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)] <sup>+</sup>	567.3289	567.3289	567.3289	567.3262	567.3297	567.3292	-	-	-
[Dha-Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup>	590.2715(a)	590.3045(b)	629.3154(c)	590.2705(a)	-	590.3047(b)	590.3009(b)	590.3030(b)	629.3148
[Arg-Adda-Glu + H - CO] <sup>+</sup>	571.3602	571.3602	571.3602	-	-	-	571.3569	-	571.3600
[Arg-Adda-Glu + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	582.3286	582.3286	582.3286	-	-	-	582.3260	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> +H)-Glu + H] <sup>+</sup>	594.3246	594.3246	594.3246	-	-	594.3252	-	-	-
[Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup>	599.3552	599.3552	599.3552	599.3523	-	599.3557	599.3518	-	599.3556
[Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> )-Glu-Dha-Ala + 2H] <sup>+</sup>	605.3406	605.3406	605.3406	-	-	605.3416	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(- Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> +H)-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	663.3461	663.3461	663.3461	-	-	663.3464	-	-	-
[Glu-Dha-Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup>	702.2876(a)	702.3206(b)	741.3315(c)	702.2882(a)	-	702.3205(b)	-	702.3184(b)	-
[Arg-Adda-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	668.3766	668.3766	668.3766	-	668.3785	668.3770	-	-	668.3737
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu] <sup>+</sup>	696.3715	696.3715	696.3715	696.3674	696.3692	696.3712	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup>	728.3978	728.3978	728.3978	-	-	728.3982	-	-	728.3992
[Ala-X-MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH) + H] <sup>+</sup>	785.4015(a)	785.4345(b)	824.4454(c)	-	-	785.4352(b)	-	-	-
[Arg-Adda-Glu-Dha-Ala + H] <sup>+</sup>	739.4137	739.4137	739.4137	-	-	739.4123	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu-Dha] <sup>+</sup>	765.3930	765.3930	765.3930	765.3905	-	765.3931	-	765.3933	765.3895
[Ala-X-MeAsp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup>	817.4277(a)	817.4607(b)	856.4716(c)	817.4175(a)	-	-	-	-	-
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> - (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CNH] <sup>+</sup>	822.3702(a)	822.4032(b)	861.4141(c)	-	-	822.4023(b)	-	-	-
[MeAsp-Arg-Adda-Glu-Dha + H] <sup>+</sup>	797.4192	797.4192	797.4192	-	-	797.4185	-	-	-
[Dha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH) + H] <sup>+</sup>	854.4229(a)	854.4559(b)	893.4668(c)	-	-	854.4591(b)	-	-	-
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	864.3920(a)	864.4250(b)	903.4359(c)	-	864.4614(a)	864.4260(b)	864.4232(b)	-	903.4310(c)
[MeAsp-Arg-Adda(-CH <sub>3</sub> OH+H)-Glu-Dha-Ala] <sup>+</sup>	836.4301	836.4301	836.4301	836.4279	-	836.4302	-	836.4281	836.4267
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	881.4186(a)	881.4516(b)	920.4625(c)	881.4152(a)	-	881.4517(b)	-	881.4489(b)	920.4564(c)

Composition de l'ion	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	M <sub>1014a</sub> (1) t <sub>R</sub> : 29.0 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1014b</sub> (1) t <sub>R</sub> : 29.9 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1014c</sub> (2) t <sub>R</sub> : 37.09 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1014c</sub> (2) t <sub>R</sub> : 37.09 min MALDI-MS <sup>2</sup> FT-ICR	M <sub>1014d</sub> t <sub>R</sub> : 37.52 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap	M <sub>1053</sub> t <sub>R</sub> : 38.30 min ESI-MS <sup>2</sup> Orbitrap
[M + H - CO] <sup>+</sup>	987.4968(a)	987.5298(b)	1026.5407(c)	-	-	-	-	-	1026.5390(e)
[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> - [M - OH] <sup>+</sup>	997.4812(a)	997.5142(b)	1036.5251(c)	-	-	-	-	-	1036.5207(e)
[M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> - [M - NH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	998.4652(a)	998.4982(b)	1037.5091(c)	-	-	-	-	-	1037.5171(e)
[M + H] <sup>+</sup>	1015.4917(a)	1015.5247(b)	1054.5356(c)	1015.4915(a)	1015.4915(a)	1015.5248(b)	-	1015.5248(b)	1054.5355(e)
Les acides aminés "X" soulignés sont variables : (a) X est l'acide amine Met(O) Sulfoxyde de méthionine) (b) X est l'acide amine Phe (Phénylalanine) (c) X est l'acide amine Trp (Tryptophane)	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR

## 5. CONCLUSIONS

Cette application environnementale a permis de démontrer l'utilité de la matrice 1,5-DAN en outil de screening et de localisation de doubles liaisons au sein des microcystines. Plus généralement, la stratégie analytique présentée au point 4.4.1 a permis, au terme de l'analyse, l'identification de 27 pics chromatographiques sous la forme de 16 microcystines dans l'échantillon environnemental. Par ailleurs, 18 pics chromatographiques, correspondant à des microcystines, ont pu être partiellement identifiés – ils apparaissent sous l'appellation : « dérivé » ou dmdm-MC-XR par exemple (Tableau 11). Pour ces composés, l'identification formelle n'a pas été possible mais la combinaison des informations obtenue au travers de l'analyse (temps de rétention, présence de l'ion traceur de  $m/z = 135.08$  Da, profil de fragmentation caractéristique) nous permet de classer ces microcystines par famille (en fonction des acides aminés variables les composant).

En outre, cette analyse environnementale a été l'occasion de développer une base de données de microcystines et de leurs fragments, en masse exacte, sur base de la littérature (pour les patterns de fragmentation) et sur base d'hypothèses quant à la composition en acides aminés des différentes microcystines. Cette base de données est principalement axée autour des toxines mises en évidence dans l'échantillon environnemental objet de ce chapitre, mais elle est amenée à s'enrichir de l'ensemble des microcystines connues/potentielles. Il s'agit d'un outil puissant d'identification et, à notre connaissance, ce niveau de détail (masse exacte et corrélation avec la formule brute de chaque fragment), n'avait jamais été rapporté.

Le Tableau 11 présente une synthèse de l'ensemble des microcystines mises en évidence par la chromatographie puis identifiées sur base de critères tels le temps de rétention, le temps de rétention du standard s'il existe, la masse exacte, la formule brute, le profil de fragmentation au sein de l'ESI-Orbitrap et au sein du Maldi-FT-ICR, lorsque celui-ci était disponible.

Tableau 11 : Récapitulatif des informations obtenues à l'issue de l'analyse de l'échantillon environnemental d'eau de lac (Ry Jaune) et identification de microcystines contaminant cet échantillon

MC	Formule brute	t <sub>R</sub> (min)	t <sub>R</sub> STD (min)	m/z	z	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)	Masse théorique monoisotopique M (Da)	Masse expérimentale monoisotopique M (Da)	Δm (ppm)	ms <sup>2</sup> Orbitrap	ms <sup>2</sup> Maldi	Identification
<b>M<sub>966a</sub></b>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	27.13	NA	484.27	2	484.2660	484.2660	0.0206	966.5175	966.5174	0.02	Oui	Oui	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR
<b>M<sub>966b</sub></b>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	28.41	NA	484.27	2	484.2660	484.2659	0.2478	966.5175	966.5172	0.25	Oui	-	dmdm-MC-LR
<b>M<sub>966c</sub></b>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	31.87	NA	484.27	2	484.2660	484.2659	0.1445	966.5175	966.5173	0.14	Oui	-	dmdm-MC-LR
<b>M<sub>966d</sub></b>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	32.76	NA	484.27	2	484.2660	484.2661	-0.2065	966.5175	966.5177	-0.21	Oui	-	dmdm-MC-LR
<b>M<sub>966e</sub></b>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	34.96	NA	484.27	2	484.2660	484.2664	-0.7847	966.5175	966.5182	-0.79	Oui	-	dmdm-MC-LR
<b>M<sub>966f</sub></b>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	35.89	NA	484.27	2	484.2660	484.2660	0.0826	966.5175	966.5174	0.08	Oui	-	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR
<b>M<sub>980a</sub></b>	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	34.12	NA	491.27	2	491.2738	491.2735	0.6819	980.5331	980.5324	0.68	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR
	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	34.12	NA	981.54	1	981.5404	981.5394	1.0127	980.5331	980.5321	1.01	Oui	Oui	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR
<b>M<sub>980b</sub></b>	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	34.99	NA	491.27	2	491.2738	491.2741	-0.5394	980.5331	980.5336	-0.54	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR
	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	34.99	NA	981.54	1	981.5404	981.5403	0.0958	980.5331	980.5330	0.10	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR
<b>M<sub>994a</sub></b>	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	34.07	34.35	498.28	2	498.2817	498.2809	1.5252	994.5488	994.5472	1.53	Oui	-	MC-LR
	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	34.07	34.35	995.55	1	995.5560	995.5536	2.4549	994.5488	994.5463	2.46	Oui	-	MC-LR
<b>M<sub>994b</sub></b>	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	37.12	NA	498.28	2	498.2817	498.2816	0.1204	994.5488	994.5486	0.12	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-HHR
	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	37.12	NA	995.56	1	995.5560	995.5552	0.8478	994.5488	994.5479	0.85	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-HHR
<b>M<sub>994c</sub></b>	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	37.55	NA	498.28	2	498.2817	498.2816	0.1204	994.5488	994.5486	0.12	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-HHR
	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	37.55	NA	995.56	1	995.5560	995.5551	0.9482	994.5488	994.5478	0.95	Oui	Oui	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-HHR
<b>M<sub>1009a</sub></b>	C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	21.44	NA	505.77	2	505.7749	505.7744	0.9886	1009.5345	1009.5342	0.26	Oui	-	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-RR

MC	Formule brute	t <sub>R</sub> (min)	t <sub>R</sub> STD (min)	m/z	z	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)	Masse théorique monoisotopique M (Da)	Masse expérimentale monoisotopique M (Da)	Δm (ppm)	ms <sup>2</sup> Orbitrap	ms <sup>2</sup> Maldi	Identification
<b>M1009b</b>	C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	22.23	NA	505.77	2	505.7749	505.7744	0.9886	1009.5345	1009.5342	0.26	Oui	-	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-RR
<b>M1009c</b>	C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	23.82	NA	505.77	2	505.7749	505.7748	0.1977	1009.5345	1009.5350	-0.53	Oui	-	dmdm-MC-RR
<b>M1009d</b>	C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	24.29	NA	505.77	2	505.7749	505.7747	0.3954	1009.5345	1009.5348	-0.33	Oui	-	dmdm-MC-RR
<b>M1009e</b>	C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	24.44	NA	505.77	2	505.7749	505.7748	0.1977	1009.5345	1009.5350	-0.53	Oui	-	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-RR
<b>M1014a</b>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S	29.00	NA	508.25	2	508.2495	508.2497	-0.3876	1014.4845	1014.4848	-0.39	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> -MC-M(O)R
<b>M1014b</b>	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S	29.89	NA	508.25	2	508.2495	508.2497	-0.3876	1014.4845	1014.4848	-0.39	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> -MC-M(O)R
<b>M1014c</b>	C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	37.09	NA	508.27	2	508.2660	508.2658	0.4132	1014.5175	1014.5170	0.41	Oui	Oui	[Dha <sup>7</sup> -MC-FR
<b>M1014d</b>	C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	37.52	NA	508.27	2	508.2660	508.2658	0.4132	1014.5175	1014.5170	0.41	Oui	Oui	[Dha <sup>7</sup> -MC-FR
<b>M1016a</b>	C <sub>50</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	25.70	NA	509.26	2	509.2556	509.2568	-2.2719	1016.4967	1016.4990	-2.28	Oui	-	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-YR
<b>M1016b</b>	C <sub>50</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	26.95	NA	509.26	2	509.2556	509.2560	-0.7010	1016.4967	1016.4974	-0.70	Oui	-	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-YR
<b>M1016c</b>	C <sub>50</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	32.28	NA	509.26	2	509.2556	509.2558	-0.3083	1016.4967	1016.4970	-0.31	Oui	-	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-YR
<b>M1016d</b>	C <sub>50</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	33.35	NA	509.26	2	509.2556	509.2558	-0.3083	1016.4967	1016.4970	-0.31	Oui	-	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> -MC-YR
<b>M1023a</b>	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	24.86	NA	512.78	2	512.7824	512.7837	-2.6151	1023.5502	1023.5528	-2.62	Oui	Oui	[Dha <sup>7</sup> -MC-RR
<b>M1023b</b>	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	25.88	NA	512.78	2	512.7824	512.7838	-2.8102	1023.5502	1023.5530	-2.82	Oui	Oui	[Dha <sup>7</sup> -MC-RR
<b>M1030a</b>	C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	32.80	NA	516.26	2	516.2635	516.2635	-0.0620	1030.5124	1030.5124	-0.06	Oui	Oui	[Dha <sup>7</sup> -MC-YR
<b>M1030b</b>	C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	33.43	NA	516.26	2	516.2635	516.2635	-0.0620	1030.5124	1030.5124	-0.06	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> -MC-YR
<b>M1037a</b>	C <sub>48</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	22.41	NA	519.77	2	519.7720	519.7706	2.7339	1037.5294	1037.5266	2.74	Oui	-	Dérivé MC-RR
<b>M1037b</b>	C <sub>48</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	22.61	NA	519.77	2	519.7720	519.7706	2.7339	1037.5294	1037.5266	2.738235582	Oui	-	Dérivé MC-RR
<b>M1037c</b>	C <sub>48</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	24.70	NA	519.77	2	519.7720	519.7707	2.5030	1037.5294	1037.5268	2.51	Oui	-	Dérivé MC-RR

MC	Formule brute	t <sub>R</sub> (min)	t <sub>R</sub> STD (min)	m/z	z	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)	Masse théorique monoisotopique M (Da)	Masse expérimentale monoisotopique M (Da)	Δm (ppm)	ms <sup>2</sup> Orbitrap	ms <sup>2</sup> Maldi	Identification
<b>M1037d</b>	C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	25.20	25.24	519.79	2	519.7902	519.7899	0.6233	1037.5658	1037.5652	0.62	Oui	-	Dérivé MC-RR
<b>M1037e</b>	C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	25.80	NA	519.79	2	519.7902	519.7884	3.4514	1037.5658	1037.5622	3.46	Oui	-	Dérivé MC-RR
<b>M1039a</b>	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	20.47	NA	520.78	2	520.7798	520.7798	0.0384	1039.5451	1039.5450	0.03	Oui	-	Oxydation [Dha]-RR
<b>M1039b</b>	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	21.15	NA	520.78	2	520.7798	520.7797	0.2304	1039.5451	1039.5448	0.22	Oui	-	Oxydation [Dha]-RR
<b>M1039c</b>	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	21.99	NA	520.78	2	520.7798	520.7800	-0.3456	1039.5451	1039.5454	-0.35	Oui	-	Oxydation [Dha]-RR
<b>M1039d</b>	C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	24.70	NA	520.78	2	520.7798	520.7787	2.1506	1039.5451	1039.5428	2.15	Oui	-	Oxydation [Dha]-RR
<b>M1041a</b>	C <sub>48</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	21.44	NA	521.79	2	521.7876	521.7876	0.0786	1041.5607	1041.5606	0.08	Oui	-	Dérivé MC-RR
<b>M1041b</b>	C <sub>48</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	22.80	NA	521.79	2	521.7876	521.7876	0.0786	1041.5607	1041.5606	0.08	Oui	-	Dérivé MC-RR
<b>M1041c</b>	C <sub>48</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	24.53	NA	521.79	2	521.7876	521.7874	0.4619	1041.5607	1041.5602	0.46	Oui	-	Dérivé MC-RR
<b>M1044a</b>	C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	32.71	32.85	523.27	2	523.2713	523.2715	-0.3956	1044.5280	1044.5284	-0.40	Oui	-	MC-YR
<b>M1044b</b>	C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	37.82	-	523.27	2	523.2713	523.2713	-0.0134	1044.5280	1044.5280	-0.02	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-HyR
<b>M1053</b>	C <sub>53</sub> H <sub>71</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	38.30	NA	527.77	2	527.7715	527.7713	0.3032	1053.5284	1053.5280	0.30	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR
	C <sub>53</sub> H <sub>71</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	38.30	NA	1054.54	1	1054.5356	1054.5350	0.5690	1053.5284	1053.5277	0.61	Oui	-	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR

En conclusion, la méthode mise au point et la stratégie analytique appliquée ont permis l'identification formelle et spécifique de plus de 16 microcystines différentes, dont la plupart n'avaient jamais été rapportées à ce jour. En comparaison avec les tests actuellement en place en Belgique, à savoir les tests ELISA, les résultats de l'analyse sont nettement plus spécifiques et détaillés. Par ailleurs, l'exploitation de la réduction spécifique de doubles liaisons en ionisation MALDI avec la matrice 1,5-DAN est un outil de screening très efficace pour les microcystines possédant une double liaison réductible. Les deux techniques MALDI et ESI sont complémentaires, et ont permis, à terme, l'identification de microcystines sur base de leur profil de fragmentation. Toutefois, les microcystines présentes dans l'échantillon environnemental étaient structurellement très semblables et certaines n'ont, malgré la spécificité de l'extraction, la sélectivité et la résolution de la chromatographie et la haute résolution couplée à la fragmentation obtenues en MS et MS/MS, pas pu être séparées ou identifiées. Afin de résoudre ce type de mélange extrêmement complexe, des méthodes telles la chromatographie liquide à 2 dimensions ou l'électrophorèse capillaire pourraient être plus performantes. A noter que les échantillons ont été analysés par la technique de la mobilité ionique (IMS). Les résultats ne sont pas détaillés dans ce travail mais la conclusion est que la mobilité ionique n'a pas permis l'obtention d'informations supplémentaires, en ce qui concerne notamment les composés donnant lieu à plusieurs pics chromatographiques. La mobilité ionique a en effet, donné lieu à un seul pic là où la chromatographie liquide en résolvait jusqu'à 6 dans le cas de l'échantillon environnemental.

Cette application environnementale a en conclusion permis l'identification de 16 microcystines, malgré l'absence de standards. En comparaison avec les méthodes actuelles de test des eaux de baignade, l'information obtenue est très spécifique et pourrait permettre une évaluation plus efficace de la toxicité d'un bloom sur base de sa composition et prendre les mesures adéquates pour réduire les risques de chaque bloom.

## **CONCLUSION**



Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux phycotoxines, c'est-à-dire les toxines produites par le plancton végétal, y compris les bactéries telles les cyanobactéries. Les phycotoxines peuvent se développer tant en eaux douces qu'en eaux salées, ont des structures chimiques très variables - certaines sont ioniques telles les saxitoxines et d'autres, tels l'acide okadaïque présentent de longues chaînes carbonées hydrophobes. Les phycotoxines constituent une menace pour la sécurité de la chaîne alimentaire de par leur propension à s'accumuler dans les produits de la mer, tels les coquillages par exemple.

Nous avons ensuite focalisé notre travail sur un groupe de phycotoxines particulier, à savoir les cyanotoxines et plus particulièrement les microcystines - toxines de structure heptapeptides cycliques-, se développant majoritairement dans les réservoirs d'eau douce. La menace constituée par la famille des microcystines est légèrement différente, dans la mesure où il s'agit généralement d'intoxications liées à un contact cutané ou d'intoxications d'animaux s'abreuvant d'eaux contaminées. Plusieurs approches ont été explorées.

Tout d'abord, la recherche, sur base d'une revue de la littérature, d'une matrice MALDI permettant la détection d'un maximum de cyanotoxines a été effectuée. L'obstacle de taille de cette partie du travail était d'évaluer les solutions proposées qui permettent la détection de cyanotoxines sans interférer dans le spectre de masse. En effet, la gamme de masse ciblée coïncidait, au départ, avec la gamme de masse des matrices MALDI classiquement exploitées. Avec l'introduction progressive des microcystines, la gamme de masse cible a été étendue à des masses supérieures à celles des matrices [200-1200] Da.

Les matrices MALDI classiques ont été évaluées et comparées avec les alternatives proposées par la communauté scientifique à l'entame de ce travail (2006). Ainsi, les matrices 2,5-DHB, HCCA et l'acide sinapinique, notamment, ont été testées et comparées aux matrices alternatives telles que le système DIOS (Desorption/ionisation on Silicon), les matrices ioniques liquides, les matrices porphyrines (dont le chromophore absorbe la longueur d'onde du LASER et assiste à l'ionisation), les matrices inorganique de type dioxyde de titane et le carbone graphite issu de mines de crayon.

Dans une seconde partie, les propriétés réductrices de la matrice 1,5-DAN ont été exploitées et ont permis la mise au point d'un outil de caractérisation des microcystines. Cette matrice réductrice, via la réduction de la double liaison C=C de certaines microcystines, a rendu possible la classification des microcystines et la discrimination entre les acides aminés Dhb, Dha et Ser/Ala présents en position 7 du cycle des microcystines. Ces recherches ont fait l'objet du premier chapitre de cette thèse.

La séparation HPLC d'un mélange de cyanotoxines avec détection en masse via l'Orbitrap a ensuite été mise au point sur base d'une revue de la littérature. Cette étape a permis de comparer différents types de phases et d'évaluer la pertinence d'utiliser une colonne de type monolithique en comparaison avec une colonne classique. Une fois l'étape de séparation HPLC mise au point, nous avons réalisé le couplage HPLC-MALDI via un système robotisé. En effet, le système mis au point permet le couplage d'une séparation HPLC classique avec le dépôt automatisé de la solution au sortir de la colonne HPLC. Après addition d'une matrice adéquate, la séparation HPLC, stockée sur plaque MALDI, peut faire l'objet d'une analyse dans tout spectromètre de masse permettant l'ionisation MALDI.

Le dernier chapitre de ce travail était consacré à l'analyse d'échantillons environnementaux et l'identification de toxines présentes dans ces échantillons au moyen de la méthode développée au cours de cette thèse (HPLC-MALDI-MS(/MS)). Cette analyse a été réalisée au sein d'analyseurs de masse à très haute résolution à savoir un spectromètre de masse à transformée de Fourier ainsi qu'un Orbitrap. Les échantillons environnementaux, une fois extraits, ont été purifiés puis leurs constituants ont été séparés par HPLC. Au sortir de la colonne HPLC, ils ont été soit déposés automatiquement sur les plots d'une plaque MALDI, soit injectés online en HPLC-ESI-MS/MS. Dans le cas de l'analyse MALDI, chaque séparation HPLC a été réalisée en duplicata afin de pouvoir, via l'utilisation de deux matrices MALDI aux propriétés chimiques différentes, faire la comparaison des signaux MALDI. En effet, l'une des matrices, aux propriétés réductrices (1,5-DAN) a provoqué la réduction d'une double liaison contenue dans les cyanotoxines, avec pour conséquence un décalage de son spectre de masse de deux unités de masse ( $M+2$ ). La comparaison des spectres enregistrés avec une matrice classique (2,5-DHB) et la matrice réductrice a permis de localiser cette double liaison au sein des fragments obtenus en spectrométrie de masse en tandem. Par ailleurs, grâce à la complémentarité des profils de fragmentation obtenus en ESI-MS/MS (HCD) MALDI-FT-MS/MS (CID), nous avons pu identifier une majorité de toxines présentes dans les échantillons et apporter un véritable plus par rapport à la technique de référence utilisée dans l'étude, à savoir dans ce cas, la méthode ELISA.

Bien que ce travail de thèse ait démarré en 2005, sur le terrain, il y a eu peu d'évolutions pratiques. Les méthodes de détections sont toujours basées sur la méthode ELISA, dont l'efficacité ainsi que l'excellent rapport qualité/prix ne sont plus à démontrer mais dont l'absence de spécificité cause toujours des difficultés lors de l'évaluation de la toxicité potentielle d'un bloom.

D'un point de vue HPLC et spectrométrie de masse, les évolutions sont par contre très notables, sans pour autant que les résultats présentés dans ce travail soient désuets. En effet, une publication récente (2017)<sup>216</sup>, décrit une méthode d'analyse par HPLC-HRMS/MS permettant l'identification de microcystines inconnues, grâce aux hautes résolutions accessibles tant en MS qu'en MS/MS<sup>195,216-220</sup>. Cette publication confirme que la méthode n'avait, jusqu'alors, jamais été décrite. Les auteurs ont souligné les mêmes problèmes que ceux rencontrés durant tout ce travail, à savoir le manque de standards, l'absence de

bases de données relatives aux cyanotoxines (ions parents et fragments), et la problématique d'identification de microcystines en dépit de fragmentations de plus en plus efficaces.

Bien que les technologies soient devenues de plus en plus sensibles et efficaces, et l'offre en solutions d'analyses se soit enrichie depuis le démarrage de ce travail, les freins initiaux sont toujours présents et il reste beaucoup de travail afin de rendre possible l'automatisation de l'analyse et de l'identification des cyanotoxines.

Notons qu'en comparaison avec la publication de Bogialli *et al.*, la méthode développée dans cette thèse présente l'avantage majeur d'une possibilité de screening par MALDI-MS. En effet, ce screening permet, en présence de matrice réductrice, l'obtention très rapide d'informations quant à la présence de composés réductibles, dont la plupart des microcystines. Ce travail a ouvert la voie et la poursuite de celui-ci, avec l'appui des nouvelles techniques d'analyses telles la mobilité ionique et l'électrophorèse capillaire par exemple, promet des progrès et avancées nettes dans le domaine de l'analyse des cyanobactéries et de leurs toxines.



## **BIBLIOGRAPHIE**



1. Dressler, D. & Adib Saberi, F. Botulinum Toxin: Mechanisms of Action. *European Neurology* **53**, 3-9 (2005).
2. Campbell, N. A. & Mathieu, R. *Biologie*. (De Boeck-Wesmael s.a., 1995).
3. Paerl, H. W. & Huisman, J. Climate: Blooms Like It Hot. *Science* **320**, 57-58 (2008).
4. World Health Organization, Chorus, I., Bartram, J. & World Health Organization. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. (E & FN Spon, 1999).
5. Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R. & Neilan, B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine drugs* **8**, 1650-80 (2010).
6. Llewellyn, L. E. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Reports* **23**, 200 (2006).
7. Surveillance des eaux de baignade - ISSEP. (2010) sur <http://www.issep.be/>
8. Service public de Wallonie. Brochure: Baignade et cyanobactéries Prémunissez-vous des risques. (2011).
9. Des cyanobactéries dans l'un des étangs d'Ixelles. *www.levif.be* (2010).
10. Huisman, J., Matthijs, H. C. P. & Visser, P. M. *Harmful Cyanobacteria*. *Harmful Cyanobacteria* **3**, (Springer, 2005).
11. Liberatore, S. Biggest algae bloom in history hits Lake Erie - and it is large enough to cover New York City | Daily Mail Online. *Dailymail* (2015) sur <http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-3313890/Biggest-algae-bloom-history-hits-Lake-Erie-large-cover-New-York-City.html>
12. Briand, J. F., Jacquet, S., Bernard, C. & Humbert, J. F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* **34**, 361-377 (2003).
13. Carmichael, W. W. *et al.* Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* **109**, 663-668 (2001).
14. Pouria, S. *et al.* Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet* **352**, 21-26 (1998).
15. Whitton, B. A. *Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. (Springer Netherlands, 2012).
16. Price, D. C. *et al.* Cyanophora paradoxa genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science (New York, N.Y.)* **335**, 843-7 (2012).
17. Baum, D. The origin of primary plastids: a pas de deux or a ménage à trois? *The Plant cell* **25**, 4-6 (2013).
18. Zhang, A., Carroll, A. L. & Atsumi, S. Carbon recycling by cyanobacteria: improving CO<sub>2</sub> fixation through chemical production. *FEMS Microbiology Letters* **364**, (2017).
19. Canfield, D. E. *et al.* Oxygen dynamics in the aftermath of the Great Oxidation of Earth's atmosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 16736-16741 (2013).

20. Canfield, D. E. The early history of atmospheric oxygen: Homage to Robert M. Garrels. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **33**, 1-36 (2004).
21. Ball, S. G. *et al.* Metabolic effectors secreted by bacterial pathogens: essential facilitators of plastid endosymbiosis? *The Plant cell* **25**, 7-21 (2013).
22. Duy, T. N., Lam, P. K. S., Shaw, G. R. & Connell, D. W. Toxicology and Risk Assessment of Freshwater Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water. *Reviews of environmental contamination and toxicology* **163**, 113-185 (2000).
23. Metcalf, J. S. & Codd, G. a. Cyanobacterial toxins in the water environment. 1-36 (2004).
24. Rohrlack, T. & Hyenstrand, P. Fate of intracellular microcystins in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia* **46**, 277-283 (2007).
25. Young, F. M., Thomson, C., Metcalf, J. S., Lucocq, J. M. & Codd, G. A. Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *Journal of Structural Biology* **151**, 208-214 (2005).
26. Lahti, K., Rapala, J., Färdig, M., Niemelä, M. & Sivonen, K. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Research* **31**, 1005-1012 (1997).
27. Paerl, H. W. & Otten, T. G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology* **65**, 995-1010 (2013).
28. Whitton, B. A. & Potts, M. *The Ecology of Cyanobacteria - Their Diversity in Time and Space*. (Springer Netherlands, 2000).
29. Codd, G. A., Morrison, L. F. & Metcalf, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and applied pharmacology* **203**, 264-72 (2005).
30. Funari, E. & Testai, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical reviews in toxicology* **38**, 97-125 (2008).
31. Levich, A. P. The role of nitrogen-phosphorus ratio in selecting for dominance of phytoplankton by cyanobacteria or green algae and its application to reservoir management. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* **5**, 55-61 (1996).
32. Dolman, A. M. *et al.* Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. *PLoS ONE* **7**, e38757 (2012).
33. Rastogi, R. P., Sinha, R. P. & Incharoensakdi, A. The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **13**, 215-249 (2014).
34. Willame, R. *et al.* Distribution of hepatotoxic cyanobacterial blooms in Belgium and Luxembourg. *Hydrobiologia* **551**, 99-117 (2005).
35. Reynolds, C. S. & Walsby, A. E. Water-Blooms. *Biological Reviews* **50**, 437-481 (1975).
36. Meriluoto, J. *et al.* *TOXIC Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis pp 69-72*. (Åbo Akademi University Press, 2005).
37. Lara, Y. Thèse: Molecular tools applied to the study of microcystin producing cyanobacteria in Belgian waterbodies. (2014).
38. *The scientific response to terrorism: response to eighth report of the Science and Technology Committee - Publications - GOV.UK*. (2003).
39. Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E. & Madamwar, D.

- Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource technology* **102**, 10163-72 (2011).
40. Rastogi, R. P., Sonani, R. R. & Madamwar, D. Cyanobacterial Sunscreen Scytonemin: Role in Photoprotection and Biomedical Research. *Applied biochemistry and biotechnology* **176**, 1551-63 (2015).
  41. Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K. & Fewer, D. P. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. *Trends in microbiology* **23**, 642-52 (2015).
  42. Roger, P. A. Cyanobactéries et riziculture. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques* **136**, 67-81 (1989).
  43. Vaishampayan, A. *et al.* Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Botanical Review* **67**, 453-516 (2001).
  44. Mishra, U. & Pabbi, S. Cyanobacteria: A potential biofertilizer for rice. *Resonance* **9**, 6-10 (2004).
  45. TerDax - Le péloïde de Dax sur  
<<http://fr.calameo.com/read/0000027972a2b11a79310>>
  46. Lax, N. C. *et al.* Marine cyanobacteria-derived serotonin receptor 2C active fraction induces psychoactive behavioral effects in mice. *Pharmaceutical Biology* **54**, 1-9 (2016).
  47. Férir, G. *et al.* Broad anti-HIV activity of the *Oscillatoria agardhii* agglutinin homologue lectin family. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 2746-58 (2014).
  48. Rapala, J., Erkomaa, K., Kukkonen, J., Sivonen, K. & Lahti, K. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytica Chimica Acta* **466**, 213-231 (2002).
  49. Falconer, I. R. & Yeung, D. S. K. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chemico-Biological Interactions* **81**, 181-196 (1992).
  50. Eriksson, J. E. *et al.* Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Experimental Cell Research* **185**, 86-100 (1989).
  51. Spooof, L. & Catherine, A. Appendix 3: Tables of Microcystins and Nodularins. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 526-537 (2017).
  52. Dahlmann, J., Budakowski, W. R. & Luckas, B. Liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. *Journal of Chromatography A* **994**, 45-57 (2003).
  53. Díez-Quijada, L., Prieto, A. I., Guzmán-Guillén, R., Jos, A. & Cameán, A. M. Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. *Food and Chemical Toxicology* **125**, 106-132 (2019).
  54. Rouhiainen, L. *et al.* Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and environmental microbiology* **70**, 686-92 (2004).
  55. Deleuze, C., De Pauw, E. & Quinton, L. Selective reduction of C=C double

- bonds in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of microcystins. *European journal of mass spectrometry* **16**, 91-99 (2010).
56. Beattie, K. A. *et al.* Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquatic Toxicology* **62**, 219-226 (2003).
  57. Blom, J. F., Ju, F. & Juttner, F. High crustacean toxicity of microcystin congeners does not correlate with high protein phosphatase inhibitory activity. *Toxicon* **46**, 465-470 (2005).
  58. Blom, J. F., Robinson, J. A. & Juttner, F. High grazer toxicity of [D-Asp(3),(E)-Dhb(7)]microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon* **39**, 1923-1932 (2001).
  59. Kaya, K., Sano, T., Inoue, H. & Takagi, H. Selective determination of total normal microcystin by colorimetry, LC/UV detection and/or LC/MS. *Analytica Chimica Acta* **450**, 73-80 (2001).
  60. Ishii, H., Nishijima, M. & Abe, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. *Water Research* **38**, 2667-2676 (2004).
  61. Hoeger, S. J., Schmid, D., Blom, J. F., Ernst, B. & Dietrich, D. R. Analytical and functional characterization of microcystins [Asp(3)]MC-RR and [Asp(3),Dhb(7)]MC-RR: Consequences for risk assessment? *Environmental Science & Technology* **41**, 2609-2616 (2007).
  62. *Fundamental Toxicology for Chemists*. (Royal Society of Chemistry, 1996).
  63. Bertrand, F. *et al.* Les intoxications par les cyanobactéries. *Le point Vétérinaire* **250**, 46-50 (2004).
  64. Journée scientifique d'échanges sur les biotoxines. Toxines de micro-algues et cyanobactéries. 1-88 (2003).
  65. Ibelings, B. W., Backer, L. C., Kardinaal, W. E. A. & Chorus, I. Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. *Harmful algae* **49**, 63-74 (2015).
  66. Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins. (2015).
  67. Gorchev, H. G. & Ozolins, G. WHO guidelines for drinking-water quality. *WHO chronicle* **38**, 104-8 (1984).
  68. *Guidelines for Drinking-water Quality*. World Health Organization **3**, (World Health Organization, 2004).
  69. *World Health Organisation: Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: Coastal and fresh waters*. **1**, (2003).
  70. Présentation Projet BELSPO: B-BLOOMS: un problème émergent pour la santé et l'utilisation durable des eaux de surface.
  71. Van Hoof, F., Van Es, T., D'Hondt, D. & De Pauw, N. *Screening of Cyanobacterial Toxins in Microcystis Aeruginosa Collected from Blooms and Cultures. Detection Methods for Cyanobacterial Toxins* (Woodhead Publishing, 1994).
  72. Wirsing, B. *et al.* First report on the identification of microcystin in a water bloom collected in Belgium. *Systematic and applied microbiology* **21**, 23-27 (1998).

73. Parlement européen. Directive 2006/7/CE gestion de la qualité des eaux de baignade. *Journal officiel des Communautés européennes* 1-15 (2006).
74. Descy, J. P. *et al.* B-BLOOMS 2 Final Report: Cyanobacterial blooms: Toxicity, diversity, modelling and management. (2011).
75. van Wichelen, J., van Gremberghe, I., Vanormelingen, P. & Vyverman, W. The importance of morphological versus chemical defences for the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* against amoebae grazing. *Aquatic Ecology* **46**, 73-84 (2012).
76. Metcalf, J. S., Bell, S. G. & M, G. A. C. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. *Water Research* **34**, 2761-2769 (2000).
77. Codd, G. a. *et al.* Analysis of cyanobacterial toxins by physicochemical and biochemical methods. *Journal of AOAC International* **84**, 1626-1635 (2001).
78. Kaufman, H. R. *Performance correlation for electron-bombardment ion sources.* Nasa Technical Note (1965).
79. Howard, K. L. & Boyer, G. L. Quantitative Analysis of Cyanobacterial Toxins by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **79**, 5980-5986 (2007).
80. LeRiche, T., Osterodt, J. & Volmer, D. A. An experimental comparison of electrospray ion-trap and matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectra for the characterization of small drug molecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**, 608-614 (2001).
81. Matta, A., Ralhan, R., DeSouza, L. V. & Siu, K. W. M. Mass spectrometry-based clinical proteomics: Head-and-neck cancer biomarkers and drug-targets discovery. *Mass Spectrometry Reviews* **29**, 945-961 (2010).
82. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* **246**, 64-71 (1989).
83. Gross, J. *Mass Spectrometry A textbook.* (Springer-Verlag, 2011).
84. Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C. & Chait, B. T. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry of Biopolymers. *Analytical Chemistry* **63**, 1193A-1202A (1991).
85. Busch, K. L. Special feature: Tutorial. Desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **30**, 233-240 (1995).
86. Bristol University <http://www.bris.ac.uk/>. (2016) sur <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/esi-ionisation.xhtml>>
87. Hoffmann, E. De & Stroobant, V. in *Mass spectrometry reviews* **29**, 945-61 (2007).
88. Kinumi, T., Saisu, T., Takayama, M. & Niwa, H. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 417-422 (2000).
89. Wolff, M. M. & Stephens, W. E. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Review of Scientific Instruments* **24**, 616 (1953).
90. Stephens, W. E. Proceedings of the American Physical Society. *Physical Review* **69**, 674-674 (1946).

91. Wiley, W. C. & McLaren, I. H. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Review of Scientific Instruments* **26**, 1150 (1955).
92. Bruker Daltonics Ultraflex TOF/TOF Operator Manual. (2001).
93. Comisarow, M. B. & Marshall, A. G. Frequency-sweep fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **26**, 489-490 (1974).
94. Comisarow, M. B. & Marshall, A. G. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **25**, 282-283 (1974).
95. Marshall, A. G., Hendrickson, C. L. & Jackson, G. S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews* **17**, 1-35 (1998).
96. Nikolaev, E. N., Boldin, I. A., Jertz, R. & Baykut, G. Initial Experimental Characterization of a New Ultra-High Resolution FTICR Cell with Dynamic Harmonization. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **22**, 1125-1133 (2011).
97. Makarov, A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry* **72**, 1156-1162 (2000).
98. Scigelova, M. & Makarov, A. Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. *Proteomics* **6**, 16-21 (2006).
99. Makarov, A. Mass spectrometer - Patent US5886346A. (1999).
100. Zubarev, R. A. & Makarov, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **85**, 5288-5296 (2013).
101. Tandem Mass Spectrometry From Wikipedia, the free encyclopedia sur <[https://en.wikipedia.org/wiki/Tandem\\_mass\\_spectrometry](https://en.wikipedia.org/wiki/Tandem_mass_spectrometry)>
102. Moreira, C., Ramos, V., Azevedo, J. & Vasconcelos, V. Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment. *Applied microbiology and biotechnology* **98**, 8073-82 (2014).
103. Welker, M., Fastner, J., Erhard, M., Do, H. Von & von Döhren, H. Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. *Environmental toxicology* **17**, 367-74 (2002).
104. Ferranti, P. *et al.* Liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight tandem mass spectrometry for microcystin analysis in freshwaters: method performances and characterisation of a novel variant of microcystin-RR. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **23**, 1328-1336 (2009).
105. Johnson, R. C. *et al.* Quantification of Saxitoxin and Neosaxitoxin in Human Urine Utilizing Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* **33**, 8-14 (2009).
106. Sleno, L. & Volmer, D. A. Some fundamental and technical aspects of the quantitative analysis of pharmaceutical drugs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 1928-1936 (2005).
107. Mccombie, G. & Knochenmuss, R. Small-molecule MALDI using the matrix suppression effect to reduce or eliminate matrix background interferences. *Analytical Chemistry* **76**, 4990-4997 (2004).
108. Bodnar, W. M., Blackburn, R. K., Krise, J. M. & Moseley, M. A. Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for

- increased proteome coverage. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14**, 971-979 (2003).
109. Go, E. P. *et al.* Quantitative analysis with desorption/ionization on silicon mass spectrometry using electrospray deposition. *Analytical Chemistry* **75**, 5475-5479 (2003).
  110. Ren, S. F., Zhang, L., Cheng, Z. H. & Guo, Y. L. Immobilized carbon nanotubes as matrix for MALDI-TOF-MS analysis: Applications to neutral small carbohydrates. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **16**, 333-339 (2005).
  111. Soltzberg, L. J. & Patel, P. Small molecule matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a polymer matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 1455-1458 (2004).
  112. Ayorinde, F. O., Hambright, P., Porter, T. N. & Keith, Q. L. Use of meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **13**, 2474-2479 (1999).
  113. Greisch, J. F., Gabelica, V., Remacle, F., De Pauw, E. & Pauw, E. De. Thermometer ions for matrix-enhanced laser desorption/ionization internal energy calibration. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 1847-1854 (2003).
  114. Kampen, J. J. A. Van *et al.* Qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical compounds by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical chemistry* **78**, 5403-5411 (2006).
  115. Srinivasan, N., Haney, C. A., Lindsey, J. S., Zhang, W. & Chait, B. T. Investigation of MALDI-TOF Mass Spectrometry of Diverse Synthetic Metalloporphyrins, Phthalocyanines and Multiporphyrin Arrays. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **3**, 283-291 (1999).
  116. Wei, J., Buriak, J. M. & Siuzdak, G. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nature* **399**, 243-246 (1999).
  117. Shen, Z. *et al.* Porous Silicon as a Versatile Platform for Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **73**, 612-619 (2001).
  118. Goreckadrzazga, a *et al.* Desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon dioxide. *Sensors and Actuators B: Chemical* **103**, 206-212 (2004).
  119. Lewis, W. G., Shen, Z. X., Finn, M. G. & Siuzdak, G. Desorption/ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry: background and applications. *International Journal of Mass Spectrometry* **226**, 107-116 (2003).
  120. Thomas, J. J., Shen, Z. X., Crowell, J. E., Finn, M. G. & Siuzdak, G. Desorption/ionization on silicon (DIOS): A diverse mass spectrometry platform for protein characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4932-4937 (2001).
  121. Kraj, A. *et al.* Desorption/ionization on silicon for small molecules: a promising alternative to MALDI TOF. *Acta Biochimica Polonica* **50**, 783-787 (2003).
  122. Thomas, J. J., Shen, Z., Blackledge, R. & Siuzdak, G. Desorption – ionization on silicon mass spectrometry : an application in forensics. *Analytica Chimica Acta* **442**, 183-190 (2001).

123. Kruse, R. A., Li, X. L., Bohn, P. W. & Sweedler, J. V. Experimental factors controlling analyte ion generation in laser desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon. *Analytical Chemistry* **73**, 3639-3645 (2001).
124. Tuomikoski, S. *et al.* Preparation of porous n-type silicon sample plates for desorption/ionization on silicon mass spectrometry (DIOS-MS). *Lab on A Chip* **2**, 247-253 (2002).
125. Buriak, J. M., Wei, J. & Siuzdak, G. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nature* **399**, 243-246 (1999).
126. Liu, Q. & He, L. Quantitative study of solvent and surface effects on analyte ionization in desorption ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **19**, 8-13 (2008).
127. Dattelbaum, A. M. & Iyer, S. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Expert Review of Proteomics* **3**, 153-161 (2006).
128. Lee, C. *et al.* Analysis of small molecules by desorption / ionization on mesoporous silicate ( DIOM ) -mass spectrometry ( MS ). *Microporous and Mesoporous Materials* **98**, 200-207 (2007).
129. Guinan, T. *et al.* Surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry techniques for application in forensics. *Mass Spectrometry Reviews* **34**, 627-40 (2015).
130. Castro, A. L. *et al.* Titanium dioxide anatase as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 3761-3766 (2008).
131. Pan, C. S. *et al.* Using oxidized carbon nanotubes as matrix for analysis of small molecules by MALDI-TOF MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **16**, 883-92 (2005).
132. Black, C., Poile, C., Langley, J. & Herniman, J. The use of pencil lead as a matrix and calibrant for matrix-assisted laser desorption/ionisation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**, 1053-1060 (2006).
133. Anderson, J. L., Armstrong, D. W. & Wei, G. T. Ionic Liquids in Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry* **78**, 2892-2902 (2006).
134. Armstrong, D. W., Zhang, L. K., He, L. F. & Gross, M. L. Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **73**, 3679-3686 (2001).
135. Tholey, R. A. & Heinzle, E. Ionic ( liquid ) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry — applications and perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**, 24-37 (2006).
136. Zabet-Moghaddam, M., Heinzle, E. & Tholey, A. Qualitative and quantitative analysis of low molecular weight compounds by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrices. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 141-148 (2004).
137. Yuan, M. *et al.* Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **34**, 33-43 (1999).
138. Kubwabo, C., Vais, N. & Benoit, F. M. Characterization of microcystins using in-source collision-induced dissociation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 597-604 (2005).

139. Bateman, K. P., Thibault, P., Douglas, D. J. & White, R. L. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. *Journal of chromatography. A* **712**, 253-68 (1995).
140. Jurczak, T., Tarczynska, M., Karlsson, K. & Meriluoto, J. Characterization and Diversity of Cyanobacterial Hepatotoxins (Microcystins) in Blooms from Polish Freshwaters Identified by Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Chromatographia* **59**, 571-578 (2004).
141. Krüger, T., Christian, B. & Luckas, B. Development of an analytical method for the unambiguous structure elucidation of cyclic peptides with special appliance for hepatotoxic desmethylated microcystins. *Toxicon* **54**, 302-312 (2009).
142. Mayumi, T. *et al.* Structural Characterization of Microcystins by LC/MS/MS under Ion Trap Conditions. *The Journal of Antibiotics* **59**, 710-719 (2006).
143. Namikoshi, M. *et al.* Seven new microcystins possessing two L-glutamic acid units, isolated from *Anabaena* sp. strain 186. *Chemical research in toxicology* **11**, 143-9 (1998).
144. Demeure, K. *et al.* Rational selection of the optimum MALDI matrix for top-down proteomics by in-source decay. *Analytical Chemistry* **79**, 8678-8685 (2006).
145. Quinton, L. *et al.* New method for characterizing highly disulfide-bridged peptides in complex mixtures: Application to toxin identification from crude venoms. *Journal of Proteome Research* **6**, 3216-3223 (2007).
146. Takayama, M. In-source decay characteristics of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **12**, 420-7 (2001).
147. Sano, T., Takagi, H. & Kaya, K. A Dhb-microcystin from the filamentous cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Phytochemistry* **65**, 2159-2162 (2004).
148. Sano, T. & Kaya, K. Two new (E)-2-amino-2-butenoic acid (Dhb)-containing microcystins isolated from *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron* **54**, 463-470 (1998).
149. Hastie, C. J., Borthwick, E. B., Morrison, L. F., Codd, G. A. & Cohen, P. T. W. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1726**, 187-193 (2005).
150. Bagu, J. R., Sykes, B. D., Craig, M. M. & Holmes, C. F. B. A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1 - Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 5087-5097 (1997).
151. Mann, M., Hojrup, P. & Roepstorff, P. Use of Mass-Spectrometric Molecular-Weight Information to Identify Proteins in Sequence Databases. *Biological Mass Spectrometry* **22**, 338-345 (1993).
152. Johnson, R. S., Martin, S. A. & Biemann, K. Collision-Induced Fragmentation of (M+H)<sup>+</sup>Ions of Peptides - Side-Chain Specific Sequence Ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **86**, 137-154 (1988).
153. Johnson, R. S., Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T. & Watson, J. T. Novel Fragmentation Process of Peptides by Collision-Induced Decomposition in A

- Tandem Mass-Spectrometer - Differentiation of Leucine and Isoleucine. *Analytical Chemistry* **59**, 2621-2625 (1987).
154. Wysocki, V. H., Resing, K. A., Zhang, Q. F. & Cheng, G. L. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* **35**, 211-222 (2005).
  155. Fukuyama, Y., Iwamoto, S. & Tanaka, K. Rapid sequencing and disulfide mapping of peptides containing disulfide bonds by using 1,5-diaminonaphthalene as a reductive matrix. *Journal of Mass Spectrometry* **41**, 191-201
  156. Asakawa, D. Principles of hydrogen radical mediated peptide/protein fragmentation during matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **35**, 535-556 (2016).
  157. Asakawa, D., Smargiasso, N. & De Pauw, E. Estimation of peptide N-Ca bond cleavage efficiency during MALDI-ISD using a cyclic peptide. *Journal of Mass Spectrometry* **51**, 323-7 (2016).
  158. Matysiak, J., Hajduk, J., Mayer, F., Hebel, R. & Kokot, Z. J. Hyphenated LC-MALDI-ToF/ToF and LC-ESI-QToF approach in proteomic characterization of honeybee venom. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **121**, 69-76 (2016).
  159. Holčapek, M., Jirásko, R. & Lísa, M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A* **1259**, 3-15 (2012).
  160. Yang, Y. *et al.* A comparison of nLC-ESI-MS/MS and nLC-MALDI-MS/MS for GeLC-based protein identification and iTRAQ-based shotgun quantitative proteomics. *Journal of biomolecular techniques* **18**, 226-37 (2007).
  161. Babica, P. *et al.* Evaluation of extraction approaches linked to ELISA and HPLC for analyses of microcystin-LR, -RR and -YR in freshwater sediments with different organic material contents. *Analytical and bioanalytical chemistry* **385**, 1545-51 (2006).
  162. Schmidtkunz, C., Bernd Stich, H., Welsch, T., Stich, H. B. & Welsch, T. Improving the Selectivity and Confidence in the HPLC Analysis of Microcystins in Lake Sediments. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **32**, 801-821 (2009).
  163. Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T. & Meriluoto, J. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1020**, 105-119 (2003).
  164. Triantis, T. *et al.* Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. *Toxicon* **55**, 979-989 (2010).
  165. Wang, Z. H., King, K. L., Ramsdell, J. S. & Doucette, G. J. Determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1163**, 169-176 (2007).
  166. Xu, W. *et al.* Development and application of ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples. *Analytica Chimica Acta* **626**, 28-36 (2008).

167. Cong, L. *et al.* Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **569**, 157-168 (2006).
168. Gurbuz, F. *et al.* Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. *The Science of the total environment* **407**, 4038-46 (2009).
169. Lawton, L. A., Chambers, H., Edwards, C., Nwaopara, A. A. & Healy, M. Rapid detection of microcystins in cells and water. *Toxicon* **55**, 973-978 (2010).
170. Mekebri, A., Blondina, G. J. & Crane, D. B. Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* **1216**, 3147-55 (2009).
171. Mountfort, D. O., Holland, P. & Sprosen, J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. *Toxicon* **45**, 199-206 (2005).
172. Ortelli, D., Edder, P., Cognard, E. & Jan, P. Fast screening and quantitation of microcystins in microalgae dietary supplement products and water by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **617**, 230-7 (2008).
173. Ott, J. L. & Carmichael, W. W. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. *Toxicon* **47**, 734-41 (2006).
174. Ruiz, M. J., Cameán, A. M., Moreno, I. M. & Picó, Y. Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1073**, 257-262 (2005).
175. Spooof, L., Neffling, M. & Meriluoto, J. Fast separation of microcystins and nodularins on narrow-bore reversed-phase columns coupled to a conventional HPLC system. *Toxicon* **55**, 954-64 (2010).
176. Neffling, M.-R., Spooof, L. & Meriluoto, J. Rapid LC - MS detection of cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularins — Comparison of columns. *Analytica Chimica Acta* **653**, 234-241 (2009).
177. Spooof, L., Karlsson, K. & Meriluoto, J. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C18 and amide C16 sorbents. *Journal of chromatography. A* **909**, 225-36 (2001).
178. Spooof, L. & Meriluoto, J. Rapid separation of microcystins and nodularin using a monolithic silica C18 column. *Journal of Chromatography A* **947**, 237-245 (2002).
179. Degueldre, M. *et al.* Diversity in sequences, post-translational modifications and expected pharmacological activities of toxins from four *Conus* species revealed by the combination of cutting-edge proteomics, transcriptomics and bioinformatics. *Toxicon* **130**, 116-125 (2017).
180. McDonald, P. D. *et al.* Topics in Liquid Chromatography - Part 1. Designing a Reversed-Phase Column for Polar Compound Retention (Waters White Paper). (2007).
181. Crommen, J. & Chiap, P. Cours DEA : La chromatographie Liquide à Haute Performance: aspects pratiques. Leçon 6 (2005).

182. Application note - Dionex: LC-MALDI MS Using Monolithic Capillary Columns. (2004).
183. Product specifications - Thermo Scientific - PepSwift and ProSwift Monolithic capillary columns. (2016).
184. Product Manual - Thermo Scientific - PepSwift and ProSwift Capillary Monolith Columns for Bioseparations. 1-35 (2015).
185. Harju, K. *et al.* Optimization of Sample Preparation for the Identification and Quantification of Saxitoxin in Proficiency Test Mussel Sample using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Toxins* **7**, 4868-4880 (2015).
186. Halme, M., Rapinoja, M.-L., Karjalainen, M. & Vanninen, P. Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B* **880**, 50-57 (2012).
187. Dellaversano, C., Eaglesham, G. & Quilliam, M. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1028**, 155-164 (2004).
188. Oehrle, S. a, Southwell, B. & Westrick, J. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon* **55**, 965-972 (2010).
189. Lara, Y. *et al.* B-BLOOMS2: A Belspo Project Concerning the Problem of Cyanobacterial Blooms in Belgian Surface Waters.
190. *Belspo: B-BLOOMS2 - Cyanobacterial blooms: toxicity, diversity, modelling and management.* (2011).
191. J.-P. Descy, S. Pirlot, G. Verniers, L. Viroux, Y. Lara, A. Wilmotte, W. V., P. Vanormelingen, J. Van Wichelen, I. Van Gremberghe, L. Triest, A. Peretyatko, E. E. & Codd, G. A. *Cyanobacterial blooms: toxicity, diversity, modelling and management "B-BLOOMS2". Final Report.* (2011).
192. Descy, J.-P. *et al.* Proliférations cyanobactériennes: Toxicité, Diversité, Modélisation et Gestion "B-BLOOMS 2". *Rapport Final Phase 1.* (2009).
193. Yuan, M., Namikoshi, M., Otsuki, A., Watanabe, M. F. & Rinehart, K. L. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: modulation of charge states and [M+H]<sup>+</sup> to [M+Na]<sup>+</sup> ratio. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **10**, 1138-1151 (1999).
194. Lo, C., Lin, J., Chen, W., Chen, C. & Chen, Y. Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry on Titania Nanotube Arrays. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **19**, 1014-1020 (2008).
195. Bortoli, S. & Volmer, D. A. Account: Characterization and Identification of Microcystins by Mass Spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* **20**, 1-19 (2014).
196. Harada, K. *et al.* Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chemical Research in Toxicology* **4**, 535-540 (1991).
197. Wood, S. A. *et al.* Widespread Distribution and Identification of Eight Novel Microcystins in Antarctic Cyanobacterial Mats. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 7243-7251 (2008).
198. Harada, K. *et al.* Isolation of two toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon* **29**, 479-489 (1991).

199. Sivonen, K. *et al.* Isolation and Characterization of A Variety of Microcystins from 7 Strains of the Cyanobacterial Genus *Anabaena*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2495-2500 (1992).
200. Kendrick, E. A Mass Scale Based on  $CH_2 = 14.0000$  for High Resolution Mass Spectrometry of Organic Compounds. *Analytical Chemistry* **35**, 2146-2154 (1963).
201. Chevalier, M. Thèse: Mise en place d'un workflow d'identification de microorganismes et de leurs métabolites secondaires d'origine non ribosomique par spectrométrie de masse. (Université de Lille, 2018).
202. Chang, J. *et al.* Ozonation degradation of microcystin-LR in aqueous solution: Intermediates, byproducts and pathways. *Water Research* **63**, 52-61 (2014).
203. Hoeger, S. J., Dietrich, D. R. & Hitzfeld, B. C. Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. *Environmental health perspectives* **110**, 1127-32 (2002).
204. Kull, T. P. J., Backlund, P. H., Karlsson, K. M. & Meriluoto, J. A. O. Oxidation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin-LR by Chlorine Dioxide: Reaction Kinetics, Characterization, and Toxicity of Reaction Products. *Environmental Science & Technology* **38**, 6025-6031 (2004).
205. Liu, I., Lawton, L. A., Cornish, B. & Robertson, P. K. J. Mechanistic and toxicity studies of the photocatalytic oxidation of microcystin-LR. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **148**, 349-354 (2002).
206. Liu, Y., Ren, J., Wang, X. & Fan, Z. Mechanism and Reaction Pathways for Microcystin-LR Degradation through UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Treatment. *PLOS ONE* **11**, e0156236 (2016).
207. Zhang, H. *et al.* Effect of oxidant demand on the release and degradation of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* during oxidation. *Chemosphere* **181**, 562-568 (2017).
208. Zong, W., Sun, F. & Sun, X. Oxidation by-products formation of microcystin-LR exposed to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Toward the generative mechanism and biological toxicity. *Water Research* **47**, 3211-3219 (2013).
209. Meriluoto, J., Spoof, L. & Codd, G. A. *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. (2017).
210. Sivonen, K. *et al.* Isolation and structures of five microcystins from a Russian *Microcystis aeruginosa* strain CALU 972. *Toxicon* **30**, 1481-1485 (1992).
211. Namikoshi, M. *et al.* Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom (Finland). *Toxicon* **30**, 1473-1479 (1992).
212. Namikoshi, M. *et al.* Structures of three new homotyrosine-containing microcystins and a new homophenylalanine variant from *Anabaena* sp. strain 66. *Chemical research in toxicology* **5**, 661-666 (1992).
213. Sano, T., Beattie, K. A., Codd, G. A. & Kaya, K. Two (Z)-dehydrobutyrine-containing microcystins from a hepatotoxic bloom of *Oscillatoria agardhii* from Soulseat Loch, Scotland. *Journal of Natural Products* **61**, 851-853 (1998).
214. Namikoshi, M. *et al.* Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. *The Journal of Organic Chemistry* **57**, 866-872 (1992).

215. Chou, T.-H. L. H.-N., Lee, T.-H. & Chou, H. Isolation and identification of seven microcystins from a cultured M.TN-2 strain of *Microcystis aeruginosa*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **41**, 197-202 (2000).
216. Bogialli, S. *et al.* Liquid chromatography-high resolution mass spectrometric methods for the surveillance monitoring of cyanotoxins in freshwaters. *Talanta* **170**, 322-330 (2017).
217. Qi, Y., Bortoli, S. & Volmer, D. A. Detailed Study of Cyanobacterial Microcystins Using High Performance Tandem Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **25**, 1253-1262 (2014).
218. Diehnelt, C. W., Dugan, N. R., Peterman, S. M. & Budde, W. L. Identification of Microcystin Toxins from a Strain of *Microcystis aeruginosa* by Liquid Chromatography Introduction into a Hybrid Linear Ion Trap-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **78**, 501-512 (2006).
219. del Campo, F. F. & Ouahid, Y. Identification of microcystins from three collection strains of *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Pollution* **158**, 2906-2914 (2010).
220. Ferranti, P. *et al.* A peptidomic approach for monitoring and characterising peptide cyanotoxins produced in Italian lakes by matrix-assisted laser desorption/ionisation and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **25**, 1173-1183 (2011).
221. Tandeau de Marsac, N. & Houmard, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Letters* **104**, 119-189 (1993).
222. Adams, D. G. & Duggan, P. S. Tansley Review No. 107. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist* **144**, 3-33 (1999).
223. Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. in (De Boeck Université, 1995).
224. Cyanobacteria sur <<http://cronodon.com/BioTech/Cyanobacteria.html>>
225. Stadnichuk, I. N., Krasilnikov, P. M. & Zlenko, D. V. Cyanobacterial phycobilisomes and phycobiliproteins. *Microbiology* **84**, 101-111 (2015).
226. Hopkins, W. *Chapitre 7 - Les photorécepteurs. Physiologie végétale* (De Boeck Université, 2003).
227. Phycobiline. *Chemgapedia* sur <<http://www.chemgapedia.de/vsengine/glossary/de/phycobiline.glos.html>>
228. Leverenz, R. L. *et al.* Photosynthesis. A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection. *Science* **348**, 1463-1466 (2015).
229. Shahidi, F. *et al.* Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews* **39**, 4067 (2010).
230. Chlorophyll a from spinach | Sigma-Aldrich sur <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c5753?lang=fr&region=BE>>
231. Photosynthesis - SBI - 4U Website sur <<http://sbi4u3.weebly.com/photosynthesis.html>>
232. Anderson, D. M., Andersen, P., Bricelj, V. M., Cullen, J. J. & Rensel, J. J. E. *Report: Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters*. (2001).

233. An, J. & Carmichael, W. W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicol* **32**, 1495-1507 (1994).
234. McAvoy, T. & Nairn, A. C. in *Current Protocols in Molecular Biology* **92**, 18.18.1-18.18.11 (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
235. Annala, A. *et al.* Solution structure of nodularin. An inhibitor of serine/threonine-specific protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 16695-702 (1996).
236. Oliveira, A. C. P., Magalhães, V. F., Soares, R. M. & Azevedo, S. M. F. O. Influence of drinking water composition on quantitation and biological activity of dissolved microcystin (cyanotoxin). *Environmental toxicology* **20**, 126-30 (2005).
237. Tan, F., Saucedo, N. M., Ramnani, P. & Mulchandani, A. Label-Free Electrical Immunosensor for Highly Sensitive and Specific Detection of Microcystin-LR in Water Samples. *Environmental Science and Technology* **49**, 9256-9263 (2015).
238. Boster Bio Antibody and Elisa Experts sur  
<<https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>>
239. Zeck, A., Eikenberg, A., Weller, M. G. & Niessner, R. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine]microcystins. *Analytica Chimica Acta* **441**, 1-13 (2001).
240. Nagata, S. *et al.* Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. *Natural toxins* **3**, 78-86 (1995).
241. Humpage, A. R., Froscio, S. M., Lau, H.-M., Murphy, D. & Blackbeard, J. Evaluation of the Abraxis Strip Test for Microcystins™ for use with wastewater effluent and reservoir water. *Water research* **46**, 1556-65 (2012).
242. McElhiney, J. & Lawton, L. A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology* **203**, 219-230 (2005).
243. Roy-Lachapelle, A., Fayad, P. B., Sinotte, M., Deblois, C. & Sauvé, S. Total microcystins analysis in water using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **820**, 76-83 (2014).
244. Wild, D. *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. Chapter 1.2: Immunoassay for Beginners* (Elsevier Ltd, 2013).
245. Kavanagh, O., Elliott, C. T. & Campbell, K. Progress in the development of immunoanalytical methods incorporating recombinant antibodies to small molecular weight biotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 2749-2770 (2015).
246. Frenzel, A., Hust, M. & Schirrmann, T. Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in immunology* **4**, 217 (2013).
247. Gaskell, S. J. SPECIAL FEATURE: Electrospray: Principles and Practice. *Practice* **32**, 677-688 (1997).
248. Rouessac, F. *et al.* *Analyse chimique*. (Dunod, 2009).
249. Spectrophotomètres monofaisceau - Cas d'un appareil à barette de diodes sur  
<[http://www.perrin33.com/biochanalys/photons/spectros\\_2.php](http://www.perrin33.com/biochanalys/photons/spectros_2.php)>
250. Kyritsis, D. C., Coriton, B., Faure, F., Roychoudhury, S. & Gomez, A.

- Optimization of a catalytic combustor using electrosprayed liquid hydrocarbons for mesoscale power generation. *Combustion and Flame* **139**, 77-89 (2004).
251. El-Aneed, A., Cohen, A. & Banoub, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews* **44**, 210-230 (2009).
  252. Herbert, C. G. & Johnstone, R. A. W. *Mass Spectrometry Basics - Chapter 10. Mass Spectrometry Basics* (CRC Press, 2003).
  253. Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics* **64**, 2287 (1976).
  254. Kebarle, P. & Peschke, M. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta* **406**, 11-35 (2000).
  255. Mehmood, S., Allison, T. M. & Robinson, C. V. Mass Spectrometry of Protein Complexes: From Origins to Applications. *Annual Review of Physical Chemistry* **66**, 453-474 (2015).
  256. Wilm, M. Principles of electrospray ionization. *Molecular & cellular proteomics* **10**, M111.009407 (2011).
  257. Dole, M. *et al.* Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* **49**, 2240 (1968).
  258. Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A. D. & Vahidi, S. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry* **85**, 2-9 (2013).
  259. Kebarle, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 804-817 (2000).
  260. Ahadi, E. & Konermann, L. Modeling the Behavior of Coarse-Grained Polymer Chains in Charged Water Droplets: Implications for the Mechanism of Electrospray Ionization. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 104-112 (2012).
  261. Konermann, L., Rodriguez, A. D. & Liu, J. On the formation of highly charged gaseous ions from unfolded proteins by electrospray ionization. *Analytical chemistry* **84**, 6798-804 (2012).
  262. Wilm, M. & Mann, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Analytical chemistry* **68**, 1-8 (1996).
  263. Juraschek, R., Dülcks, T. & Karas, M. Nanoelectrospray—more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **10**, 300-308 (1999).
  264. El-Faramawy, A., Siu, K. W. M. & Thomson, B. A. Efficiency of Nano-Electrospray Ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **16**, 1702-1707 (2005).
  265. Knochenmuss, R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* **131**, 966-986 (2006).
  266. Setz, P. D. & Knochenmuss, R. Exciton mobility and trapping in a MALDI matrix. *The journal of physical chemistry. A* **109**, 4030-7 (2005).
  267. Knochenmuss, R. Photoionization Pathways and Free Electrons in UV-MALDI. *Analytical Chemistry* **76**, 3179-3184 (2004).

268. Knochenmuss, R. A bipolar rate equation model of MALDI primary and secondary ionization processes, with application to positive/negative analyte ion ratios and suppression effects. *International Journal of Mass Spectrometry* **285**, 105-113 (2009).
269. Zenobi, R. & Knochenmuss, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **17**, 337-366 (1998).
270. Karas, M. & Krüger, R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chemical reviews* **103**, 427-40 (2003).
271. Karas, M., Glückmann, M. & Schäfer, J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 1-12 (2000).
272. Krüger, R. & Karas, M. Formation and fate of ion pairs during MALDI analysis: anion adduct generation as an indicative tool to determine ionization processes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **13**, 1218-1226 (2002).
273. Knochenmuss, R. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including analyte ion generation. *Analytical Chemistry* **75**, 2199-2207 (2003).
274. Harrison, A. G. The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **16**, 201-217 (1997).
275. Wang, B. H., Dreisewerd, K., Bahr, U., Karas, M. & Hillenkamp, F. Gas-phase cationization and protonation of neutrals generated by matrix-assisted laser desorption. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **4**, 393-398 (1993).
276. McCarley, T. D., McCarley, R. L. & Limbach, P. A. Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **70**, 4376-4379 (1998).
277. Vasil'ev, Y. V *et al.* Electron Transfer Reactivity in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI): Ionization Energy, Electron Affinity and Performance of the DCTB Matrix within the Thermochemical Framework. *The Journal of Physical Chemistry A* **110**, 5967-72 (2006).
278. Lidgard, R. & Duncan, M. W. Utility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the analysis of low molecular weight compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **9**, 128-132 (1995).
279. Jaskolla, T. W. & Karas, M. Compelling evidence for Lucky Survivor and gas phase protonation: the unified MALDI analyte protonation mechanism. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **22**, 976-88 (2011).
280. Instructions for Use: Bruker Guide to MALDI Sample Preparation - Revision E. (2015).
281. Rusconi, F. & Schmitter, J. M. Préparation des échantillons en vue d'une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. *Analisis Magazine* **26**, 13-17 (1998).
282. Vorm, O., Roepstorff, P. & Mann, M. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Analytical Chemistry* **66**, 3281-3287 (1994).
283. Spengler, B., Kirsch, D., Kaufmann, R. & Cotter, R. J. Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry.

- Rapid Communications in Mass Spectrometry* **5**, 198-202 (1991).
284. Spengler, B., Kirsch, D. & Kaufmann, R. Fundamental aspects of postsource decay in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. 1. Residual gas effects. *The Journal of Physical Chemistry* **96**, 9678-9684 (1992).
285. Bruker Daltonics - Presentation: Training course solariX and solariXcontrol. (2009).
286. Gross, J. H. *Mass Spectrometry - A Textbook*. (Springer, 2011).
287. *Bruker Daltonics Solarix User Manual - Revision 3*. (2011).
288. Biemann, K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biological Mass Spectrometry* **16**, 99-111 (1988).
289. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry* **11**, 601 (1984).
290. Paizs, B. & Suhai, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **24**, 508-548 (2005).
291. McLuckey, S. A. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **3**, 599-614 (1992).
292. *Thermo Fisher Q Exactive Operating Manual, Rev. C*. (2012).
293. Thermo Fischer Scientific Website sur <<https://www.thermofisher.com/be>>
294. Hardouin, J. Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* **26**, 672-82 (2007).
295. Spengler, B. Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules. *Journal of Mass Spectrometry* **32**, 1019-1036 (1997).
296. Fournier, I. *et al.* Post-source decay time-of-flight study of fragmentation mechanisms of protonated synthetic polymers under matrix-assisted laser desorption/ionization conditions. *Rapid communications in mass spectrometry* **16**, 696-704 (2002).
297. Rousecor, J. C. *et al.* A comparison of the peptide fragmentation obtained from a reflector matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight and a tandem four sector mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **6**, 822-835 (1995).
298. Debois, D. *et al.* MALDI in-source decay, from sequencing to imaging. *Topics in current chemistry* **331**, 117-41 (2013).
299. Chaurand, P., Luetzenkirchen, F. & Spengler, B. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **10**, 91-103 (1999).
300. Brodbelt, J. S. *et al.* Photodissociation mass spectrometry: new tools for characterization of biological molecules. *Chemical Society Reviews* **43**, 2757 (2014).
301. Eyler, J. R. Infrared multiple photon dissociation spectroscopy of ions in Penning traps. *Mass spectrometry reviews* **28**, 448-67 (2009).
302. Takayama, M. N-Ca bond cleavage of the peptide backbone via hydrogen

- abstraction. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **12**, 1044-1049 (2001).
303. Demeure, K., Gabelica, V. & De Pauw, E. A. New advances in the understanding of the in-source decay fragmentation of peptides in MALDI-TOF-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **21**, 1906-17 (2010).
304. Asakawa, D., Calligaris, D., Smargiasso, N. & De Pauw, E. Ultraviolet laser induced hydrogen transfer reaction: study of the first step of MALDI in-source decay mass spectrometry. *The Journal of Physical Chemistry B* **117**, 2321-7 (2013).



## **ANNEXES**



## LISTE DES FIGURES

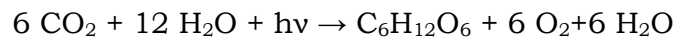
Figure 1 : Schéma d'une cyanobactérie (223) .....	217
Figure 2 : Représentation schématique d'un phycobilisome (adapté de 224) .....	218
Figure 3 : Structure chimique de la phycocyanine constituée de la partie tétrapyrrolique (phycocyanobiline) et de l'apoprotéine (adapté de 227) .....	218
Figure 4 : Structure chimique générale de pigments caroténoïdes (adapté de 229) .....	220
Figure 5: Structure chimique de la chlorophylle a (adapté de 230 ) .....	220
Figure 6 : Spectre d'absorption de la lumière au sein de cyanobactéries (adapté de la référence 231) .....	221
Figure 7 : Principaux modes d'utilisation de la technique ELISA (238) .....	224
Figure 8 : Plaque ELISA après révélation par le substrat et dispositif de lecture, par colorimétrie.....	224
Figure 9 : Variation du pouvoir éluant de solvants de différentes polarités en phase normale et inverse .....	226
Figure 10 : Principe du détecteur à barrette de diodes (adapté de 248 et 249).....	228
Figure 11 : Photographie de l'électrospray (250) .....	229
Figure 12 : Mécanisme de formation de l'électrospray (adapté de la référence 86).....	230
Figure 13 : Représentation schématique du modèle de l'évaporation ionique d'Iribane et Thomson (a), du modèle des résidus chargés de Dole (b) et du modèle d'éjection de chaîne (adapté de 258).....	231
Figure 14 : Source électrospray conventionnelle (adapté de la référence 252).....	232
Figure 15 : Schéma d'une source Z-spray (adapté de la référence 252). .....	233
Figure 16 : Schéma illustrant le processus d'excitation et de mise en commun de l'énergie lors de l'étape d'ionisation primaire (adapté de la référence 266) .....	235
Figure 17 : Illustration schématique du mécanisme de formation d'ions "lucky survivors" (adapté de la référence 265 ).....	236
Figure 18 : Schéma d'un analyseur à temps de vol en mode linéaire et en mode réflectron .....	239
Figure 19 : Schéma du TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics) <sup>92</sup> .....	240
Figure 20 : Mouvement global d'un ion au sein de la cellule ICR (adapté de 285) ..	242
Figure 21 : Exemple de transformée de Fourier appliquée sur le FID d'un peptide (Bombésine) - adapté de 285).....	244
Figure 22 : Obtention d'un spectre de masse par FT-ICR (adapté de la référence 86) .....	245
Figure 23 : Représentation schématique du FT-ICR Bruker Solarix 9.4T .....	245

Figure 24 : Schéma de fonctionnement de l'Orbitrap et de la C-Trap (adapté de <sup>100</sup> ) .....	246
Figure 25 : Schéma de principe du fonctionnement du détecteur MCP (adapté de <sup>287</sup> ) .....	249
Figure 26 : Nomenclature de Roepstorff et Biemann pour la fragmentation au sein de la chaîne peptidique.....	250
Figure 27 : Fragmentation d'ions précurseurs dans l'Orbitrap (adapté de <sup>293</sup> ) .....	253
Figure 28 : Schéma de fonctionnement du LIFT™ (MS/MS) dans l'analyseur à temps de vol Ultraflex II (Bruker Daltonics) - adapté de <sup>287</sup> .....	256
Figure 29 : Représentation schématique du mode de fonctionnement de l'IRMPD ( <sup>301</sup> ) .....	258
Figure 30 : Modèle de Takayama pour la formation d'ions c- et z- en ISD ( <sup>302</sup> ).....	262

# 1. ANNEXE I : BIOLOGIE DES CYANOBACTÉRIES

## 1.1 Origine et propriétés biochimiques et photochimiques

Les cyanobactéries sont des organismes procaryotes apparues il y a au moins 2,5 milliards d'années<sup>2</sup>. Ce sont des bactéries gram négatif et elles sont phototrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent la lumière comme source d'énergie via la photosynthèse. Ce processus de synthèse de composés organiques, au départ de dioxyde de carbone et d'eau, en présence de lumière peut être décrit par l'équation globale suivante<sup>2,221,222</sup> :



Lorsque la lumière rencontre la matière, celle-ci peut la réfléchir, la transmettre ou l'absorber. Les substances qui absorbent la lumière visible s'appellent des pigments. Les végétaux peuvent posséder trois types de pigments photosynthétiques, à savoir les chlorophylles et les caroténoïdes, présents chez tous les végétaux autotrophes au carbone, et les phycobilines, présentes exclusivement chez les cyanobactéries et certaines algues.

Les cyanobactéries sont les organismes photosynthétiques primordiaux. Elles sont les précurseurs des chloroplastes et réalisent la photosynthèse au sein de macrocomplexes protéine-pigment uniques appelés les phycobilisomes (7000 – 15000 kDa) lesquels sont situés au sein des membranes de leurs thylakoïdes, ainsi qu'illustré sur la Figure 1.

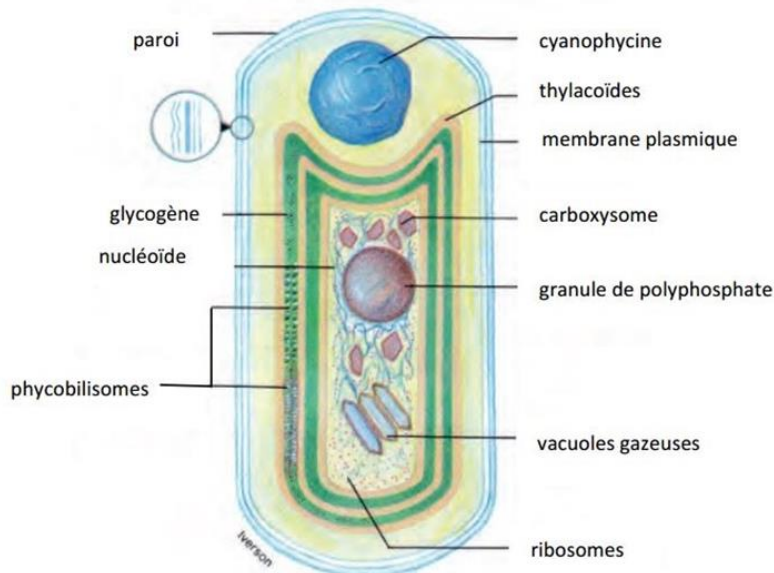


Figure 1 : Schéma d'une cyanobactérie (p23)

Au sein des cyanobactéries, les phycobilisomes s'organisent en structures hémidiscoïdales, attachées à la surface des thylakoïdes. Chaque phycobilisome est constitué de phycobiliprotéines pigmentées, formant une série de « bras » connectés au cœur du phycobilisome, ainsi qu'illustré de manière schématique dans la Figure 2.

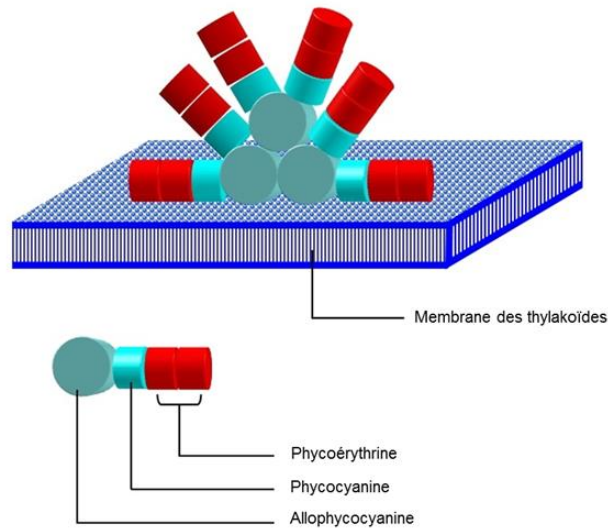


Figure 2 : Représentation schématique d'un phycobilisome (adapté de <sup>224</sup>)

Les chromophores de phycobiline, associés aux « bras » du phycobilisome sont le pigment bleu phycocyanine ( $A_{\max}$  620 nm), le pigment rouge phycoérythrine ( $A_{\max}$  560nm) et le cœur du phycobilisome est constitué du pigment allophycocyanine ( $A_{\max}$  650nm). Ces pigments déterminent le spectre d'absorption du phycobilisome. Tous les phycobilisomes contiennent les pigments phycocyanine et allophycocyanine mais seuls certains contiennent en plus la phycoérythrine<sup>15,221</sup>.

D'un point de vue chimique, les phycobilines sont des groupements tétrapyrroles non cycliques, liés à la protéine par une liaison covalente pour former la phycobiliprotéine<sup>225</sup>. Une protéine dans laquelle un pigment est une partie intégrale de la molécule est appelé une chromoprotéine. La partie tétrapyrrolique de la molécule est le chromophore et la partie protéique est appelée l'apoprotéine. La Figure 3 illustre la structure générale d'une phycobiliprotéine : la phycocyanine<sup>15,221,226</sup>. Les cyanobactéries lui doivent leur nom (cyan : bleu – phycée : algue) et elles sont d'ailleurs parfois appelées algues bleues en raison de la présence de ce pigment.

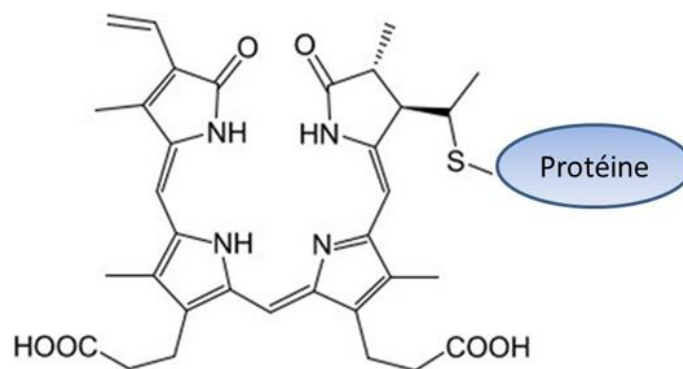


Figure 3 : Structure chimique de la phycocyanine constituée de la partie tétrapyrrolique (phycocyanobiline) et de l'apoprotéine (adapté de <sup>227</sup>)

Au sein des phycobilines, les seules différences sont à attribuer à la position des doubles liaisons dans la structure du chromophore. Ces modifications, bien que semblant mineures, ont un impact très important sur la configuration moléculaire de chaque structure, avec pour conséquence des propriétés spectroscopiques différentes et donc une large gamme de couleur. En effet, en ce qui concerne les cyanobactéries, cette gamme s'étend du vert olive au rouge en passant par le bleu<sup>15,221,226</sup>.

Les phycobilisomes agissent donc comme capteur de lumière, qu'ils transfèrent ensuite à la chlorophylle a, pigment participant directement aux réactions photochimiques de la photosynthèse, les autres pigments étant qualifiés d'accessoires. En effet, ayant des maxima d'absorption différents de la chlorophylle, ils captent la lumière et la transfèrent ensuite à la chlorophylle a ( $A_{\max(\text{bleu})}$  430 nm et  $A_{\max(\text{rouge})}$  660 nm).

Chez les cyanobactéries, les phycobilines absorbent dans le bleu et le vert<sup>15,226</sup>. Outre les phycobilines, les membranes des thylakoïdes contiennent également des pigments caroténoïdes, lesquels ont deux rôles principaux à savoir la captation-transfert d'énergie lumineuse vers la chlorophylle a, ainsi que la protection contre les dommages photooxydatifs au niveau du phycobilisome. En effet, l'excès de lumière peut mener à la destruction de la cellule via des phénomènes de production de radicaux libres par exemple. Afin de se protéger contre ce stress oxydatif, chez les cyanobactéries, le mécanisme de protection du stress oxydatif est encore sujet à discussion mais une publication très récente décrit un phénomène de transfert d'énergie thermique excédentaire du phycobilisome vers un complexe protéine-carotène dénommé *Orange Carotenoid Protein* (OCP), rendu possible par l'activation thermique de l'OCP. En absorbant la lumière, le caroténoïde effectue un changement de position et de conformation important. Il passe, au sein de la protéine OCP, d'une forme orange inactive à une forme rouge active, laquelle s'attache au phycobilisome et induit la dissipation thermique de l'excès d'énergie photochimique absorbée<sup>228</sup>.

La Figure 4 illustre la structure générale de quelques pigments caroténoïdes, généralement de couleur orange ou jaune, liposolubles et qui appartiennent à la famille des terpénoïdes.

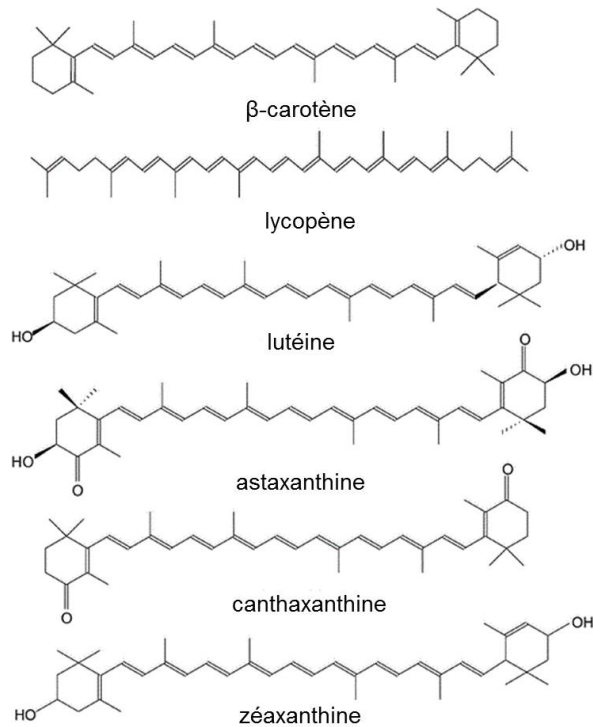


Figure 4 : Structure chimique générale de pigments caroténoïdes (adapté de <sup>229</sup>)

Les cyanobactéries contiennent, nous l'avons mentionné, la chlorophylle a. La Figure 5 en représente la structure chimique, constituée d'une tête formée d'un anneau porphyrinique entourant un atome de magnésium. Une queue hydrophobe s'attache à la porphyrine, ancrant le pigment dans la membrane des thylakoïdes<sup>2,221,222,226</sup>.

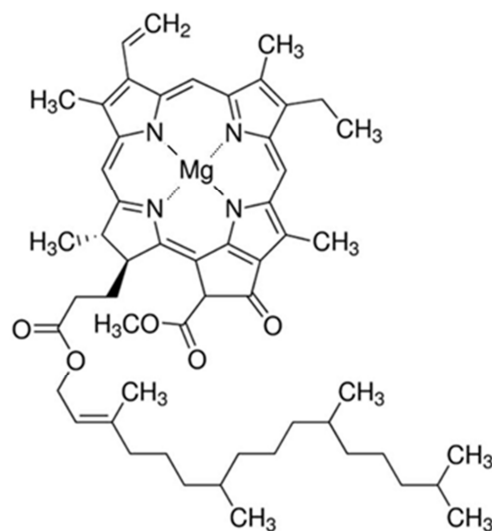


Figure 5: Structure chimique de la chlorophylle a (adapté de <sup>230</sup>)

Cette richesse en pigments permet aux cyanobactéries une couverture importante du spectre d'absorption de la lumière visible, ainsi qu'on peut le voir dans la Figure 6 présentant les maxima d'absorption de certains caroténoïdes, de la

chlorophylle a et des pigments du phycobilisome, les phycoerythrine et phycocyanines.

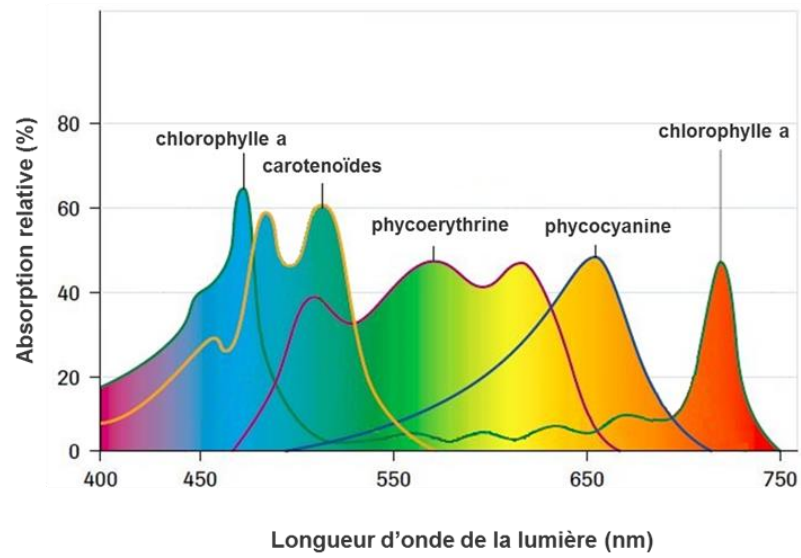


Figure 6 : Spectre d'absorption de la lumière au sein de cyanobactéries (adapté de la référence <sup>231</sup>)



## **2. ANNEXE II : MÉTHODES D'ANALYSE DE CYANOTOXINES**

### **2.1 Méthodes biologiques et biochimiques**

#### **2.1.1 *Mouse bioassay***

Cette méthode, implique l'exploitation d'animaux vivants – le plus fréquemment des souris.

Ces tests permettent d'établir la toxicité générale d'un échantillon et sont très rapides, nécessitent peu de matériel et permettent d'évaluer la toxicité d'espèces non identifiées par les techniques chimiques. Une solution physiologique, contenant l'échantillon toxique, est injectée, par voie intrapéritonéale, à une population de souris adultes et les effets de l'intoxication sont ensuite observés. Les principaux désavantages, outre l'aspect éthique, sont la sensibilité faible, la nécessité d'un personnel expérimenté, la standardisation rigoureuse des conditions de l'expérience, le manque total de spécificité, l'incapacité de la méthode à déterminer si les effets sont provoqués par la synergie ou l'antagonisme de plusieurs composés toxiques ainsi que l'apparition de faux positifs et faux négatifs<sup>48,232</sup>. Toutefois, à l'heure actuelle, les tests sur souris sont toujours approuvés par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists)<sup>232</sup>.

#### **2.1.2 *Protein phosphatase inhibition assay (PPIA)***

Les microcystines et nodularines ayant la propriété d'inhiber l'activité des enzymes phosphatases de type 1A et 2A (PP1A et PP2A), une méthode de détection de ces toxines par inhibition enzymatique a été développée<sup>233</sup>.

D'un point de vue biologique, les enzymes phosphatases agissent au niveau des groupements phosphates liés aux protéines lors de modifications post-traductionnelles. Ces enzymes ont le rôle de rompre la liaison protéine-phosphate par hydrolyse<sup>234</sup>. Leur inhibition entraîne de facto une hyperphosphorylation des protéines et c'est ce mécanisme qu'utilisent les hépatotoxines telles la microcystine et la nodularine chez leurs cibles.

Deux variantes du dosage PPIA ont principalement été développées au cours du temps, l'une étant un test colorimétrique et la seconde utilisant un substrat marqué isotopiquement. L'utilisation de radio-isotope étant contraignante, le test colorimétrique est actuellement le plus utilisé<sup>36,234,235</sup>.

La mise en œuvre du test est similaire à un dosage ELISA, avec utilisation d'une plaque 96-puits au sein desquels sont disposés les échantillons, additionnés d'un substrat. Le résultat est obtenu par mesure quantitative de la diminution de la concentration du composé actif en UV-Visible – par colorimétrie. Cette diminution est directement liée à la concentration en microcystine et nodularine puisqu'elles inhibent l'enzyme responsable de la libération du *p*-nitrophénol, produit de dégradation dont on mesure l'activité par colorimétrie<sup>36,48</sup>.

Le PPIA est une méthode de dosage efficace des microcystines et nodularines, avec des limites de détection se situant entre 0.6 et 6.6 µg/L les

rendant applicables à un échantillon non concentré. Il est aisément mis en œuvre et donne peu de faux positifs. Toutefois, la réponse des microcystines au test PPIA est très dépendante de la toxicité du variant<sup>233</sup>. En effet, certains variants ont parfois une réponse nulle au test PPIA, ce qui peut conduire à une sous-estimation importante de la concentration en microcystines, mais avec une corrélation directe avec une toxicité moindre<sup>233</sup>. Par ailleurs, il existe également des risques d'interférences avec d'autres composés inhibiteurs de la phosphatase, ainsi que des problèmes de quantification des microcystines liées à la présence d'ions tels le fer ou l'aluminium<sup>236</sup>. Enfin, par essence, le test n'est applicable qu'aux cyanotoxines inhibant la protéine phosphatase, c'est-à-dire les hépatotoxines telles que les microcystines et la nodularine.

C'est donc un outil de screening performant, mais les risques d'interférences et de sous-estimation de la concentration en certains variants de la microcystine ainsi que l'applicabilité restreinte aux microcystines et aux nodularines, l'empêchent de devenir un outil universel pour le screening des blooms de cyanotoxines<sup>36,48,235</sup>.

### **2.1.3 ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay**

La technique biologique la plus populaire pour le screening de cyanotoxines est, à ce jour, l'analyse via test ELISA – c'est-à-dire une technique d'immunodosage très spécifique, basée sur le schéma "clé-serrure" (enzyme-substrat). Le principe de base d'un test ELISA repose sur la reconnaissance, par un anticorps, d'un antigène directement ou indirectement marqué.

Il existe deux modes d'utilisation du dosage par ELISA : les tests détectant les anticorps ou les tests détectant les antigènes.

Le test le plus connu est le test ELISA permettant de détecter le virus du VIH. Celui-ci fonctionne sur base de la méthode indirecte. Ainsi qu'illustré dans la Figure 7 b), dans cette méthode, l'antigène est fixé sur un support solide - généralement il s'agit de plaques contenant 96 puits. L'échantillon à doser, contenant l'anticorps d'intérêt est ensuite ajouté au puits et il se lie à l'antigène. Après rinçage, un anticorps traceur est ajouté à la solution. L'anticorps traceur est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré. La réaction peut ainsi être quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène.

La méthode directe consiste au coating d'un antigène sur le support suivie par la fixation d'un anticorps directement conjugué à une enzyme Figure 7 a). La révélation s'effectue lors de l'addition du substrat<sup>237</sup>.

Un troisième mode de fonctionnement, très utilisé, est la méthode sandwich, laquelle utilise le même principe que la méthode indirecte à la différence du fait que l'antigène est fixé au support grâce à un anticorps de capture<sup>237</sup> (Figure 7 c).

Enfin, la dernière option est la méthode compétitive (Figure 7 d). Dans ce cas, l'anticorps primaire est incubé avec les antigènes de l'échantillon. Le complexe

anticorps-antigène est ensuite déposé sur le support solide lequel a préalablement été coâté par des antigènes spécifiques à l'échantillon. Une compétition s'opère ensuite en solution, seuls les anticorps n'étant pas liés aux antigènes de l'échantillon étant libres de se lier avec les antigènes coâtés sur le support. Plus la concentration d'antigènes dans l'échantillon est importante, plus la quantité d'anticorps libres sera faible pour se lier. Après rinçage, le substrat révélateur est additionné dans le puits et le signal résultant sera d'autant plus faible que la quantité d'antigène dans l'échantillon était importante. Cette réduction du signal est mesurable et quantifiable<sup>237,238</sup>.

La Figure 7 illustre les quatre principaux modes d'utilisation d'un test ELISA

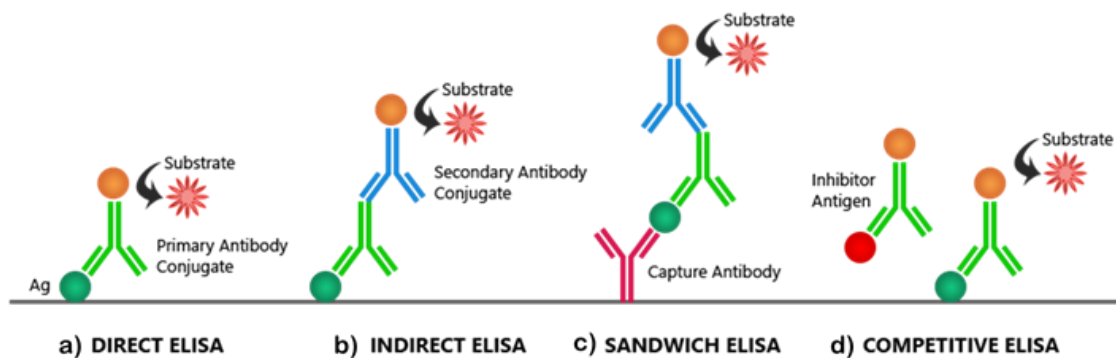


Figure 7 : Principaux modes d'utilisation de la technique ELISA (238)

En pratique, la plupart des tests ELISA sont effectués sur des plaques multipuits dont les puits sont coâtés par l'anticorps anti-microcystine (Figure 8). De nombreuses études ont été menées pour développer des anticorps anti-MC les plus spécifiques possibles. Ces travaux incluent l'utilisation d'anticorps polyclonaux, (reconnaissance de plusieurs épitopes)<sup>76,239</sup>, monoclonaux<sup>240</sup>, le couplage de plusieurs anticorps ou encore l'utilisation d'anticorps spécifiquement développés pour reconnaître l'acide aminé Adda, présent dans la grande majorité des microcystines et nodularines<sup>171</sup>.



Figure 8 : Plaque ELISA après révélation par le substrat et dispositif de lecture, par colorimétrie

Ce test ELISA est le plus répandu dans le cadre du monitoring des blooms car sa mise en œuvre est aisée et qu'elle existe au format commercial (Kit ELISA), en format prêt à l'emploi très facile. Elle est également récemment accessible sous forme de « strip », sous le même format qu'un test de grossesse, la rendant

particulièrement facile d'utilisation et transportable<sup>241</sup>. Les limites de détection de la méthode sont particulièrement basses, typiquement aux alentours de 0.1-1 µg/L pour les tests commerciaux, ce qui permet, sans traitement préalable de l'échantillon, la détection de microcystines au-dessous du seuil fixé par l'organisation mondiale pour la santé pour la microcystine LR (1 µg/L)<sup>36,242</sup>.

L'analyse via ELISA est une méthode sensible, mais la réponse qu'elle donne est une réponse par rapport au contenu total en microcystines/nodularines libres en solution. Un traitement supplémentaire de l'échantillon est indispensable pour doser le contenu total en toxines.

Un variant dont la polarité et la conformation spatiale sont très éloignées de la microcystine LR, ne répondra pas quantitativement à l'anticorps spécifique à la MC-LR<sup>36</sup>. La cross-réactivité des anticorps est fonction du variant de la microcystine, sans que ce soit nécessairement corrélé à la toxicité dudit variant<sup>48,243</sup>. L'explication de cette particularité est que la plupart des dosages ELISA sont basés sur l'utilisation d'anticorps ayant été produits par des animaux, contre un seul type de variant, généralement la microcystine LR<sup>242,244</sup>.

Une partie des inconvénients des tests ELISA classiques pourraient être contournés en exploitant les anticorps recombinants. Ce processus récent implique l'utilisation de la technique du phage display pour la synthèse d'anticorps, à la place de souris ou plus généralement d'animaux. Il s'agit d'une technique *in vitro*, dont le principe de base est l'utilisation du clonage de segments de gènes spécifiques d'anticorps pour élaborer une librairie d'anticorps constitués de différentes séquences d'acides aminés ayant chacun des spécificités différentes<sup>245,246</sup>. Outre le fait que cette technique ne nécessite pas l'utilisation d'animaux de laboratoire, et permet l'augmentation de la vitesse de production par rapport aux méthodes classiques *in vivo*, elle est très prometteuse en termes de spécificité<sup>242,245</sup>. Toutefois, elle ne pourra pas remplacer les méthodes physico-chimiques permettant l'identification absolue et la caractérisation de composés dont le suivi n'est pas initialement programmé. Enfin, elle n'est actuellement pas accessible aux toxines autres que les microcystines et nodularines.

En conclusion, lorsque la quantification et l'identification des composés responsables de la toxicité d'un bloom sont indispensables, afin de comprendre le profil toxique d'un bloom (les toxicités étant très différentes d'un variant à l'autre) ou de prendre rapidement les mesures sanitaires les plus appropriées, les méthodes physicochimiques telles la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détection UV ou par spectrométrie de masse par exemple, deviennent une solution de choix.

## 2.2 Méthodes physico-chimiques

### 2.2.1 HPLC

#### 2.2.1.1 Chromatographie liquide de partage et HPLC

La chromatographie est une technique de séparation de composés dont le principe repose sur des différences d'affinité des solutés pour deux phases, l'une mobile et l'autre stationnaire laquelle est généralement immobilisée au sein d'une colonne.

La séparation en chromatographie liquide à haute performance (ou pression - HPLC) est basée sur le partage des solutés entre une phase liquide mobile et une phase stationnaire, généralement constituée de silice greffée. En HPLC, la phase mobile est soumise à de très hautes pressions afin d'assurer un débit constant dans la colonne et d'éviter toute perte de charge.

Il existe deux types de systèmes chromatographiques, à savoir les chromatographies à polarité de phases NORMALE ou INVERSE. La première est constituée du couplage d'une phase stationnaire polaire avec une phase mobile apolaire. Cette technique est la première décrite et pour cette raison, elle porte le nom de chromatographie à polarité de phases NORMALE. Le second système, est constitué d'une phase stationnaire apolaire et d'une phase mobile polaire. Ce système est communément appelé « chromatographie en phase inverse ».

La technique en phase inverse, bien que développée postérieurement au procédé en phase normale, est actuellement la plus employée. En effet, lorsque la polarité des analytes à séparer est modérée, le système en phase inverse est le plus adéquat. Les solutés les plus hydrophiles sont élués rapidement, en raison de leur affinité accrue pour la phase mobile, tandis que les solutés moins hydrophiles sont retenus plus longtemps sur la colonne. De plus, la diversité de phases stationnaires disponibles en phase inverse est plus grande qu'en phase normale. Cette large possibilité de choix de phases stationnaires apolaires permet une optimisation plus aisée des conditions de séparation d'un mélange. Une illustration du pouvoir éluant de différents solvants en phase normale et inverse est présentée dans la Figure 9.

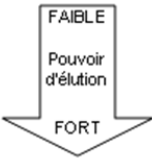

Polarité de phases normale	Solvants classés par polarité croissante	Polarité de phases inverse
	Hexane Toluène Dichlorométhane Ether Acétate d'éthyle Acétonitrile Méthanol Eau	

Figure 9 : Variation du pouvoir éluant de solvants de différentes polarités en phase normale et inverse

### 2.2.1.2 Gradient d'élution

La plupart des développements de méthode HPLC pour les cyanotoxines, recensés dans la littérature, l'ont été en mode isocratique, à savoir avec une phase mobile constituée d'un solvant pur ou d'un mélange de solvants de composition constante durant le temps de l'analyse.

Or, la séparation en HPLC dépend de nombreux paramètres et, notamment, de la composition de la phase mobile. Pour se placer dans des conditions optimales de pouvoir éluant, il est souvent nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants. Ces mélanges de solvant permettent d'affiner sensiblement le pouvoir éluant de la phase mobile.

Lorsque le nombre d'espèces moléculaires augmente, ou lorsque les différences entre congénères s'amenuisent, le mode isocratique devient insuffisant pour séparer efficacement les constituants d'un mélange. Afin d'accroître l'efficacité de séparation, la phase mobile peut être constituée d'un mélange de solvants dont la composition est variable au cours du temps – ce qui correspond à une étude en mode gradient.

Les gradients de composition présentent de nombreux avantages. En effet, l'emploi d'un gradient d'élution permet de résoudre divers obstacles tels la co-élution, c'est-à-dire l'élution simultanée de deux ou plusieurs composés de la colonne ou l'élution de composés très retenus sur la phase stationnaire par exemple.

Enfin, l'analyse par HPLC en tant que telle nécessite, outre la séparation, la détection efficace des composés au sortir de la colonne de chromatographie. Le choix du détecteur est important car il peut influencer les technologies mises en œuvre en amont, notamment dans le choix des solvants ou mélange de solvants d'élutions<sup>247</sup>.

### 2.2.1.3 Détecteur HPLC-DAD

Il existe plusieurs types de détecteurs pouvant être couplés avec une séparation chromatographique mais quels qu'ils soient, ils doivent réunir certains critères minimum. Ainsi, un détecteur doit donner, pour chaque composé détecté, une réponse proportionnelle à sa concentration instantanée, il doit être sensible, avoir peu de bruit de fond, être stable dans le temps et idéalement utilisable en gradient d'élution<sup>248</sup>.

Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : absorption, fluorescence, indice de réfraction ou sur leur rapport masse/charge. Dans le cadre de l'analyse de cyanotoxines par HPLC. La majorité des laboratoires utilisent un système spectrophotométrique : le détecteur à barrette de diode.

La détection UV est basée sur la loi de Beer-Lambert ( $A_\lambda = \epsilon_\lambda l C$ ) où  $A_\lambda$  est l'absorbance de l'éluant mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde  $\lambda$ .  $\epsilon_\lambda$  est le coefficient d'absorption molaire du (des) composés,  $C$  leur concentration et  $l$  la

longueur de la cellule. La phase mobile idéale ne doit pas (ou très peu) absorber le rayonnement lumineux. Ce type de détection implique que le composé ait la capacité d'absorber aux longueurs d'ondes de travail, à savoir UV-Visible. Dans le cas contraire, une étape de dérivatisation post-colonne des analytes est nécessaire avant leur détection.

La détection UV peut être soit monochromatique, soit pour les détecteurs les plus récents dont la barrette de diodes, polychromatiques. Ce détecteur étant le plus répandu dans le cadre de l'analyse de cyanotoxines, nous détaillons ci-après son principe de fonctionnement.

La cellule de mesure (cuve à circulation) est éclairée par une source de rayonnement UV/Visible polychromatique. Après passage dans la cellule, le rayonnement transmis par l'échantillon est dispersé par un réseau concave sur un détecteur constitué par une série de diodes (plusieurs centaines). Chaque diode permet de connaître l'absorbance moyenne sur une gamme de longueur d'ondes très étroite - de l'ordre du nanomètre. Le spectre obtenu est un spectre tridimensionnel représentant l'absorbance en fonction du temps et de la longueur d'onde (Figure 10).

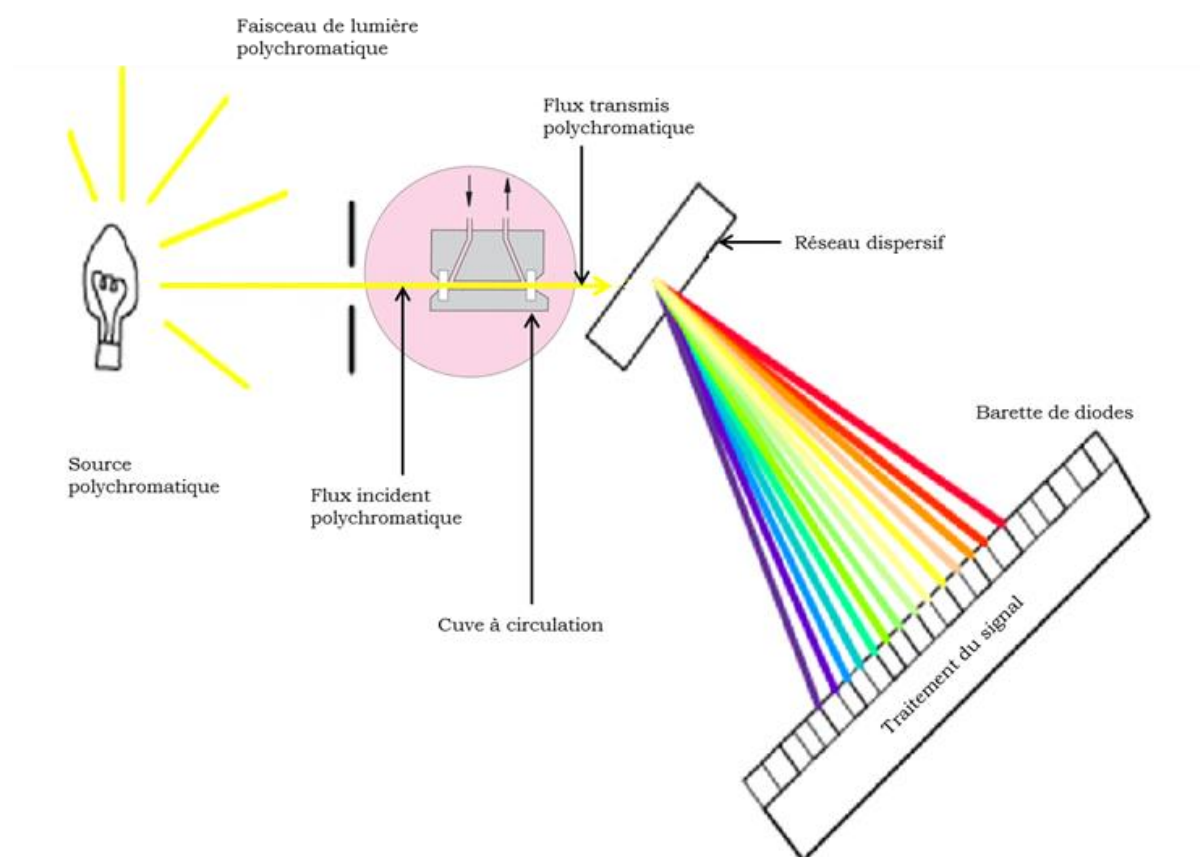


Figure 10 : Principe du détecteur à barrette de diodes (adapté de <sup>248</sup> et <sup>249</sup>)

## 2.2.2 Spectrométrie de masse

### 2.2.2.1 Sources d'ionisation : Electrospray

#### 2.2.2.1.1 Mécanisme de l'électrospray

Le mécanisme de fonctionnement d'une source ESI peut être décrit en trois étapes principales à savoir la formation d'un spray de gouttelettes chargées, la fission des gouttelettes et la pénétration dans l'analyseur.

##### Formation d'un spray par nébulisation de gouttelettes chargées

La solution d'analyse, au sortir de l'appareillage HPLC ou de la seringue d'injection, est introduite dans un capillaire métallique sur lequel est appliquée, à pression atmosphérique, une différence de potentiel de plusieurs kilovolts. En conséquence de cette différence de potentiel, un champ électrique intense apparaît entre le capillaire et la contre-électrode. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide située à l'extrémité du capillaire.

En mode positif, le capillaire est l'électrode positive. Dans ce cas, les anions de la solution sont soumis à l'attraction coulombienne et migrent vers le capillaire tandis que les cations s'accumulent à la surface du liquide. Celui-ci est ensuite attiré par la contre-électrode, formant un cône désigné sous le nom de cône de Taylor. Lorsque les forces de répulsion entre ions de même charge au sein du cône deviennent supérieures à la tension de surface du liquide, ce dernier est nébulisé sous forme de gouttelettes chargées, formant l'électrospray. Selon le mode d'ionisation, la surface des gouttes est chargée positivement ou négativement (Figure 11 et Figure 12).

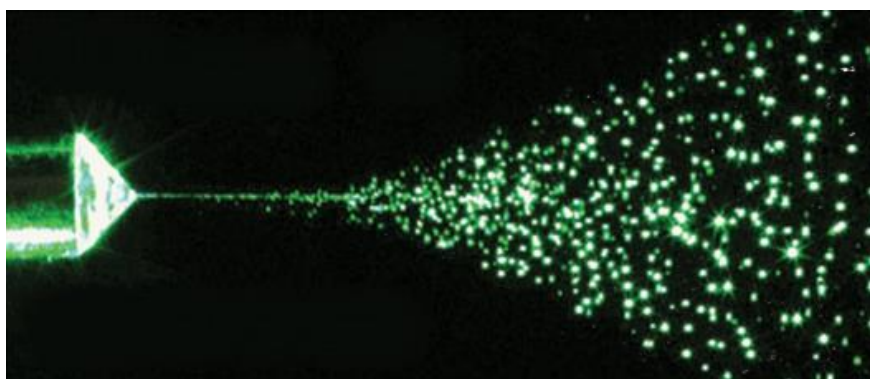


Figure 11 : Photographie de l'électrospray <sup>(250)</sup>

La dimension des gouttelettes dépend de nombreux paramètres dont l'intensité du potentiel appliqué, le débit de solution dans le capillaire ainsi que certaines propriétés intrinsèques au solvant utilisé<sup>247</sup>.

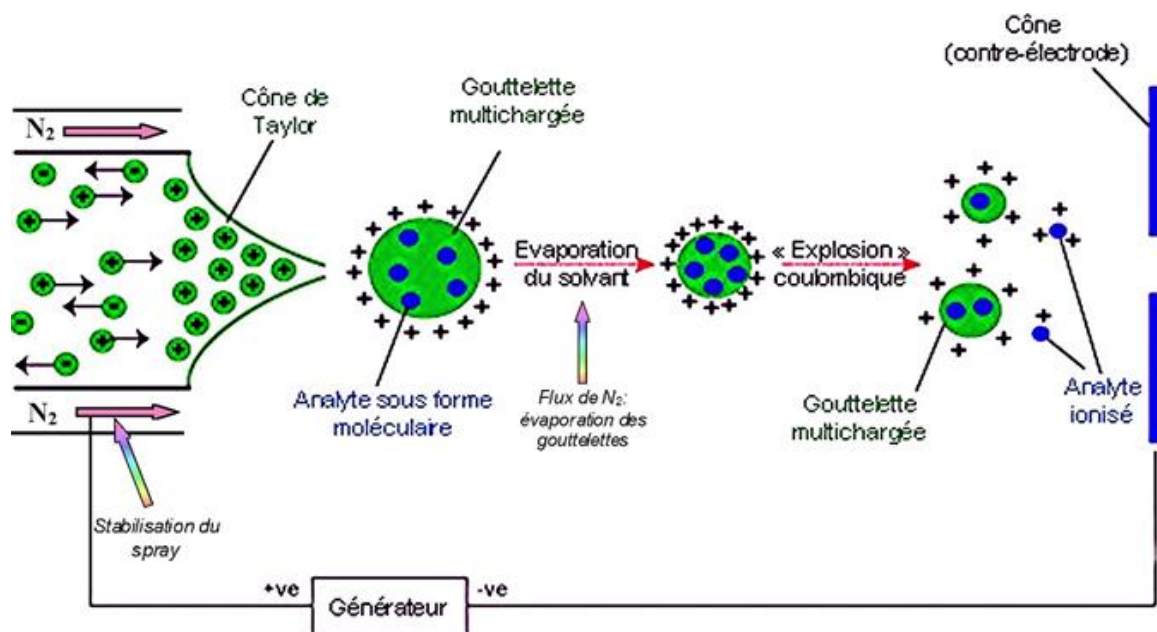


Figure 12 : Mécanisme de formation de l'électrospray (adapté de la référence <sup>86</sup>).

### Fission des gouttelettes

Le nuage de gouttelettes, une fois formé, traverse simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression en direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Sous l'influence de collisions avec un gaz de désolvatation et, par augmentation de la température, le solvant contenu dans les gouttes s'évapore progressivement, provoquant leur rétrécissement ainsi qu'une augmentation de la densité de charge à la surface de la goutte. Les forces coulombiennes répulsives augmentent donc jusqu'à atteindre le niveau des forces de cohésion des gouttelettes. Lorsque cette limite - appelée limite de Rayleigh - est atteinte, la goutte subit une fission, 'l'explosion' de Coulomb. Cette fission est inégale puisque les gouttelettes filles emportent 2 % de la masse et 15 % de la charge du parent<sup>251,252</sup>.

### Emission des ions désolvatés en phase gazeuse

Pour expliquer l'étape finale de formation de l'ion désolvaté en phase gazeuse, deux modèles ont été décrits, à savoir le modèle du résidu chargé (Charged Residu Model - CRM) et le modèle de l'évaporation d'ions (Ion Evaporation Model - IEM).

En 1976, la théorie de l'évaporation d'ion a été proposée par Iribarne et Thomson<sup>253</sup>. Ce modèle considère qu'après une succession d'évaporation-fission, lorsque le diamètre des gouttelettes tend vers 10nm ou moins, la densité de charge de la gouttelette est tellement importante que le champ électrostatique permet l'éjection d'un ion de la gouttelette. Ce modèle, illustré dans la Figure 13a pose donc l'hypothèse qu'un ion s'évapore directement de la surface de microgouttes de densité de charge très importante<sup>83,254-256</sup>.

Le modèle du résidu chargé a été proposé par l'équipe de Dole en 1968<sup>257</sup>. L'hypothèse est que la désolvatation complète d'un ion résulte de la succession d'étapes d'explosions coulombiennes menant à des gouttelettes de plus en plus petites, la dernière étape étant une gouttelette ne contenant plus qu'un seul ion. La Figure 13b illustre le modèle CRM de Dole.

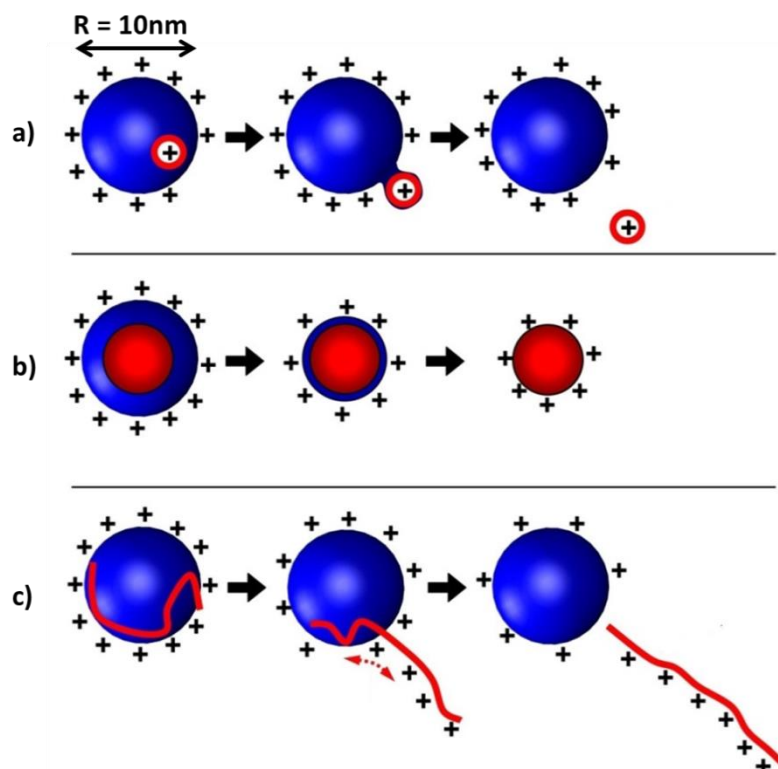


Figure 13 : Représentation schématique du modèle de l'évaporation ionique d'Iribane et Thomson (a), du modèle des résidus chargés de Dole (b) et du modèle d'éjection de chaîne (adapté de <sup>258</sup>)

Une revue de la littérature a permis de constater que ces deux modèles n'ont toujours pas été départagés à l'heure actuelle mais qu'ils seraient plutôt complémentaires<sup>255</sup>. En effet, ainsi que l'avait déjà souligné l'équipe de Kebarle dans une revue en 2000, la réalité des faits résulte le plus probablement de la combinaison de ces deux modèles majeurs. Notons toutefois que lorsqu'il s'agit de petites molécules, le modèle prédominant serait le modèle de l'évaporation d'ions tandis que les macromolécules seraient plus majoritairement ionisées selon le modèle du résidu chargé<sup>83,254,256,258,259</sup>. Enfin, un modèle, plus adapté à l'ionisation de protéines dénaturées, a également été proposé. Il s'agit du modèle d'éjection de chaîne (CEM – Chain Ejection Model), représenté sur la Figure 13c<sup>260,261</sup>.

Notons également que le processus n'ionise pas les analytes au même titre qu'une source à impact électronique. En effet, dans la plupart des cas, l'espèce ionique est formée simplement par une réaction acide-base, l'analyte est donc protoné ou déprotoné. Il peut également être ionisé par formation d'un adduit de sodium  $\text{Na}^+$  ou de potassium  $\text{K}^+$ , par exemple.

### Pénétration dans l'analyseur

Les ions formés sous pression atmosphérique sont ensuite canalisés par un ensemble d'échantillonneurs - les électrodes skimmer coniques - vers l'analyseur où règne un vide poussé, de l'ordre de  $10^{-5}$  mbar.

Ces analytes peuvent être mono- ou multichargés. Cette méthode de production d'ions est telle que l'énergie interne résiduelle retenue par les analytes est très faible, généralement insuffisante pour occasionner une fragmentation.

#### 2.2.2.1.2 La source Z-Spray

Dans une source ESI conventionnelle, le capillaire, l'axe du cône et l'orifice d'entrée dans le spectromètre sont alignés. Les ions produits ont une trajectoire linéaire depuis leur formation jusqu'à leur entrée dans l'analyseur.

Un inconvénient de cette technique est que, outre les analytes, de petites quantités de composés neutres pénètrent au travers du skimmer et s'accumulent graduellement pour finalement l'obstruer. Une source conventionnelle est représentée dans la Figure 14.

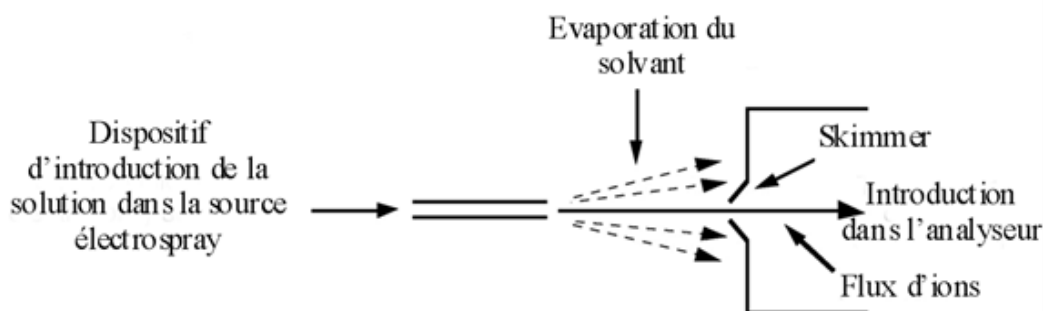


Figure 14 : Source électrospray conventionnelle (adapté de la référence <sup>252</sup>).

Dans une source Z-spray, les ions décrivent une trajectoire non plus linéaire, mais en forme de Z. Une fois le spray formé, les gouttelettes chargées pénètrent dans un premier skimmer situé à angle droit par rapport à la trajectoire initiale des ions. Cette déviation est permise par un gradient de pression régnant entre la source et l'analyseur. Après pénétration des ions dans le premier skimmer, leur trajectoire s'incurve en direction d'un second cône, sous l'effet d'un gradient de champ électrique. Les neutres ayant pénétré dans le premier orifice ne sont pas affectés par le gradient de champ, leur trajectoire reste dès lors linéaire et ils ne pénètrent pas dans l'analyseur<sup>252</sup>. Le fonctionnement de la source Z-spray est schématisé dans la Figure 15.

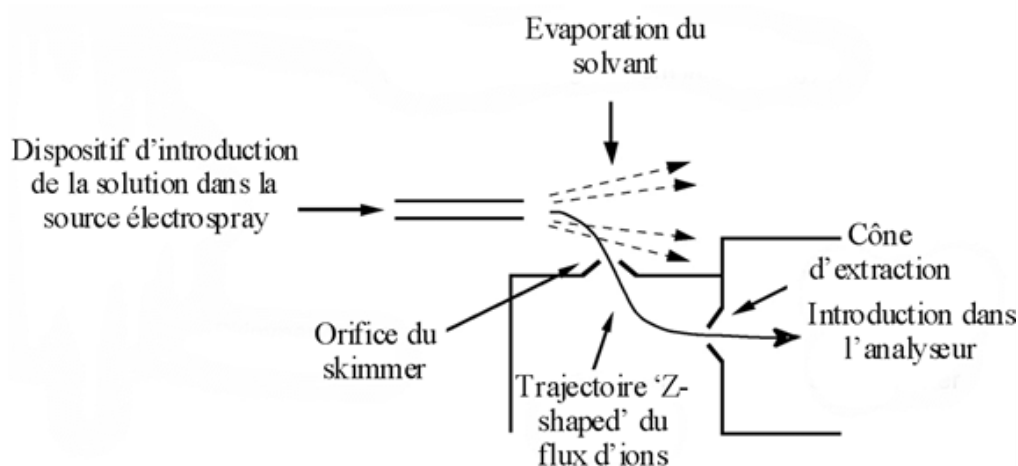


Figure 15 : Schéma d'une source Z-spray (adapté de la référence <sup>252</sup>).

### 2.2.2.1.3 Source nanospray

L'ESI étant de plus en plus utilisé pour l'analyse de macromolécules, biologiques principalement, le problème de la sensibilité et de la consommation substantielle d'échantillon se posait de plus en plus tant les échantillons biologiques sont parfois en quantités infimes. Pour contourner ce problème, l'utilisation d'une méthode moins consommatrice d'échantillon a été développée, et la miniaturisation de l'ESI, dans sa version nano (nanoESI) a participé à l'essor des domaines tels la protéomique, la métabolomique ou la génomique pour ne citer qu'eux.

Le principe, développé par Wilm et Mann dans les années 90<sup>262</sup> est qu'un faible volume d'échantillon (de l'ordre de 2 à 3  $\mu\text{L}$ ) est introduit dans un aiguillée métallisée dont le diamètre de sortie est de l'ordre de 1-2  $\mu\text{m}$ . Selon le même principe que l'électrospray classique, une différence de potentiel est appliquée entre l'aiguille et la contre-électrode située à quelques millimètres, dans le spectromètre de masse. Il résulte un spray dont le débit est de l'ordre de 20 nL/minute. Ce débit étant très faible en comparaison avec les débits mis en œuvre en ESI (aux alentours de 100  $\mu\text{L}$ /minute), le nanospray ne nécessite pas de gaz de nébulisation. En outre, les tensions sont beaucoup plus faibles (de l'ordre de la centaine de volts) qu'en électrospray classique (plusieurs milliers de volts)<sup>263</sup>.

Ce type de source présente de nombreux avantages, de par sa conception principalement. En effet, le faible diamètre de sortie du capillaire nanoESI conduit à la formation de gouttelettes beaucoup plus petites qu'en ESI. Ainsi, les sources nanoESI se révèlent bien plus sensibles que l'ESI – de l'ordre de 100 fois plus sensibles, dépendant de la nature de l'analyte<sup>262</sup>. D'autre part, le nano spray a prouvé une plus grande tolérance aux sels et composés interférents en solution. Enfin, la technique est nettement moins consommatrice d'échantillon que la source ESI classique, la rendant particulièrement intéressante lorsque les quantités d'échantillons sont limitées, ce qui est courant dans le cas de l'analyse de composés biologiques et biochimiques tels les protéines ou les oligonucléotides par

exemple<sup>263,264</sup>. D'autre part, la faible consommation d'échantillon et le débit très faible permettent de faire durer un échantillon de nombreuses minutes, et d'exploiter ce temps pour effectuer de nombreuses expériences directement mesurables par analyse de masse<sup>263,264</sup>.

Notons toutefois quelques aspects plus négatifs de la miniaturisation de l'ESI. Les aiguilles utilisées pour réaliser le spray en mode off-line sont fréquemment obturées et nécessitent une ouverture mécanique, peu reproductible. La difficulté de contrôler ce paramètre peut conduire à un manque de reproductibilité des spectres de masse puisque le diamètre initial des gouttelettes est un paramètre clé influençant le spectre de masse en lui-même, par la présence d'adduits ou l'état de charge des différentes espèces produites par évaporation de la gouttelette. Cependant, le mode on-line, exploitant des aiguilles métalliques plus fines mais ne nécessitant pas d'intervention manuelle, ne présente pas ce problème de reproductibilité.

En dépit de cet inconvénient du mode off-line, le gain de sensibilité couplé à la tolérance aux sels fait de la source nanospray une technique d'ionisation de premier choix dans le cadre de l'analyse de macromolécules biologiques.

#### 2.2.2.2 Sources d'ionisation : MALDI

Globalement, l'irradiation de cristaux de matrices contenant l'échantillon induit une augmentation rapide de la température des cristaux. Ce chauffage rapide conduit à des phénomènes de sublimation très localisés, à l'ablation de cette portion de la surface des cristaux suivie de son expansion en phase gazeuse, dans le vide poussé de la source<sup>87</sup>.

L'ionisation des analytes, entraînés par la matrice au sein de la plume MALDI peut se produire, sous vide, à n'importe quel moment durant ce processus cependant l'origine exacte des ions produits par MALDI n'est pas encore totalement expliquée à ce jour.

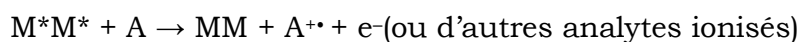
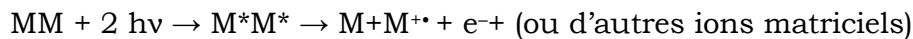
En effet, en dépit d'efforts considérables depuis la découverte du MALDI dans les années 1990, le mécanisme exact de l'ionisation MALDI est encore sujet à de nombreuses discussions au sein de la communauté scientifique. A ce jour, deux modèles sont proposés pour expliquer le phénomène<sup>265</sup>. Ces modèles, décrits brièvement dans ce paragraphe, sont le modèle de l'ionisation induite par le LASER c'est-à-dire le « two-step framework »<sup>266-269</sup>, et le modèle du « lucky survivor - reposant sur l'hypothèse de base d'un ion préformé<sup>270-272</sup>.

##### 2.2.2.2.1 Mécanisme MALDI : Modèle « Two step framework »

Les modèles actuels permettant la modélisation du mécanisme d'ionisation en MALDI ont, pour la grande majorité d'entre eux, convergé vers un même schéma pour l'ionisation à savoir une ionisation en deux étapes. Celle-ci est constituée d'une ionisation primaire et d'une ionisation secondaire – résultant de réactions ion-molécule dans la plume MALDI et produisant les ions qui atteignent le détecteur.

### 2.2.2.2.1.1 Ionisation primaire

L'ionisation primaire est l'étape de formation des premiers ions, au départ de molécules neutres contenues dans le dépôt matrice-analyte. Cette ionisation, constituée majoritairement d'ions matriciels étant donné le large excès de matrice dans le dépôt, est induite par l'impact LASER<sup>266-269</sup>. L'équation ci-dessous résume l'ionisation primaire (avec M la matrice et A l'analyte).



Les états excités des molécules de matrice jouent un rôle très important dans le procédé d'ionisation primaire et la théorie la plus probable serait celle d'une mise en commun de l'énergie (energy pooling) de deux ou plusieurs molécules de matrices dans un état excité, pour produire un ion radicalaire de matrice ou une molécule de matrice dans un état très excité<sup>265,266,269,273</sup>.

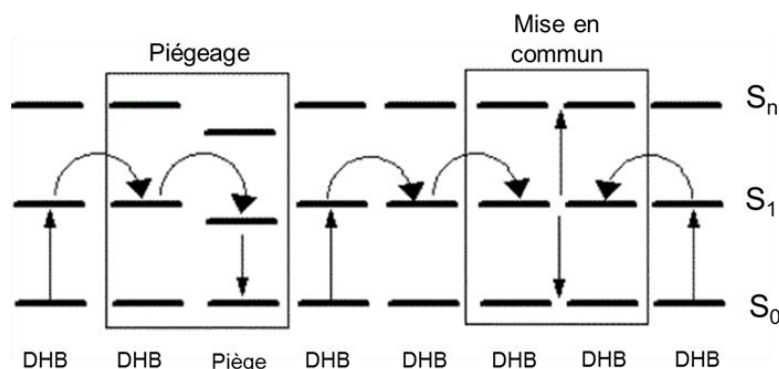


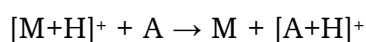
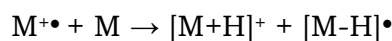
Figure 16 : Schéma illustrant le processus d'excitation et de mise en commun de l'énergie lors de l'étape d'ionisation primaire (adapté de la référence <sup>266</sup>)

### 2.2.2.2.1.2 Ionisation secondaire

Si le processus menant à l'ionisation primaire est encore controversé, l'ionisation secondaire est, quant à elle, mieux expliquée.

En effet, sur base de l'hypothèse que la plume MALDI est suffisamment dense et de taille (expansion) suffisante, les lois de la cinétique et de la thermodynamique classique s'appliquent.

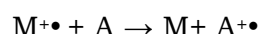
Différents processus d'ionisation sont possibles, leur probabilité relative étant directement liée au type d'analyte. Ainsi, les peptides et les protéines s'ionisent majoritairement via un processus de transfert de proton en phase gazeuse. Ce mécanisme peut être décomposé en deux étapes clés, à savoir l'étape de formation de l'adduit de matrice protoné (par transfert intermoléculaire) suivi du transfert du proton à l'analyte.



L'affinité protonique des protéines et peptides étant de l'ordre de 885-1025 kJ/mol, soit entre 15 et 30 % au-dessus de l'affinité protonique des matrices classiques (775 kJ/mol), le transfert de proton de la matrice vers l'analyte est généralement le mécanisme favorisé dans le cas de peptides ou protéines<sup>265,274</sup>.

Notons que le transfert de proton n'est pas le seul mécanisme entrant en jeu, puisque l'ionisation en MALDI peut également être réalisée via l'adduit de cation/anion (*cationisation*<sup>265,275</sup>) ou le *transfert d'électron*<sup>265,276-278</sup>.

Ainsi, l'ionisation de petits composés organiques peut être expliquée via un mécanisme de transfert d'électron entre la matrice et l'analyte. Ce processus d'ionisation secondaire est généralement très représenté dans le cas de molécules présentant un potentiel d'ionisation relativement faible<sup>265,276-278</sup>.



#### 2.2.2.2 Mécanisme MALDI : Modèle du Lucky survivor

Ce modèle, développé par Karas et son équipe, part de l'hypothèse que les ions sont préformés – existent dans l'échantillon avant l'ablation LASER - et que, lors de la désorption, après une série d'étapes de désolvatation/évaporation/neutralisation dans la plume MALDI, un faible pourcentage de « lucky survivors » atteint finalement le détecteur<sup>270-272,279</sup>.

Ce modèle, également décrit par le modèle des clusters, est résumé dans la Figure 17.

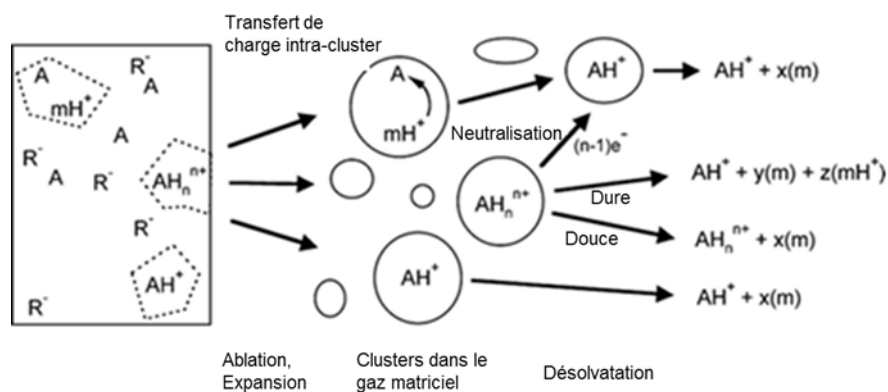


Figure 17 : Illustration schématique du mécanisme de formation d'ions "lucky survivors" (adapté de la référence <sup>265</sup> )

Dans ce schéma, m est la matrice, A l'analyte et R- les contre-ions. Dans ce modèle, les ions, préformés en solution « solide » (le dépôt cristallin) sont enrobés au sein de clusters désorbés de la surface du dépôt par l'impact LASER. Si certains clusters contiennent un large excès de charges positives, d'autres contiennent un large excès de charges négatives. Si l'analyte est déjà porteur d'une charge, par protonation par exemple, l'évaporation du cluster peut libérer l'ion. D'autres scénarii sont envisageables, telle la migration de la charge au sein d'un cluster, par exemple d'une molécule de matrice vers l'analyte. Le modèle considère également

les analytes multichargés, qui résulteraient de processus de désolvatation « dure » ou « douce », menant à la formation de différents ions libres en phase gazeuse. Enfin, de nombreux ions sont neutralisés par réaction avec un contre ion ou un électron, mais ce phénomène n'est toutefois pas total, menant à la libération d'ions « lucky survivors »<sup>270-272,279</sup>.

### 2.2.2.2.3 Préparation du dépôt MALDI

#### 2.2.2.2.3.1 Goutte séchée (Dried Droplet - DD)

Il s'agit de la méthode la plus aisée à mettre en œuvre : une solution acide (0,1 % acide trifluoroacétique, TFA par exemple) de matrice organique, de concentration connue, est mélangée à l'échantillon à analyser.

Il existe deux variantes de cette technique<sup>280</sup>. La première consiste à mélanger la matrice et l'analyte avant le dépôt sur la cible MALDI, entraînant une co-cristallisation plus complète.

Le mélange peut également être effectué sur la plaque en elle-même. Dans ce cas, il existe deux possibilités : soit les dépôts successifs de matrice et d'analyte sont suivis d'un mélange immédiat via le cône d'une pipette, soit la seconde couche (l'échantillon) est déposée après évaporation du solvant de la solution de matrice. Cette dernière méthode est la plus employée dans ce travail<sup>281,282</sup>. Les solvants les plus souvent utilisés sont l'acétonitrile et l'eau, en proportions dépendant de la solubilité de la matrice organique.

#### 2.2.2.2.3.2 Couche mince (Thin layer - TL)

La principale caractéristique de ce mode de préparation d'un dépôt réside dans le choix du solvant de la matrice, généralement très volatil comme l'acétone par exemple.

La méthode consiste ensuite à déposer une goutte de matrice, laquelle s'évaporant très rapidement donne naissance à une couche mince et homogène de cristaux. L'échantillon est ensuite déposé sur cette préparation, avec l'avantage de pouvoir réaliser un dépôt de très faible dimension<sup>281,282</sup>.

Notons qu'une variante de ce système peut également être mentionnée. Il s'agit de plaques prédéposées d'une couche mince de cristaux d'HCCA (Prespotted AnchorChip™, Bruker Daltonics, Bremen).

## 2.2.2.3 Spectromètres de masse

### 2.2.2.3.1 Analyseur à temps de vol

Le principe fondamental de l'analyseur à temps de vol repose sur la relation existant entre la masse et la vitesse des ions. Après ionisation, les analytes sont accélérés par un champ électrique créé par une différence de potentiel au sein de la

source. Cette étape est nommée étape d'extraction car les ions produits sont extraits depuis la source vers le tube de vol.

Les ions pénètrent ensuite dans une zone libre de champ, à savoir le tube de vol de longueur  $d$ . Les ions formés ont tous subi la même accélération, ils ont donc tous reçu la même énergie cinétique. Leurs masses étant différentes, leurs vitesses le sont également et ils atteindront le détecteur à des temps  $t_n$  différents, et fonction de leur masse.

Ainsi on a :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 \text{ et } v = \frac{d}{t_n}$$

Dans une zone libre de champ, l'énergie potentielle de l'ion est convertie en énergie cinétique. On a donc, pour  $q$  étant la charge de l'ion et  $U$  la tension d'accélération :

$$E_p = qU = E_c$$

Donc le temps de vol d'un ion peut s'exprimer par :

$$t_n = \frac{d}{\sqrt{2U}} \sqrt{\frac{m}{q}} = k \sqrt{\frac{m}{q}}$$

Ce type de spectromètre possède une gamme de masse extrêmement étendue, théoriquement infinie mais en pratique, en raison principalement de limitations liées aux détecteurs, les masses mesurées vont jusque 300 kDa. Par ailleurs, le pouvoir de transmission d'un analyseur à temps de vol est très élevé, conduisant à une grande sensibilité pouvant atteindre la centaine d'attomoles<sup>87</sup>.

Afin d'augmenter la résolution des spectres de masse obtenus en mode linéaire, un système, appelé réflectron, permet de focaliser les ions de même masse et de compenser les différences en termes d'énergie cinétique par effet d'un champ électrostatique. Ce dispositif est constitué de grilles successives, produisant un champ électrostatique croissant et dont l'effet est de dévier les ions vers le détecteur. Le principe du système est d'augmenter la longueur du tube de vol et de compenser, par effet de focalisation, les différences d'énergie cinétique d'ions de même masse. Les ions les plus énergétiques pénètrent plus profondément dans le réflectron avant d'être déviés, tandis que les ions les moins énergétiques sont réfléchis plus tôt.

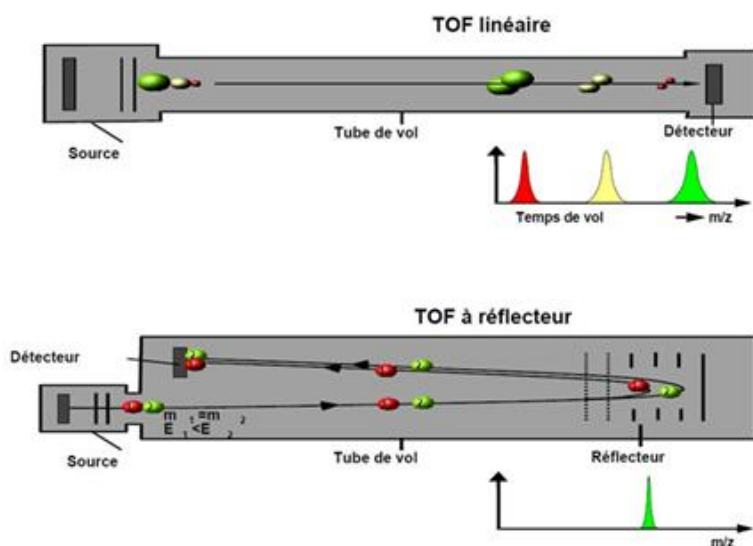


Figure 18 illustre schématiquement le mode de fonctionnement d'un analyseur à temps de vol, en mode linéaire et en mode réflectron.

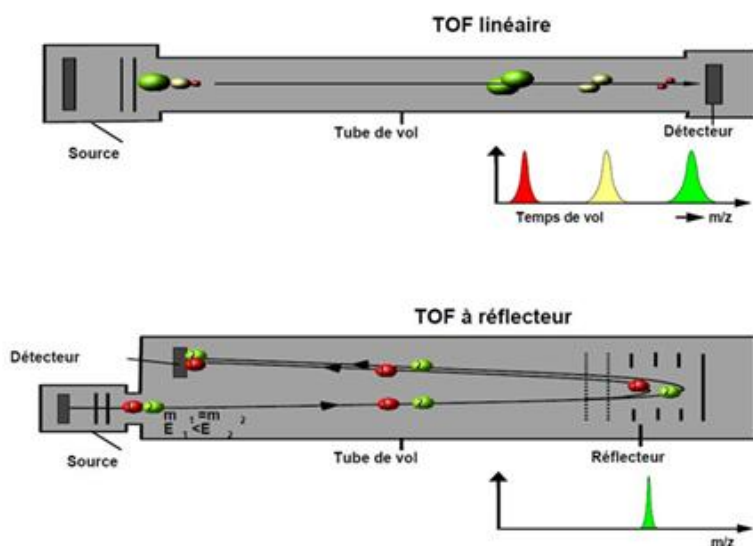


Figure 18 : Schéma d'un analyseur à temps de vol en mode linéaire et en mode réflectron

La masse d'un ion étant directement proportionnelle à son temps de vol, l'augmentation du temps de vol combinée à la réduction de la dispersion temporelle d'ions de même masse ( $\Delta t$ ) résulte en une augmentation du pouvoir de résolution du spectromètre. A noter que, bien que la résolution soit augmentée en mode réflectron, elle l'est au détriment de la sensibilité et de la gamme de masse. Le mode linéaire conserve donc toujours une grande utilité pour l'analyse de composés de masses supérieures à 10 kDa ou dans la recherche de traces.

L'introduction du mode réflectron a permis, en plus d'une amélioration de résolution de spectres de masse, l'observation de fragments obtenus par fragmentation métastable, dans la zone libre de champ. Les fragments présentant, par nature, un  $m/z$  différent de l'ion parent, ils sont résolus après passage au sein

du réflectron et peuvent être observés dans le spectre de masse. Le réflectron a donc permis une avancée majeure en rendant possible l'analyse de fragments produits après extraction de la source, c'est-à-dire des fragments « Post Source » (PSD), dont le mécanisme sera exposé en détail dans la partie consacrée à la spectrométrie de masse en tandem<sup>283,284</sup>.

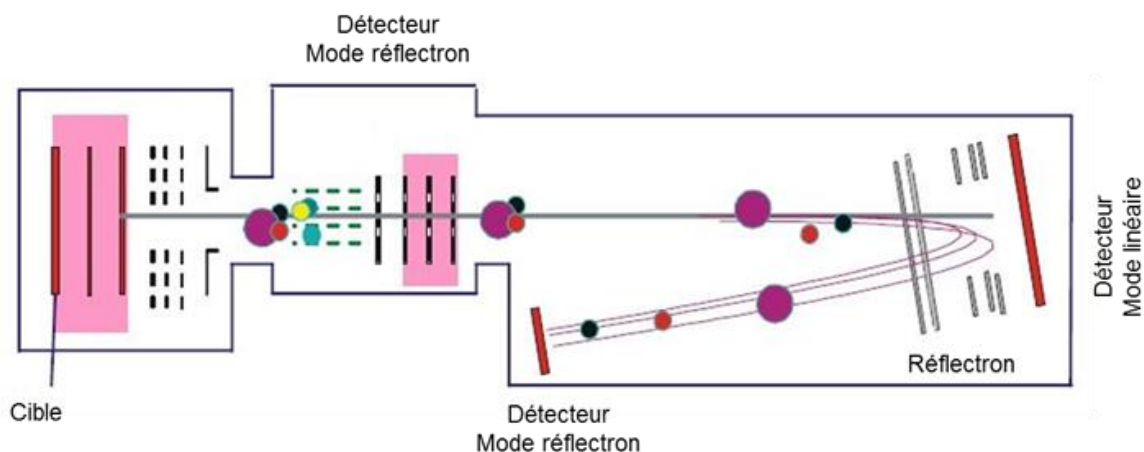


Figure 19 : Schéma du TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics)<sup>92</sup>

### 2.2.2.3.2 Analyseur à transformée de Fourier

#### 2.2.2.3.2.1 Principe de la FT-ICR

Un ion de charge  $q$  et de masse  $m$  pénétrant dans un champ magnétique  $B$  avec une vitesse  $v$  sera soumis aux forces  $F$  (centripète) et  $F'$  (centrifuge). Pour un champ magnétique  $B$  orienté selon l'axe  $z$ , la projection dans le plan  $xy$  de la trajectoire de l'ion correspond à un mouvement circulaire uniforme de rayon  $r$ . Les équations sont :

$$F = qvB$$

$$F' = \frac{mv^2}{r}$$

L'ion décrit une trajectoire circulaire de  $2\pi r$  dont la fréquence  $\nu$  est donnée par  $\nu = \frac{v}{2\pi r}$ .

La trajectoire de l'ion, hélicoïdale autour de l'axe parallèle au champ magnétique  $B$ , est stable lorsque  $F=F'$  c'est à dire<sup>81</sup>:

$$qvB = \frac{mv^2}{r}$$

La fréquence cyclotronique  $\omega_c$  est donc égale à<sup>81</sup> :

$$\omega_c = 2\pi \nu = \frac{v}{r} = \frac{q}{m} B$$

### 2.2.2.3.2.2 Piégeage des ions

En pratique, les ions, une fois formés, sont injectés dans une « cellule » de quelques centimètres de long, placée dans un champ magnétique très intense – typiquement de l'ordre de 3 à 9.4 Tesla.

La trajectoire hélicoïdale des ions, en l'absence de champ électrique, conduirait à leur éjection rapide de la cellule. Il est donc indispensable de les confiner au sein de celle-ci – via l'application d'un potentiel répulsif. C'est le principe de base d'un piège – dans le cas d'une cellule ICR, il s'agit du piège de Penning.

Le piège de Penning repose sur l'utilisation combinée d'un champ électrique quadripolaire constant avec un champ magnétique uniforme. En appliquant un potentiel répulsif (de l'ordre de 1V en moyenne) sur les deux plaques parallèles au plan de rotation de l'ion, ce dernier est confiné au centre de la cellule.

En effet, sous l'action de ce champ électrique, le mouvement hélicoïdal de l'ion le long de l'axe z se verrait additionné d'oscillations périodiques selon l'axe z. La fréquence de cette oscillation ou fréquence de piégeage  $\nu_t$  résulte des répulsions successives de l'ion par les plaques de piégeages et s'exprime par<sup>81</sup> :

$$\nu_t = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{2q V_{trap} \alpha}{ma^2}}$$

où  $V_{trap}$  est le potentiel de piégeage,  $a$  la distance entre les deux plaques et  $\alpha$  est un facteur géométrique dépendant du design du piège.

Le champ électrique ne pouvant pas être exactement parallèle au champ magnétique au niveau des limites des plaques, une force radiale opposée à l'action de la force de Lorentz s'exerce sur l'ion et elle s'exprime par :

$$F_r = qE_r = \frac{q V_{trap} \alpha}{a^2} r$$

Une composante radiale s'ajoute au mouvement des ions piégés : ce troisième mouvement, appelé le mouvement magnétron ( $\nu_m$ ) s'ajoute au mouvement cyclotronique et de piégeage. La fréquence du mouvement magnétron, où  $\nu_+$  est la fréquence cyclotronique réduite et  $\nu_-$  est la fréquence magnétron, s'exprime par :

$$\nu_+ = \frac{\nu_c}{2} + \sqrt{\left(\frac{\nu_c}{2}\right)^2 - \frac{\nu_t^2}{2}}$$

$$\nu_- = \frac{\nu_c}{2} - \sqrt{\left(\frac{\nu_c}{2}\right)^2 - \frac{\nu_t^2}{2}}$$

La Figure 20 illustre le mouvement global d'un ion au sein de la cellule ICR lorsqu'on tient compte de  $\nu_c$ ,  $\nu_+$ ,  $\nu_-$  et  $\nu_z$ .

Le mouvement magnétron est d'autant plus important que la masse de l'ion est grande (fréquences plus faibles). Le potentiel de piégeage joue un rôle très important dans le contrôle du mouvement magnétron. Ainsi, plus le potentiel de piégeage est faible, plus le mouvement magnétron sera négligeable.

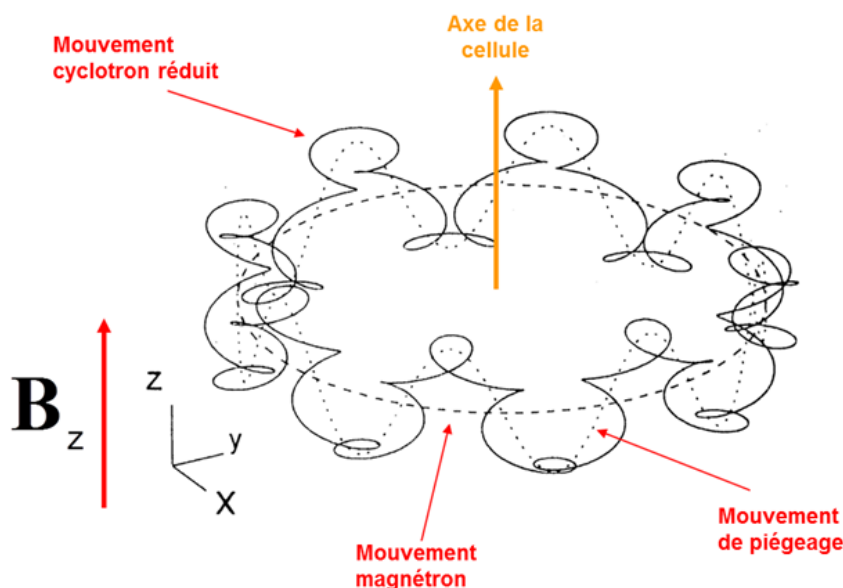


Figure 20 : Mouvement global d'un ion au sein de la cellule ICR (adapté de <sup>285</sup>)

### 2.2.2.3.2.3 Excitation des ions

Les ions, une fois piégés dans la cellule ICR, décrivent une même trajectoire mais, comme ils n'ont pas tous été produits au même moment ni avec la même énergie cinétique, ils n'ont pas tous la même position au même moment. On dit qu'ils ne sont pas en phase. Or, pour être détecté, le mouvement d'ions de même masse doit être cohérent, c'est à dire qu'ils doivent tous circuler en phase sur la même orbite.

Un moyen d'obtenir la cohérence de ce paquet d'ions est de les faire entrer en résonance, par application d'un pulse d'excitation, à la fréquence de résonance de l'ion d'intérêt. Ce pulse d'excitation a pour double effet de rendre le mouvement des ions cohérents et d'augmenter le rayon de leur orbite, les rendant détectables par les plaques détectrices.

La détection peut effectivement être effectuée pour autant que le rayon de la trajectoire du paquet d'ions soit suffisamment proche des parois de la cellule ICR, créant un courant induit mesurable par les plaques de détection.

Pour obtenir un spectre de masse, il est nécessaire d'exciter successivement tous les ions de la gamme de  $m/z$  considérée. A cette fin, l'utilisation d'un balayage de fréquence permet d'exciter un ensemble d'ions, de  $m/z$  différents sur une même orbite. Les ions peuvent donc être détectés, mais chacun ayant une fréquence cyclotronique propre, ils peuvent être distingués.

Il a été démontré que, quelle que soit la masse des ions, pour un pulse d'excitation  $V_0$  et un champ magnétique  $B_0$  et une durée de pulse  $T_{Exc}$ , le rayon de l'orbite décrite par les ions est indépendant de leur masse<sup>81</sup>. La relation s'exprime par :

$$r = \frac{V_0 T_{Exc}}{B_0}$$

Une excitation large bande aura donc pour effet de conduire l'ensemble des ions sur une même orbite, de rayon  $r$ , lequel doit être le plus proche possible des plaques de détection. Cette orbite ne doit toutefois pas pour autant atteindre le rayon de la cellule, au risque de voir les ions perturbés par l'inhomogénéité du champ électrique à proximité des plaques. Bien qu'ayant le même rayon, les fréquences d'ions de  $m/z$  différents seront également différentes, ce qui permettra leur séparation dans le spectre de masse.

A noter que lorsqu'une gamme de  $m/z$  particulière est ciblée par l'analyse, il existe un mode d'excitation très performant qui permet le calcul de l'onde d'excitation sur base de la gamme de  $m/z$ , par transformée de Fourier inverse. Il s'agit du balayage SWIFT (Stored-Waveform Inverse Fourier Transform).

#### 2.2.2.3.2.4 Détection des ions

La détection des ions s'effectue ensuite par mesure, sur les plaques de détection, du courant induit par la rotation cohérente des paquets d'ions. Ce courant est indépendant de la fréquence cyclotronique mais proportionnel à la charge totale du paquet d'ions.

Au cours du temps, d'autant plus rapidement que la pression à l'intérieur de la cellule ICR est importante, le courant induit verra son intensité diminuer au gré des collisions. Ce signal correspond à la superposition de sinusoides amorties de l'ensemble des ions présents dans la cellule. La représentation graphique correspond à un interférogramme (Free Induction Decay - FID), lequel, après application de la transformée de Fourier, permet l'obtention d'un spectre de masse. La résolution sera d'autant plus grande que la décroissance sera lente, c'est-à-dire que la pression résiduelle dans la cellule sera faible. Classiquement, les pressions permettant l'obtention de hautes résolutions sont de l'ordre de  $10^{-10}$  mbar<sup>286</sup>.

La Figure 21 illustre l'interférogramme obtenu par mesure du courant induit et, après transformée de Fourier de ce signal, le spectre de masse.

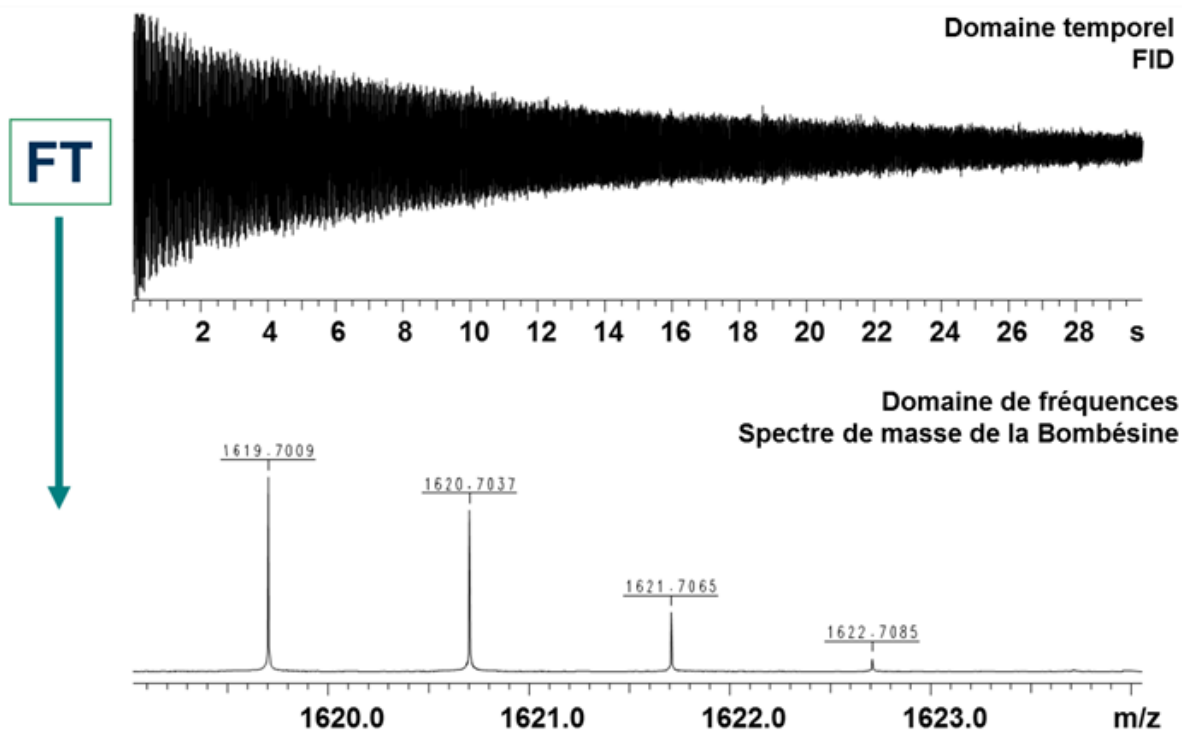


Figure 21 : Exemple de transformée de Fourier appliquée sur le FID d'un peptide (Bombésine) - adapté de <sup>285</sup>

#### 2.2.2.3.2.5 La cellule ICR

D'un point de vue conception, une cellule ICR peut être schématisée par 6 plaques formant une cellule rectangulaire. La Figure 22 illustre le principe d'obtention d'un spectre de masse au sein d'une cellule ICR. Au sein de cette cellule, chaque couple de plaque joue un rôle spécifique. Ainsi, deux plaques permettent aux ions de rester piégés au sein de la cellule, tandis que deux autres plaques, perpendiculaires aux premières, permettent l'excitation des ions en un paquet cohérent de rayons cyclotroniques approchant le rayon de la cellule ICR – c'est le phénomène de résonance cyclotronique. Enfin, les deux dernières plaques permettent la détection des paquets d'ions et, après application de la transformée de Fourier, l'obtention d'un spectre de masse.

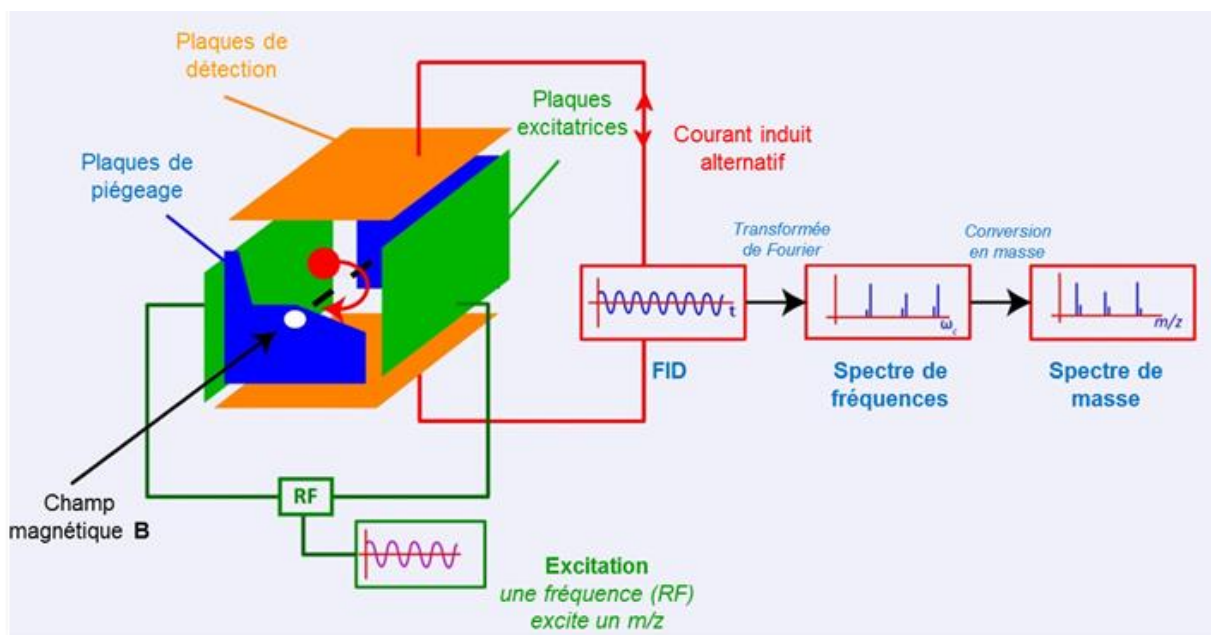


Figure 22 : Obtention d'un spectre de masse par FT-ICR (adapté de la référence <sup>86</sup>)

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse hybride quadripôle FT-ICR commercialisé par Bruker. Il s'agit du Solarix 9.4T lequel peut être précédé soit d'une source ESI soit d'une source MALDI. Son schéma de conception est présenté dans la Figure 23.

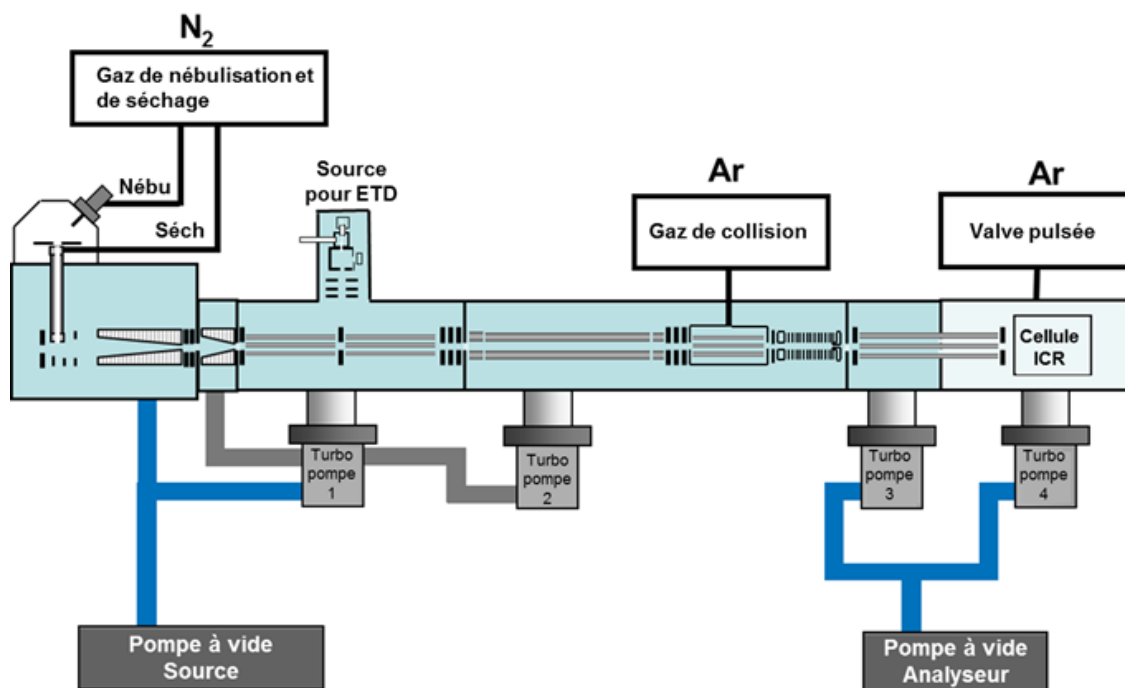


Figure 23 : Représentation schématique du FT-ICR Bruker Solarix 9.4T

### 2.2.2.3.3 Analyseur Orbitrap

#### 2.2.2.3.3.1 Injection des ions

Les ions doivent être injectés dans la trappe par paquets. A cette fin, il est nécessaire de coupler la trappe avec un système de stockage des ions, permettant de les injecter. Ceci est réalisé, dans les appareils commerciaux, au moyen d'un quadripôle, situé en amont de l'Orbitrap, et dont l'appellation – C-Trap – résulte de la forme du champ de radiofréquence qui y règne – une forme de C.

Au sein de cette trappe, les ions peuvent être accumulés, thermalisés, stockés avant leur injection. La C-trap contient du diazote afin de participer au refroidissement des ions ainsi qu'à leur maintien au centre du piège.

Les ions accumulés sont éjectés de la C-trap via l'application de pulses électriques très intenses. Ils sont envoyés dans l'Orbitrap, dont l'énergie de l'électrode centrale est diminuée le temps de leur introduction. Les ions sont alors capturés et commencent à osciller autour de l'électrode centrale. Typiquement, les ions sont injectés avec des énergies cinétiques de l'ordre de 1.3 keV et l'électrode fuséau est quant à elle à un potentiel de l'ordre de -3.4 kV (en mode positif) <sup>83,87,97-100</sup>.

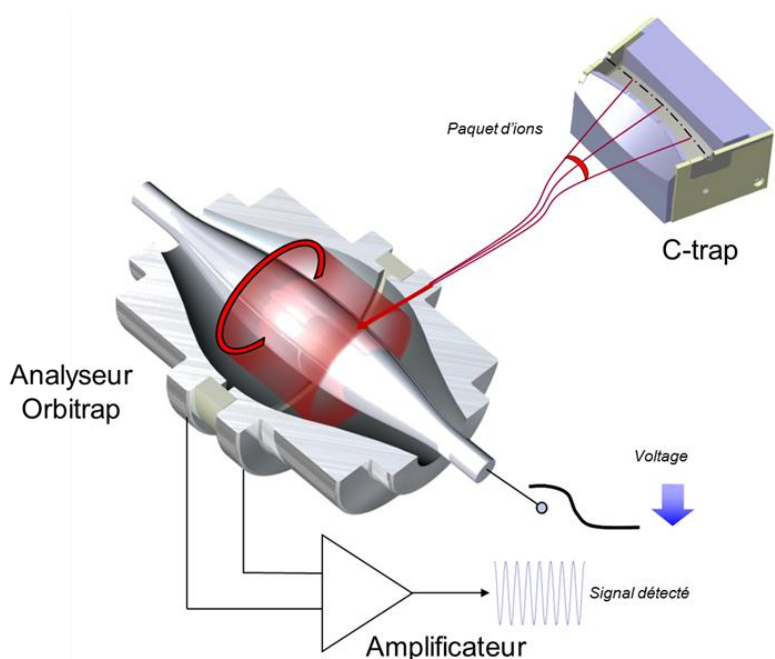


Figure 24 : Schéma de fonctionnement de l'Orbitrap et de la C-Trap (adapté de <sup>100</sup>)

#### 2.2.2.3.3.2 Piégeage des ions

Après injection dans la trappe, les ions doivent être mis en mouvement, par l'action d'un champ électrique. En pratique, le champ électrique résultant de la forme complexe des électrodes peut s'exprimer comme suit :

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left( z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left( \frac{r}{R_m} \right) + C$$

Dans cette équation,  $r$  et  $z$  sont les coordonnées cylindriques ( $z=0$  correspondant à l'axe de symétrie du champ électrique),  $C$  est une constante,  $k$  correspond à la courbure du champ électrique,  $R_m$  est le rayon caractéristique. Le premier terme de cette équation étant quadratique, et le second logarithmique, le champ électrique résultant est « quadrolarithmique ».

Sous l'effet de ce champ électrostatique, les ions pénétrant dans la trappe adoptent une trajectoire spirale autour de l'électrode centrale. Ce mouvement peut être décomposé en une composante de rotation autour de l'axe central - non exploitable dans le fonctionnement de l'Orbitrap - à laquelle s'ajoutent des oscillations axiales (selon l'axe  $z$ ). La fréquence de ces oscillations axiales,  $\omega_z$ , dépend uniquement du rapport masse sur charge de l'ion et du paramètre  $k$  et elle est indépendante de l'énergie cinétique des ions. Cette fréquence s'exprime par :

$$\omega_z = \sqrt{k \frac{q}{m}}$$

#### 2.2.2.3.3.3 Détection des ions

La fréquence axiale des oscillations harmoniques des ions peut ensuite être déterminée par la mesure du courant image produit par les ions en mouvement. Dans l'Orbitrap, cette mesure de courant est réalisée au niveau du centre de l'électrode externe. Le résultat de cette mesure est, au même titre que dans les analyseurs de type FT-ICR, un interférogramme de fréquences amorties (FID). L'application de la transformée de Fourier permet l'obtention du spectre de masse des ions présents dans la trappe.

A la différence des analyses par FT-ICR, il n'y a, dans l'Orbitrap, pas d'étape d'excitation avant la détection. Au sein de l'Orbitrap, après injection tangentielle des ions, le champ électrique induit les oscillations axiales de ces derniers, tous avec la même amplitude et une fréquence axiale directement liée à la masse et la charge des ions. Il résulte une autre similitude par rapport à un analyseur FT-ICR, à savoir que les ions de même masse se déplacent par paquets au sein de la trappe.

Enfin, l'observation des équations régissant la fréquence des ions au sein d'un Orbitrap ou d'un FT-ICR permet de constater que la fréquence des oscillations  $\omega_z$  dans l'Orbitrap est proportionnelle à la racine carrée du rapport masse sur charge de l'ion tandis que la fréquence cyclotronique  $\omega_c$  est directement proportionnelle à  $m/z$ . Une conséquence de cette observation est que la résolution est meilleure pour les ions de faible rapport masse sur charge dans un FT-ICR, en comparaison avec l'Orbitrap tandis que les performances de ce dernier augmentent lors que les  $m/z$  augmentent.

Le pouvoir de résolution dans un Orbitrap peut être exprimée par :

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{1}{2\Delta\omega_z} \sqrt{\frac{kq}{m}}$$

Le vide au sein de l'Orbitrap doit être très poussé, afin d'éviter la dispersion énergétique des ions et les effets sur les trajectoires de ces derniers. L'Orbitrap utilisé lors de cette étude, le Q Exactive de Thermo Fisher, travaillait à un vide de l'ordre de  $10^{-9}$  mbar.

#### 2.2.2.3.3.4 Hybridation : Quadripôle-Orbitrap

Certains appareils commerciaux combinent deux ou plusieurs types d'analyseurs. On parle de spectromètres de masse hybrides. L'objectif de ce couplage est de combiner les avantages de chaque type d'analyseur, pour augmenter la performance globale de l'analyse.

Il existe une multitude de combinaisons possibles et de nombreuses sont accessibles commercialement. Ainsi citons les couplages quadripôle-temps de vol (Q-TOF), la trappe ionique linéaire-Orbitrap (LIT-Orbitrap) ou le quadripôle-Orbitrap par exemple.

L'hybridation d'analyseurs a pour objectif principal la réalisation d'expériences de spectrométrie de masse en tandem, et l'obtention d'informations supplémentaires permettant d'augmenter la performance de l'analyse. Cette application de la spectrométrie de masse, extrêmement utilisée à ce jour, fait l'objet du paragraphe suivant.

Au cours de ce travail, les manipulations ont, en partie, été réalisées sur un analyseur Orbitrap commercialisé par Thermo Fisher. Il s'agit exactement du Q Exactive qui est en pratique un appareil hybride, constitué du couplage d'un quadripôle et de l'Orbitrap en tant que tel.

#### 2.2.2.3.4 Détecteurs

Afin de détecter les ions, produits, piégés et/ou fragmentés au sein de l'analyseur, il est nécessaire de les transformer en un signal lisible. C'est le rôle du détecteur.

Différents types de détecteurs existent actuellement et le choix de l'un par rapport à un autre dépend du type d'analyseur qui le précède ainsi que des applications analytiques.

Nous avons déjà évoqué la détection des ions, dans le cadre de la description du mode de fonctionnement du spectromètre de masse à transformée de Fourier et de type Orbitrap. Dans ce type d'analyseur, le détecteur consiste en une paire de plaques métalliques situées au sein même de l'analyseur, à proximité de la trajectoire des ions. Ceux-ci sont détectés par la mesure du courant induit qu'ils produisent dans un circuit connecté aux plaques de détections.

A l'exception de la détection dans ces deux types d'analyseurs, un détecteur est généralement placé au sortir de l'analyseur. Quelles que soit les étapes qui ont précédés, les ions doivent être détectés et transformés en un signal lisible.

Une majorité des manipulations ayant été effectuées, outre par FT-MS et Orbitrap, au sein d'un appareil à temps de vol, nous ne décrivons ici que le détecteur qui équipait notre spectromètre de masse, l'Ultraflex II (Bruker Daltonics, Bremen).

Au même titre que la plupart des analyseurs à temps de vol, l'Ultraflex II était équipé d'un détecteur de type Micro Channel Plate (MCP). Le principe de fonctionnement de ce détecteur est illustré dans la Figure 25. La détection repose sur l'amplification en cascade par multiplication d'électron.

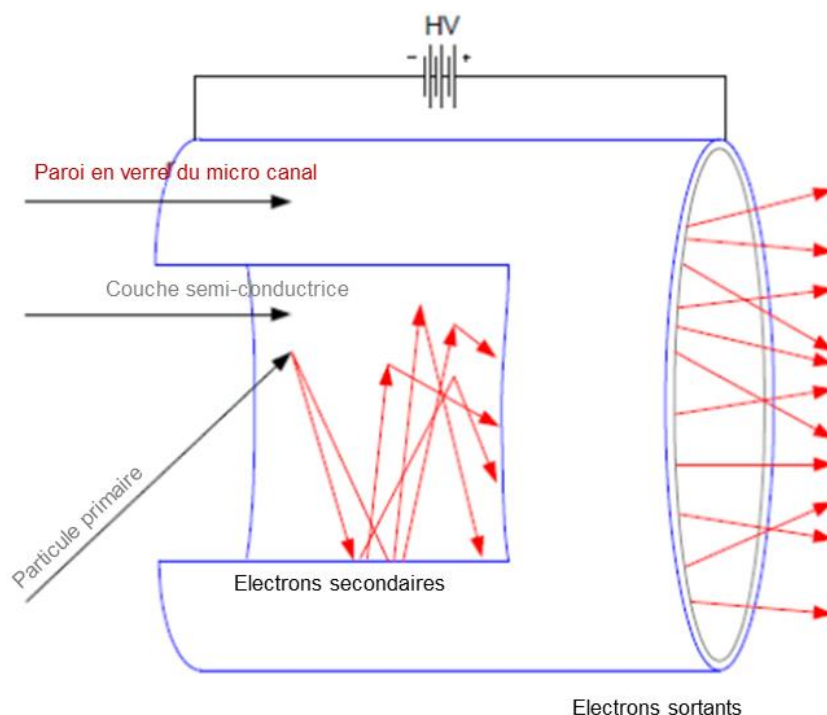


Figure 25 : Schéma de principe du fonctionnement du détecteur MCP (adapté de <sup>287</sup>)

En effet, le détecteur MCP est une plaque constituée par l'assemblage de millions de petits canaux (Diamètre : 5-10  $\mu\text{m}$ , L = 0.5-0.8 mm) dont la surface intérieure est recouverte d'une couche de matériau semi-conducteur. Chaque canal fonctionne en tant qu'un multiplicateur d'électron, indépendamment des canaux adjacents. L'ensemble des canaux est connecté en parallèle afin d'obtenir un rendement en électron maximal.

Une différence de potentiel de l'ordre de 1 kV est appliquée entre la face extérieure et la face intérieure de la galette (entre l'entrée et la sortie de chaque canal). Le signal est ensuite digitalisé et traité par le biais de logiciels spécifiques.

## 2.2.3 Spectrométrie de masse en tandem

### 2.2.3.1 Nomenclature de la fragmentation peptidique

Afin de poser les bases de l'analyse structurale de fragments, une nomenclature des fragments obtenus par rupture de liaisons peptidiques a été proposée par Roepstorff et Fohlman, puis modifiée par Biemann dans les années 1980<sup>83,87,288,289</sup>.

Les fragments sont classifiés en deux catégories : ceux produits par rupture d'une ou deux liaisons de la chaîne peptidique et ceux issus d'une rupture de liaison au sein de la chaîne latérale.

Dans la chaîne peptidique, la rupture peut s'effectuer à trois positions, à savoir au niveau de la liaison C $\alpha$ -C, au niveau de la liaison C-N ou au niveau de la liaison N-C $\alpha$ . Ces fragmentations donnent lieu à la formation de six types de fragments, tels qu'illustrés sur la Figure 26. Ces fragments sont respectivement assignés  $a_n$ ,  $b_n$ ,  $c_n$  lorsque la charge positive est du côté N-terminal et  $x_n$ ,  $y_n$ ,  $z_n$  lorsque la charge positive est portée par le côté C-terminal. « n » représente le nombre d'acides aminés contenus dans le fragment

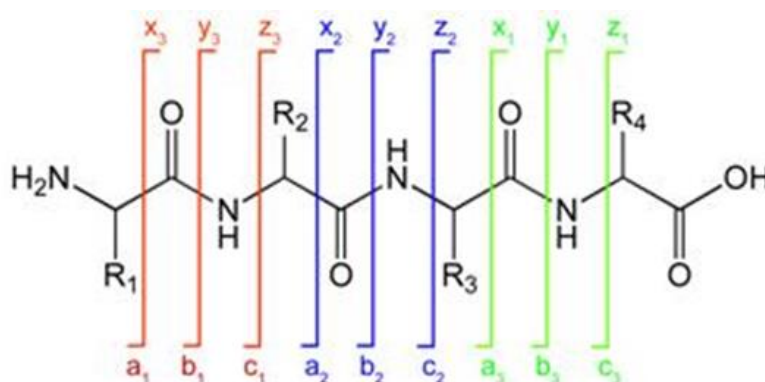


Figure 26 : Nomenclature de Roepstorff et Biemann pour la fragmentation au sein de la chaîne peptidique

Le type de fragments observés dans un spectre MS/MS dépend de plusieurs facteurs, incluant la composition même du peptide, sa séquence, la méthode d'activation utilisée pour obtenir le spectre MS/MS ou les niveaux d'énergies intervenant dans le phénomène de fragmentation par exemple. Les ions  $b$  et  $y$ , résultant de la fragmentation au niveau de la liaison peptidique, sont généralement majoritaires et apparaissent à de faibles énergies de collision<sup>87,290</sup>.

### 2.2.3.2 Méthodes d'activation collisionnelle

L'activation collisionnelle est la technique de fragmentation la plus fréquemment rencontrée. La fragmentation se produit suite à une collision avec un gaz inerte, provoquant une augmentation progressive de l'énergie interne de l'espèce ionique pouvant mener à sa dissociation. On parle de dissociation induite par collision (Collision Induced Dissociation - CID) ou de dissociation activée par

collision (Collision Activated Dissociation - CAD). Ce type de fragmentation peut se rencontrer dans différents types d'analyseurs, à différents niveaux énergétiques et selon différents mécanismes.

Globalement, la dissociation induite par collision peut être considérée comme une séquence de deux étapes. Lors de la première étape, très rapide ( $10^{-14}$ - $10^{-16}$ s), les ions entrent en collision avec le gaz inerte (He, Ar,...). Une partie de ces ions voient leur énergie cinétique convertie en énergie interne suite à la collision, les amenant dans un état excité. La seconde étape est la décomposition unimoléculaire de l'ion activé par la collision. La probabilité (et donc la cinétique) de cette fragmentation est basée sur la théorie du quasi-équilibre de Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus (RRKM), que nous ne détaillerons pas ici<sup>87,291</sup>.

Lors d'une collision inélastique, seule une fraction de l'énergie de translation est convertie en énergie interne. Cette énergie interne s'exprime par :

$$E_{cm} = E_{lab} \frac{M_t}{M_i + M_t}$$

Avec  $M_i$  et  $M_t$  respectivement les masses de l'ion et du gaz de collision,  $E_{lab}$  l'énergie cinétique de l'ion dans le référentiel du laboratoire et  $E_{cm}$  l'énergie interne maximale transmise lors de la collision sous forme d'énergie interne. On voit que plus la masse du gaz de collision est importante, plus l'énergie maximale transférée sous forme d'énergie interne est grande. En outre, l'observation de cette équation met en évidence la limitation de la technique de fragmentation pour les ions de faibles masses. En effet, plus la masse de l'ion augmente, plus l'énergie interne transférée sera faible.

Par construction, certains analyseurs permettent l'accès à de très hautes énergies d'activation, là où d'autres analyseurs mettent en œuvre des énergies de l'ordre de l'eV au maximum. Ces deux types d'activation mènent, logiquement, à des profils de fragmentation souvent différents, et autant d'informations complémentaires.

Ainsi, on distingue les collisions à hautes énergies (keV), souvent rencontrées dans les analyseurs à secteur magnétique ou les temps de vol (mettant en œuvre des énergies cinétiques importantes), et les collisions à faible énergie (1-100 eV), majoritairement rencontrées dans les analyseurs de type ion trap, triple quadripôle ou FT-ICR.

Lors de collisions à faible énergie, la fragmentation de l'espèce ionique se produit suite à une succession de collisions, menant à une augmentation progressive de l'énergie interne des ions. On parle de régime multi-collisionnel.

Dans le cas de fragmentations à hautes énergies, un gaz est introduit sur la trajectoire des ions accélérés par une différence de potentiel de l'ordre de quelques kV. Il s'agit majoritairement de phénomènes de fragmentation mono-collisionnelle, à la différence de la fragmentation à faible énergie de collision. L'énergie transférée lors de la collision, en raison de la vitesse de l'ion, est rapidement distribuée sur l'ensemble des MNV (modes normaux de vibration) de l'ion, donnant lieu à une fragmentation souvent différente de celle observée à de faibles énergies de collision.

### 2.2.3.2.1 Fragmentation dans le FT-ICR par Sustained Off Resonance Irradiation – Collision Activated Dissociation (SORI-CAD)

Les analyseurs FT-ICR font partie des dispositifs permettant une spectrométrie de masse en tandem dans le temps. En effet, de par leur constitution, la fragmentation dans une cellule ICR sera réalisée dans le temps et non dans l'espace.

Le principe, au sein d'une cellule ICR, est le suivant : pour obtenir une dissociation efficace, les ions doivent avoir une énergie cinétique suffisante lors de la collision avec le gaz. Dans la cellule ICR, cette augmentation d'énergie peut être réalisée par l'application de pulses d'excitation très courts (0.1-0.5 ms) à la fréquence cyclotronique de l'ion d'intérêt. Les ions entrent ensuite en résonance très rapidement, et leur maintien au sein de la cellule ICR est rendu difficile par la rapidité de l'excitation. Il s'agit de l'excitation par résonance (RE), mais en pratique, cette méthode est peu utilisée car difficile à maîtriser. Notons toutefois qu'elle permet l'accès à des canaux de fragmentation nécessitant de hautes énergies d'activation, qui ne sont pas retrouvés dans les spectres de fragmentation à faible énergie.

La méthode d'activation collisionnelle la plus utilisée, au sein du FT-ICR, est la technique SORI, c'est à dire "Sustained Off Resonance Irradiation" ou la dissociation activée par collisions et par excitation hors résonance. Les ions d'intérêt sont irradiés par un pulse d'excitation de fréquence très légèrement différente de leur fréquence de résonance (de l'ordre de 1 % - [500-1500] Hz). Les ions parents observent une succession d'accélération/décélération, décrivant une trajectoire dont le rayon varie au sein de la cellule ICR, tout en restant inférieur aux dimensions de la cellule. Cette excitation off-résonance permet, en présence d'un gaz de collision, l'augmentation progressive de l'énergie interne des ions par collisions successives (multi-collisions). Lorsque l'énergie interne des ions est suffisante, ils peuvent alors se fragmenter. Le SORI repose donc sur l'augmentation lente d'énergie interne des ions. Il permet donc l'obtention de spectres de fragmentation mettant en œuvre des réactions qui, dans les fenêtres de temps classiques, n'auraient peut-être pas pu être observées, bien que nécessitant une faible énergie d'activation<sup>286</sup>.

Notons enfin que pour ne pas réduire la résolution des spectres de masse obtenus, qui pourrait être la conséquence de l'injection d'un grand volume de gaz de collision, le gaz est envoyé par de petites impulsions (5-50 ms). Ceci permet d'éviter que la pression au sein de la cellule ICR n'augmente trop. L'injection du gaz par pulse provoque ainsi une augmentation de pression de  $10^{-10}$  mbar à  $10^{-8}$  mbar, ce qui n'impacte pas de manière significative la résolution des spectres.

Le SORI offre donc la possibilité d'exploiter l'exceptionnel pouvoir de résolution offert par la FT-ICR-MS, en mode tandem (voire plus).

### 2.2.3.2 Fragmentation dans l'Orbitrap par Collision Induced Dissociation

La fragmentation au sein même de l'Orbitrap est, en théorie, possible. Toutefois, les difficultés technologiques de sa mise en œuvre, pour des performances faibles en comparaison avec d'autres dispositifs de fragmentation, font qu'actuellement, aucun appareil commercial ne permet la fragmentation au sein de l'Orbitrap.

Nous avons vu cependant, que la plupart des analyseurs de type Orbitrap sont commercialisés sous la forme hybride, en couplage avec un quadripôle ou une trappe ionique par exemple. Le Q Exactive étant un hybride quadripôle-Orbitrap, nous nous concentrerons sur cette configuration.

Le type de fragmentation se produisant est généralement du type « collisions multiples » avec un gaz de collision, injecté dans le quadripôle faisant office de cellule de collision. Cependant, ce type de collisions, ne permet pas toujours une fragmentation efficace, notamment des peptides et protéines.

L'obtention d'une fragmentation à plus hautes énergies a pu être réalisée grâce au couplage de la trappe d'injection (C-Trap) avec un multipôle faisant office de cellule de collision (cellule HCD – Higher Energy Collision Dissociation)<sup>292</sup>. La fragmentation est obtenue par collision avec un gaz présent au sein de la cellule HCD. Les ions, au sortir de la C-Trap, sont ensuite accélérés par une différence de potentiel de l'ordre du kV entre la C-Trap et l'entrée dans la cellule HCD. Ils peuvent ensuite être fragmentés par collision avec le gaz inerte présent dans la cellule de collision. Une fois fragmentés, les ions sont renvoyés dans la C-Trap puis vers l'Orbitrap en tant que tel, où ils peuvent être détectés.

La Figure 27 illustre schématiquement la fragmentation au sein du Q Exactive.

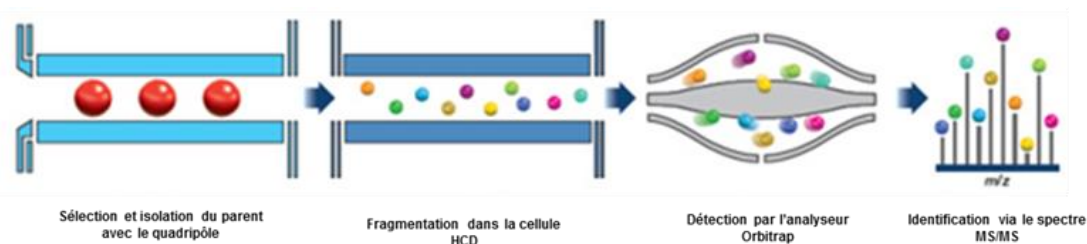


Figure 27 : Fragmentation d'ions précurseurs dans l'Orbitrap (adapté de <sup>293</sup>)

Après isolement/sélection par le quadripôle, l'ion parent est fragmenté dans la cellule HCD. Après passage dans la C-Trap, les fragments sont ensuite détectés dans l'Orbitrap où ils peuvent également être quantifiés.

La fragmentation obtenue, en termes de profil de fragmentation, est comparable aux spectres obtenus par CID à faible énergie (20-60 eV), au sein d'un triple quadripôle par exemple<sup>292</sup>.

### 2.2.3.2.3 Fragmentation dans le TOF par Post Source Decay (PSD) et PSD-CID

Lors d'une analyse par MALDI-MS, l'ionisation peut, dans certains cas, mener à la fragmentation des ions en raison d'un excès d'énergie délivrée lors de la désorption-ionisation<sup>294</sup>.

Il y a, essentiellement, deux types de fragmentations prenant place lors d'une analyse MALDI, classées sur base de l'endroit du spectromètre de masse où le phénomène de fragmentation se produit ainsi qu'en fonction du mécanisme entrant en jeu dans la fragmentation. Ces deux types de fragmentations sont particulièrement intéressantes, car complémentaires en termes d'informations structurales.

Ainsi, une fragmentation observée dans la source, pendant ou après le phénomène de désorption mais avant pénétration dans la zone libre de champ du tube de vol est appelée une fragmentation "in source" (In Source Decay (ISD)). Ce type de fragmentation se produit très rapidement, (de l'ordre de quelques pico à nanosecondes après l'impact LASER) et avant l'étape d'extraction des ions formés. Les intensités des fragments obtenus par ISD sont faibles mais néanmoins significatives. Nous verrons que le mécanisme à la source de ce phénomène est principalement de type radicalaire – l'ISD sera donc décrit dans le paragraphe consacré à la fragmentation induite par un radical.

Une fragmentation trop lente pour se produire dans la source mais suffisamment rapide pour se produire après la zone d'accélération du spectromètre et avant le détecteur est appelée une fragmentation « post source » (Post Source Decay (PSD)). Elle résulte globalement de la fragmentation d'ions métastables, à savoir dont la stabilité est suffisante pour quitter la source sans être fragmentés mais qui contiennent assez d'énergie pour se dissocier avant d'atteindre le détecteur. Ce type de fragmentation est largement majoritaire par rapport au phénomène d'ISD<sup>294</sup>. Le mécanisme à la source de ce phénomène est de type activation collisionnelle.

#### 2.2.3.2.3.1 Principe de la décroissance PSD

Lors du processus d'ionisation en MALDI, ainsi que lors de l'extraction des ions de la source vers l'analyseur, les ions produits peuvent acquérir une certaine quantité d'énergie par collision avec les espèces moléculaires neutres présentes dans la plume MALDI (molécules de matrice désorbées mais non ionisées par exemple). En outre, les ions moléculaires peuvent également entrer en collision, contrôlée ou pas, avec du gaz dans la zone libre de champ. La conséquence directe de ces collisions inélastiques est une augmentation de l'énergie interne des ions produits par la source MALDI. Lorsque les ions moléculaires ont acquis suffisamment d'énergie interne pour se fragmenter avant d'atteindre le détecteur, on parle de fragmentation « Post Source Decay »<sup>295,296</sup>.

L'appellation PSD, initialement, était relative à la fragmentation d'ions métastables formés dans le tube de vol. Notons qu'actuellement, le PSD fait également référence à la fragmentation d'ions formés suite à des collisions à haute

énergie ou à basse énergie. Le point commun à la décroissance PSD, indépendamment du mode d'activation, est que la fragmentation se produit dans la zone libre de champ de l'analyseur.

En parallèle avec le développement de cellules de collisions efficaces (permettant une collision efficace sans perte de résolution, tout en évitant les pertes de matériel), le PSD a véritablement accompagné l'essor du MALDI dans l'analyse de composés macromoléculaires naturels (protéines, peptides) et synthétiques (polymères). La sélection de matrices permettant d'observer la fragmentation PSD a fait l'objet de nombreuses études et est déterminante pour obtenir une caractérisation optimale de chaque type de composés. En fonction de la structure, de la polarité et de la nature du composé d'intérêt, une matrice MALDI produira de meilleurs résultats qu'une autre matrice. Cette sélection est très importante et fait l'objet du paragraphe suivant.

Ceci a ouvert la voie au séquençage de peptides à la fin des années 1990<sup>290</sup>, remplaçant les méthodes classiques de type dégradation d'Edman par exemple. Par rapport au séquençage d'Edman, les principaux avantages du PSD sont sa compatibilité avec toutes formes de modifications chimiques (dérivatisation, glycosylation, modifications N-terminales), sa sensibilité ainsi que, et surtout, la possibilité d'analyser plusieurs composés au sein d'un même échantillon<sup>295</sup>.

Notons enfin que la fragmentation PSD est un phénomène qui produit principalement des fragments de type y, a, b ainsi que des pertes de neutres<sup>288,289</sup>.

Cette fragmentation est assez proche de celle obtenue par l'introduction d'un gaz de collision (CID-like)<sup>297</sup>.

L'analyseur à temps de vol de l'Ultraflex II (Bruker Daltonics), utilisé dans ce travail, permet la fragmentation PSD grâce à un système particulier d'« ascenseur à potentiel », nommé LIFT™, permettant d'accéder à des fragments de très haute énergie (Figure 28).

Ce système permet de sélectionner un ion de  $m/z$  choisi ainsi que ses fragments métastables, formés après la première étape d'accélération.

Le principe de fonctionnement est le suivant : une fois formés, les ions sont accélérés par une petite différence de potentiel régnant entre les lentilles IS1 et IS2. L'accélération est faible afin d'éviter une fragmentation des ions pouvant être provoquée par collision avec les neutres désorbés lors de l'impact LASER. Une seconde accélération, plus importante (de l'ordre de 8 kV), est ensuite conférée aux ions pénétrant dans la deuxième chambre, entre la lentille IS2 et la troisième lentille, dont le potentiel est à la terre.

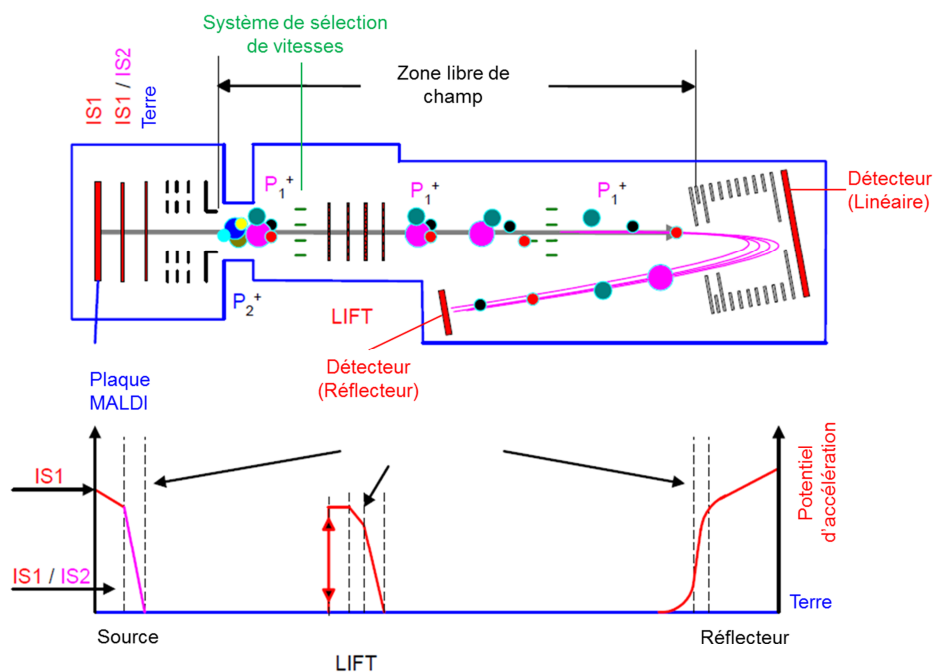


Figure 28 : Schéma de fonctionnement du LIFT™ (MS/MS) dans l'analyseur à temps de vol Ultraflex II (Bruker Daltonics) - adapté de <sup>92</sup>

Les ions pénètrent alors dans une région libre de champ, au sein de laquelle certains d'entre eux peuvent se fragmenter. Le parent et ses fragments, formés dans la zone libre de champ, se déplacent à la même vitesse. Une séparation en fonction de leur temps de vol serait donc théoriquement impossible. Le système LIFT™ va permettre cette séparation en fournissant une seconde impulsion aux ions, sous la forme d'une seconde accélération. Le principe de cette deuxième « source » est similaire au premier à la différence du fait que les ions sont, dans ce cas, accélérés par une différence de potentiel de 19 kV<sup>92</sup>.

### 2.2.3.2.3.2 Matrices favorisant le PSD

Les matrices MALDI ont été classées sur une échelle d'énergie, allant de matrice "chaude" à matrice "froide" en fonction de l'énergie interne transférée aux analytes lors de l'ionisation. Bien que le mécanisme d'ionisation MALDI soit encore sujet à discussion, les réactions chimiques en phase gazeuse comptent parmi les phénomènes qui permettent l'augmentation de l'énergie interne des ions produits en raison de leur exothermicité. A contrario, les collisions multiples se produisant en phase gazeuse ont, pour leur part, un effet de refroidissement des ions (ou « cooling ») et de dissipation de leur énergie interne, tamponnant l'effet primaire des collisions en phase gazeuse<sup>298</sup>.

En outre, le mode de préparation du dépôt MALDI influence également de manière très importante le rendement d'ionisation et le rendement de la fragmentation consécutive à l'ionisation.

L'analyse MALDI-PSD permet donc l'obtention d'informations très intéressantes pour le séquençage de peptides. Toutefois, certaines configurations telles la présence de pont disulfure au sein de la structure peptidique, ou la configuration cyclique de peptides diminuent substantiellement la couverture de séquence obtenue en MALDI-PSD<sup>156</sup>.

En outre, la fragmentation PSD implique la conversion de l'excès d'énergie acquis durant le processus de désorption-ionisation en énergie vibrationnelle distribuée sur tout l'ion (conversion interne). Lorsque le nombre de modes de vibration, sur lesquels l'énergie doit se répartir, augmente (avec la taille de l'ion), l'efficacité de fragmentation diminue proportionnellement. Le PSD montre donc ses limites pour l'analyse de peptides de taille plus importante (supérieure à 3500 Da) ou encore pour le séquençage top-down (sans digestion préalable) de protéines<sup>156,298,299</sup>.

### 2.2.3.3 Méthodes d'activation alternatives

Un des inconvénients principaux de l'activation collisionnelle est que l'énergie transférée aux ions, même lors de collisions multiples, est limitée. Elle est en outre, redistribuée sur l'ensemble des modes normaux de vibration de la molécule, rendant l'efficacité faible lorsqu'il s'agit de molécules de grande taille telles les protéines, peptides, oligonucléotides par exemple. Néanmoins, elle est de plus en plus utilisée pour le séquençage et l'identification de composés biologiques.

Cependant, notons que l'introduction d'un gaz de collision peut compromettre le vide au sein de l'analyseur, et impacter la résolution des spectres de masse.

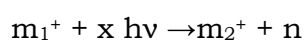
D'autres techniques d'activation ont donc vu le jour afin de permettre de contourner les inconvénients de l'activation collisionnelle. Outre la collision avec une surface, que nous ne développerons pas dans ce chapitre car elle est peu ou plus utilisée, deux méthodes d'activation alternatives ont été développées. La première consiste à remplacer les collisions de l'ion parent avec le gaz inerte par

une interaction avec des photons (LASER). Il s'agit dans ce cas de fragmentation induite par photon (photodissociation). L'autre grande famille de réaction de fragmentation ayant été développée est la fragmentation induite par capture d'électron (ECD), ou, plus globalement, l'activation radicalaire<sup>87,300</sup>.

### 2.2.3.3.1 Activation photochimique

Lors de réactions d'activation photochimique (IRMPD – InfraRed MultiPhoton Dissociation par exemple), la dissociation est provoquée par l'absorption, par l'ion d'intérêt, d'un ou plusieurs photons.

L'augmentation d'énergie interne consécutive à l'absorption de plusieurs photons peut être exploitée pour activer et dissocier les ions présents dans l'analyseur :



En pratique, l'irradiation se produit au travers d'une fenêtre transparente aux radiations du LASER. Cette technique permet d'éviter l'introduction de gaz de collision au sein de la cellule, manœuvre parfois risquée en raison de la difficulté de contrôler précisément la pression. Par ailleurs, au même titre que le CID, la dissociation induite par photons est un processus ergodique c'est à dire que l'énergie augmente graduellement et est redistribuée sur l'ensemble des MNVs avant la dissociation.

La Figure 29 illustre le fonctionnement de l'IRMPD<sup>301</sup>. L'absorption d'un rayonnement IR par un MNV particulier est suivie d'un phénomène de relaxation vibrationnel intramoléculaire dans tous les autres modes normaux de vibration. Après cette relaxation, le MNV retourne à son état initial et est capable d'absorber un autre photon.

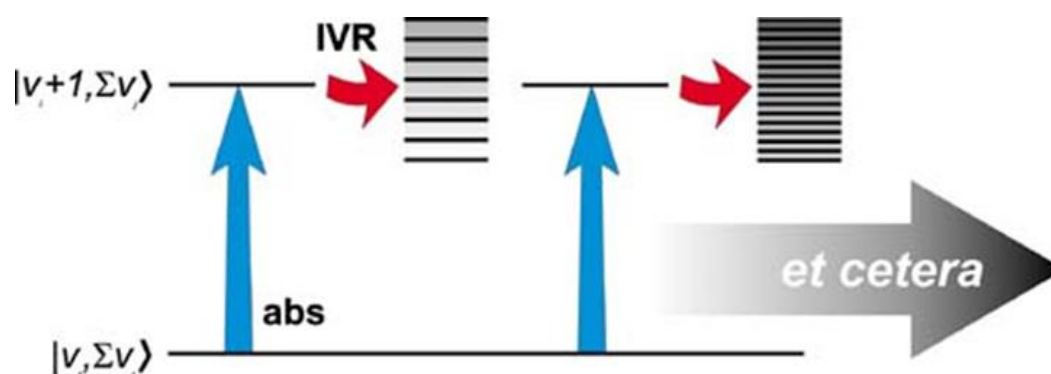


Figure 29 : Représentation schématique du mode de fonctionnement de l'IRMPD (<sup>301</sup>)

L'activation via absorption de photons est une technique très sélective car seuls les ions absorbant la longueur d'onde excitatrice seront activés. C'est un processus pouvant être lent, et le profil des spectres de fragmentation est similaire à ceux obtenus par CID (CID-like). L'IRMPD est une technique qui est généralement appliquée aux ions piégés, comme dans le cas d'une trappe ionique ou d'une cellule

ICR par exemple. La source de photons la plus répandue est le LASER à CO<sub>2</sub> (10.6 μm)

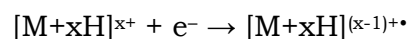
### 2.2.3.3.2 Activation radicalaire

#### 2.2.3.3.2.1 ECD, ETD et EDD

En parallèle au développement de la technique d'activation par infrarouge, une autre méthode d'activation a été mise au point. Il s'agit de l'activation et dissociation par capture d'électron (ECD – Electron Capture Dissociation).

La technique d'ECD a vu le jour en couplage avec l'électrospray, car ce type de source permet l'obtention, dans le cas de molécules de taille suffisante, d'ions multichargés. Or, par nature, l'ECD requiert au minimum que l'ion soit dichargé, afin, après capture, d'être toujours détecté dans le spectre de masse.

La réaction générale peut s'exprimer par :



Le produit de la réaction est un ion radicalaire. L'énergie provenant de la neutralisation d'une charge ionique (5-7 eV) est transformée en énergie interne provoquant la fragmentation rapide de l'ion (10<sup>-14</sup> s). L'ECD est donc, au contraire de la plupart des réactions de fragmentation induites par collision ou photon, un processus non-ergodique. En effet, la dissociation de l'ion, après activation, est plus rapide qu'une vibration classique. En conséquence, la rupture de liaison se produit avant que l'énergie interne n'ait été redistribuée (et dispersée) sur l'ensemble de la molécule.

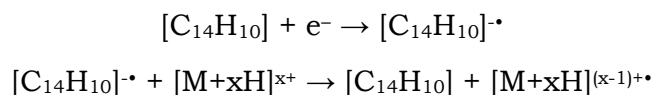
Cette caractéristique est très intéressante car elle permet l'accès à une fragmentation très différente et complémentaire à celle observée lors de processus d'activation ergodique. La rapidité de la réaction permet également de n'utiliser que de faibles énergies, mais qui, lorsqu'elles se concentrent sur une seule liaison avant redistribution, sont suffisantes pour provoquer la rupture de ladite liaison.

L'ECD, en raison de la finesse du faisceau d'électrons comparée à la taille de la cellule, ne permet d'activer qu'un faible pourcentage d'ions à la fois. Afin d'augmenter l'efficacité du procédé, un temps d'interaction plus long est donc requis, rendant la technique pratiquement exclusivement utilisable pour les analyseurs de type piège. Ainsi, l'ECD est principalement utilisée dans les analyseurs de type FT-ICR.

La technique d'ECD est toutefois difficile à mettre en œuvre dans les analyseurs de type trappe ionique, en raison principalement de la présence de champs électriques intenses qui y règnent et qui perturbent la trajectoire du faisceau d'électrons. Pour contourner cette limitation, une technique d'« ECD like » a vu le jour, sous la forme d'un transfert d'électron via un intermédiaire monochargé – typiquement l'antracène (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>). Cette technique porte le nom d'ETD (Electron Transfer Dissociation). Le principe est le suivant : la capture d'un électron par une molécule d'antracène (au sein d'une source de type ionisation chimique) mène à la formation d'un radical anion. Celui-ci peut ensuite réagir avec l'ion parent d'intérêt, lequel reçoit l'électron par transfert, et peut rapidement se

fragmenter selon le même principe que la dissociation ECD. D'autres intermédiaires que l'anthracène peuvent être utilisés. Citons le fluoranthène dont l'utilisation en ETD est de plus en plus répandue.

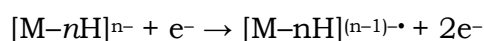
Les réactions intervenant en ETD peuvent s'exprimer par :



L'ECD, comme l'ETD, provoquent, nous l'avons vu, la rupture rapide et immédiate de liaisons selon un schéma de fragmentation différent de ceux observés en CID. Ainsi, dans le cas de peptides par exemple, les ions majoritaires lors d'expériences d'ECD ou ETD sont les ions *c*- et *z*-. Ces fragments sont très importants car riches en informations structurales<sup>83</sup>.

L'un des prérequis à l'application de l'ECD et/ou ETD est que les ions soient multichargés mais surtout, chargés positivement. L'ECD ne peut donc être mise en œuvre en mode négatif. Or, certains composés, ou certaines modifications de type post-traductionnelles telles la phosphorylation ou la sulfonation, sont typiquement bien plus aisément observables en mode négatif, incompatible avec l'ECD.

Afin de pouvoir bénéficier des avantages procurés par l'activation radicalaire également sur des ions parents en mode négatif, la technique de dissociation induite par détachement d'électron (Electron Detachment Dissociation – EDD) a été développée. Le principe de l'EDD repose sur l'utilisation d'un faisceau d'électrons énergétiques (20 eV) plutôt que thermiques (5-6 eV). À ces niveaux d'énergie, l'impact du faisceau d'électron sur l'ion parent est capable de provoquer l'éjection d'un autre électron. La réaction, donne naissance à un ion radicalaire qui est susceptible de se fragmenter très rapidement.



L'EDD est très utilisée pour les peptides acides, mais également très répandue pour l'analyse d'oligonucléotides, d'ADN et de composés apparentés.

#### 2.2.3.3.2.2 ISD

Simultanément au développement du MALDI et du PSD, un autre type de fragmentation, complémentaire au PSD en termes de résultats sur les peptides et protéines, a été mis à jour au milieu des années 1990. En effet, Brown *et al.* ont mis en évidence une fragmentation rapide – fast fragmentation - se produisant dans la source, lors de l'ionisation MALDI et étant observable dans le spectre de masse, tant en mode linéaire qu'en mode réflectron. La fragmentation in source (In Source Decay – ISD), par nature, permet la détection des fragments dans le spectre de masse, puisque ces derniers sont formés avant l'étape d'accélération. D'un autre côté, les fragments étant produits dans la source, leur sélection spécifique n'est pas possible, bien que dans les cas les plus abondants la réalisation d'une expérience de type pseudo MS<sup>3</sup> soit possible<sup>298</sup>.

L'ISD a récemment vu un développement important, car en raison de sa cinétique, elle présente de nombreux intérêts pour l'analyse de macromolécules. En

effet, au même titre que les fragmentations de type radicalaires telles l'ECD, ETD et EDD, la dissociation in source de l'ion formé lors du processus MALDI est un processus non-ergodique, rendant possible la fragmentation de composés de taille très importante telles les protéines par exemple pour un apport énergétique proportionnellement faible. En effet, en ISD, la fragmentation se produit avant dissipation de l'énergie sur les degrés de liberté de la molécule.

L'ISD appliquée aux peptides et protéines, produit majoritairement une fragmentation de type radicalaire, c'est-à-dire avec une majorité d'ions c- et z-. Cependant, à la différence de l'EDD par exemple, les spectres de fragmentation par ISD contiennent également des fragments de type « CID-like » c'est-à-dire de type y-, a-, b- selon la nomenclature de Roepstorff et Biemann<sup>288,289</sup>. La proportion d'un type d'ions par rapport à l'autre est majoritairement déterminée par le choix de la matrice MALDI.

Par ailleurs, à la différence de l'ECD ou de l'ETD, l'espèce ionique peut ne pas être multichargée. C'est d'ailleurs le plus souvent le cas lors d'une ionisation MALDI, l'ion formé est généralement monochargé. Par ailleurs, en comparaison avec un spectre multichargé, l'analyse est plus simple lorsque l'espèce est monochargée.

Enfin, l'essor de l'ISD repose également sur le fait que l'analyse dans un appareil de type TOF, couplé avec une source MALDI, est nettement moins onéreuse que l'analyse ECD dans un analyseur FT-ICR typiquement. En outre, la source MALDI est naturellement moins sensible aux contaminants qu'une source ESI – et ce point est particulièrement clé lorsqu'il est question de l'analyse de composés biologiques provenant de matrices complexes.

### Mécanismes de l'ISD

A ce jour, le mécanisme précis de l'ISD est encore sujet à discussion – au même titre que tout ce qui touche à l'ionisation MALDI. Toutefois, au vu du profil de fragmentation obtenu via ISD, la majorité de la communauté scientifique s'accorde à dire que l'ISD est le fruit d'une combinaison de phénomènes d'activation, l'un étant thermique (induit par l'ionisation LASER) et l'autre radicalaire (avec l'intervention d'une réaction chimique entre l'ion parent et l'hydrogène radicalaire libéré par la matrice)<sup>298</sup>.

Takayama et son équipe ont proposé l'hypothèse que la formation d'ions c- et z- en ISD soit basée sur un mécanisme radicalaire, ainsi qu'illustré dans la Figure 30<sup>302</sup>. L'ISD se préparerait bien avant l'ionisation, au sein du cristal formé lors du dépôt MALDI comprenant la matrice et l'analyte. Lors de la cristallisation, des liaisons hydrogènes entre la matrice et l'analyte se forment. Lors de l'impact LASER, la liaison hydrogène initiée dans le cristal évolue vers un processus de transfert de proton de la matrice vers l'analyte. L'espèce formée, très instable, se fragmentant ensuite rapidement<sup>294</sup>.

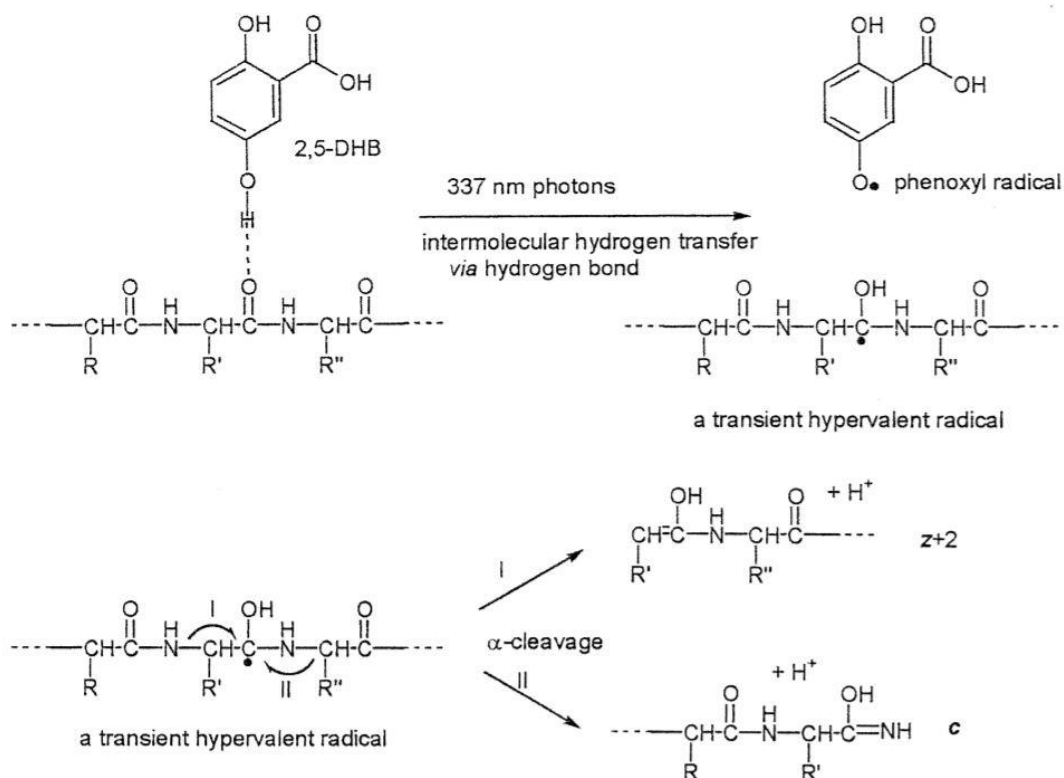


Figure 30 : Modèle de Takayama pour la formation d'ions c- et z- en ISD (302)

L'efficacité d'une matrice en ISD serait donc principalement liée à sa capacité à libérer de l'hydrogène radicalaire. Toutefois, nous l'avons vu, les ions c- et z- ne sont pas les seuls présents dans le spectre ISD. Outre le mécanisme radicalaire tel que proposé par Takayama, l'ISD serait également constitué d'une part de mécanisme de type thermique.

En effet, en augmentant l'énergie LASER, les fragments a-, b- et y- apparaissent dans le spectre, suggérant l'apparition de réactions de fragmentation de mécanismes différents du mécanisme radicalaire.

Le mécanisme thermique observé en ISD reposerait sur le modèle du proton mobile<sup>290</sup>. Le principe de base du modèle part du postulat qu'il existerait deux classes d'ions peptidiques. La première classe est constituée de peptides pour lesquels un ou plusieurs sites de protonation sont énergétiquement et/ou cinétiquement très favorisés, conduisant à une forme de « séquestration » du proton sur le site favorable. La seconde classe de peptides est constituée de peptides possédant de nombreux sites de protonation ayant chacun des probabilités et cinétiques comparables. Pour cette seconde classe de peptides, un proton pourrait être « mobile » entre les différents sites possibles de protonation du peptide.

Par ailleurs, sous l'effet de l'excitation, un proton « séquestré » pourrait voir son énergie croître pour devenir mobile le long de la chaîne peptidique. C'est sur cette hypothèse que repose la fragmentation induite par le proton mobile. Bien que moins probable, le proton mobile peut, au cours de son déplacement, se lier avec

un groupement et affaiblir une liaison adjacente, à tel point qu'il en provoque la rupture.

Ainsi, l'affaiblissement de la liaison CO-NH, précédant sa rupture, est induit par la protonation de l'azote du groupement amide adjacent. Cette protonation conduit ensuite à une fragmentation rapide, avec obtention d'un spectre de type CID. Notons que ce modèle du proton mobile soutient que l'efficacité de la voie thermique est augmentée lorsque l'acidité de la matrice augmente. Ainsi, le profil de fragmentation dans la matrice 2,5-DHB contient proportionnellement plus de fragments de type CID que son équivalent dans la matrice ISD 1,5-DAN par exemple<sup>298</sup>.

Cette propriété de l'ISD est particulièrement intéressante car elle rend possible l'analyse, au sein du même appareil, d'un même échantillon et, en modifiant la matrice, d'obtenir une fragmentation majoritairement de type collisionnelle ou de type radicalaire.

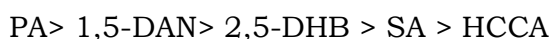
### Matrices favorisant l'ISD

De manière globale, la fragmentation observée en MALDI résulte le plus souvent de réactions de réarrangement. Lorsque l'énergie d'activation transmise est faible, les canaux de fragmentation favorisés sont les canaux nécessitant peu d'énergie. C'est le cas lorsque des matrices dites « douces » sont utilisées, car l'énergie qu'elles transmettent aux ions est faible, permettant le plus souvent l'obtention des ions non fragmentés.

A l'opposé, lorsque des matrices dites « dures » sont utilisées, on observe une proportion significative de réactions de fragmentation de type « fast fragmentation » à savoir, similaires aux canaux de fragmentation observé lors d'activation radicalaire.

L'efficacité de l'ISD semblant directement liée au choix de la matrice, différentes études ont été menées afin d'évaluer l'influence de la matrice sur le type de fragmentation observée<sup>144-146,294,298</sup>.

Afin de rationaliser l'efficacité ISD, certains travaux du laboratoire ont établi un classement des matrices, sur base de l'hypothèse du modèle de Takayama<sup>302</sup>, postulant que les fragments formés en ISD (c- et z-) seraient dus à un transfert d'hydrogène radicalaire de la matrice à l'analyte. Les capacités de matrices à libérer l'hydrogène radicalaire ont donc été évaluées par réaction avec une famille de composés très oxydants, les spirooxazines, neutralisant les radicaux. Les conclusions de ces travaux ont permis la classification de matrices MALDI sur base de leur capacité à promouvoir l'effet ISD. Les matrices évaluées sont l'acide picolinique (PA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), l'acide sinapinique (SA), l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et le 1,5-diaminonaphtalène (1,5-DAN). Les résultats sont les suivants, classés sur base de la capacité décroissante à libérer l'hydrogène :



L'acide picolinique apparaît comme étant le meilleur promoteur d'hydrogène radicalaire, mais malheureusement, son efficacité d'ionisation en MALDI est très faible, le rendant inutilisable seul. La matrice MALDI 1,5-DAN quant à elle, avait été utilisée, par le groupe de Tanaka en 2006, afin de cartographier les ponts disulfures au sein de protéines. En effet, outre sa capacité d'ionisation en MALDI, Tanaka *et al* ont montré que la molécule de 1,5-diaminonaphtalène avait la propriété de réduire les ponts disulfures et d'augmenter l'effet ISD.

L'efficacité de la matrice 1,5-DAN à promouvoir l'ISD a été confirmée par l'étude de Demeure et al, et a été vérifiée à de nombreuses reprises depuis, au travers de nombreux travaux et applications<sup>144,156,157,298,303,304</sup>. En une dizaine d'années, le rôle de la matrice 1,5-DAN dans le séquençage top down de protéines, telles les toxines de venin par exemple, a été déterminant<sup>144,145</sup>.

Nous l'avons mentionné, l'ISD mettrait en œuvre une contribution radicalaire ainsi qu'une contribution thermique, la proportion de l'une par rapport à l'autre étant majoritairement liée au choix de la matrice. Une concentration importante en hydrogène radicalaire dans la plume augmentera la fragmentation de type radicalaire tandis que plus la réaction de transfert de proton est exothermique et plus la voie thermique sera favorisée. Les deux paramètres influençant une voie par rapport à l'autre sont donc l'affinité protonique en phase gazeuse ainsi que la capacité à fournir un radical. Une autre étude, plus récente, réalisée au sein de notre laboratoire également, a utilisé un petit peptide de 3-4kDa, présentant un pont disulfure, afin de classer les matrices MALDI en fonction de leur efficacité à promouvoir l'effet ISD - via la mesure du rendement de transfert d'hydrogène de la matrice vers l'analyte. Par ailleurs, l'affinité protonique, a également été évaluée. Les matrices MALDI ayant fait l'objet de cette étude sont l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA), l'HCCA et le 1,5-DAN.

Les conclusions vont dans le sens de l'hypothèse initiale de Takayama, à savoir que la voie radicalaire observée en ISD est favorisée par le transfert d'un hydrogène radicalaire de la matrice vers l'ion d'intérêt. En outre, la capacité de donneur d'hydrogène radicalaire est directement corrélée à l'efficacité de fragmentation en ISD (fragments c- et z-). Ces conclusions permettent de rationaliser le choix d'une matrice ISD, en fonction du type de fragmentation souhaitée (radicalaire ou thermique).



### **3. ANNEXE III : TABLEAU DES FRAGMENTS**

Voir tableau ci-après



Composé parent →		MC-LR	[Dha] <sup>1</sup> -MC-LR	[Asp <sup>3</sup> ] -MC-LR	[DMAdda <sup>4</sup> ] -MC-LR	[DMAdda <sup>4</sup> Dha <sup>1</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>4</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>4</sup> Dha <sup>1</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>4</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>3</sup> , Glu(OHMe) <sup>6</sup> ] -MC-LR	MC-HIR	[Dha] <sup>1</sup> -MC-HIR	[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-HIR ou [D-Asp <sup>3</sup> , E-Dha <sup>1</sup> ] -MC-HIR	
Composition de l'ion		[Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> OR R=H (DMAdda), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdda)	135.08044	135.08044	135.08044	121.06479	121.06479	135.08044	163.07536	163.07536	163.07536	135.08044	135.08044	135.08044	135.08044	
		[MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155.08150	141.06585	155.08150	141.06585	141.06585	155.08150	141.06585	141.06585	155.08150	155.08150	155.08150	141.06585	155.08150	
		[Arg + H] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	
		[Ala-X + H - C=O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O X=Arg: C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O X=Tyr: C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=M(O): C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S X=Trp: C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O X=Phe: C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O	157.13354	157.13354	157.13354	157.13354	157.13354	143.11789	157.13354	157.13354	157.13354	157.13354	157.13354	171.14919	171.14919	
		[C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O + H] <sup>+</sup>	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	
		[Glu + NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>2+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	
		[Glu-MDha + H - NH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> - C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	196.06043	182.04478	196.06043	182.04478	196.06043	182.04478	182.04478	182.04478	196.06043	210.07608	196.06043	182.04478	196.06043	
		[Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	213.08698	199.07133	213.08698	199.07133	213.08698	199.07133	199.07133	213.08698	213.08698	227.10263	213.08698	199.07133	213.08698	
		[O=C-Glu-MDha+H] <sup>+</sup> C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	241.08190	227.06625	241.08190	227.06625	241.08190	227.06625	227.06625	241.08190	241.08190	255.09755	241.08190	227.06625	241.08190	
		[Adda + H - ROH - NH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O R=H (DMAdda), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdda)	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	
		[MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Arg: C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Tyr: C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> X=M(O): C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S X=Trp: C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Phe: C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	268.16568	254.14992	268.16568	268.16568	254.14992	254.14992	268.16568	254.14992	268.16568	268.16568	268.16568	282.18122	268.16568	
		[MDha-Ala-X-Me-Asp-Arg+2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> X=Arg: C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ou C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> X=Tyr: C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	277.15827	270.15045	277.15827	277.15827	270.15045	263.14262	270.15045	270.15045	263.14262	277.15827	270.15045	284.16610	277.15827	
		[Adda + H - ROH] <sup>+</sup> C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO R=H (DMAdda), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdda)	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	
		[Glu-MDha-Ala+H] <sup>+</sup> C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	284.12410	270.10845	284.12410	284.12410	270.10845	284.12410	270.10845	284.12410	270.10845	284.12410	270.10845	284.12410	284.12410	
		[MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Arg: C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Tyr: C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> X=M(O): C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S X=Trp: C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Phe: C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	285.19212	271.17647	285.19212	285.19212	271.17647	271.17647	285.19212	271.17647	285.19212	271.17647	271.17647	299.20777	285.19212	
		[Me-Asp-Arg+H] <sup>+</sup> C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	286.15098	286.15098	272.13533	286.15098	272.13533	286.15098	286.15098	272.13533	286.15098	272.13533	286.15098	286.15098	272.13533	
		[Arg-Adda-Glu+2H] <sup>2+</sup> Adda: R=CH <sub>3</sub> (C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> ) DMAdda: R=H (C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> ) ADMAdda: R=CH <sub>2</sub> C(O) (C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	300.18122	300.18122	300.18122	293.17339	293.17339	300.18122	300.18122	293.17339	314.17668	300.18122	307.18904	300.18122	300.18122	300.18122
		[Me-Asp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>2+</sup> = C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> [Adda + H] <sup>+</sup> (C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	303.17753	303.17753	289.16188	303.17753	303.17753	289.16188	303.17753	289.16188	303.17753	289.16188	303.17753	303.17753	289.16188	
		[DMAdda + H] <sup>+</sup> (C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) [ADMAdda + H] <sup>+</sup> (C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	314.21146	314.21146	314.21146	300.19581	314.21146	314.21146	342.20637	342.20637	342.20637	314.21146	314.21146	314.21146	314.21146	
		[HCO]-Glu-MDha-Ala-NH <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> - C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> [C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	329.14556	315.12991	329.14556	329.14556	315.12991	315.12991	329.14556	315.12991	315.12991	343.16121	329.14556	315.12991	329.14556	
			375.19145	361.17580	375.19145	375.19145	375.19145	375.19145	361.17580	375.19145	361.17580	369.20710	375.19145	361.17580	375.19145	

Composé parent → Composition de l'ion	MC-LR	[Dha] <sup>+</sup> -MC-LR	[Asp] <sup>+</sup> -MC-LR	[DMAdda] <sup>+</sup> -MC-LR	[DMAdda <sup>+</sup> Dha] <sup>+</sup> -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> Asp] <sup>+</sup> -MC-LR	[ADMAdda] <sup>+</sup> -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> Dha] <sup>+</sup> -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> Asp <sup>+</sup> ADMAdda] <sup>+</sup> -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> Dha] <sup>+</sup> -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> Glu(OMe)] <sup>+</sup> -MC-LR	MC-HIR	[Dha] <sup>+</sup> -MC-HIR	[D-Asp] <sup>+</sup> MC-HIR ou [D-Asp <sup>+</sup> E-Dha] <sup>+</sup> -MC-HIR
[X-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S X=Tpp: C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	382.20850	382.20850	368.19285	382.20850	382.20850	368.19285	382.20850	382.20850	368.19285	368.19285	368.19285	396.22415	396.22415	368.19285
[MeAsp-Arg-Adda <sup>+</sup> (ROH+H)-Glu-MDha+H] <sup>2+</sup> - C <sub>35</sub> H <sub>52</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	390.20796	383.20014	383.20014	383.20014	376.19231	383.20014	390.20796	383.20014	376.19231	376.19231	390.20796	390.20796	383.20014	383.20014
[Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S X=Tpp: C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	397.20816	383.19251	397.20816	397.20816	383.19251	383.19251	397.20816	383.19251	383.19251	383.19251	411.22381	411.22381	397.20816	411.22381
[MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S X=Tpp: C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	397.20816	383.19251	383.19251	397.20816	383.19251	369.17686	397.20816	383.19251	369.17686	369.17686	383.19251	411.22381	397.20816	383.19251
[X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S X=Tpp: C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	399.23505	399.23505	385.21939	399.23505	399.23505	385.21939	399.23505	399.23505	385.21939	385.21939	402.24649	413.25070	413.25070	385.21939
[X-MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S X=Tpp: C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	416.26159	416.26159	402.24649	416.26159	416.26159	402.24649	416.26159	416.26159	402.24649	402.24649	430.27779	430.27779	430.27779	416.26159
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH-OR] <sup>2+</sup> DMAdda R=H: C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> ; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> ; ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> X=Leu: C <sub>38</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>43</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>38</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> S X=Tpp: C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>43</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	430.74117	423.73334	423.73334	430.74117	423.73334	416.72552	430.74117	423.73334	416.72552	416.72552	430.74117	437.74899	430.74117	430.74117
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>34</sub> H <sub>50</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>40</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>39</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>34</sub> H <sub>50</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X=Tpp: C <sub>40</sub> H <sub>60</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>39</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	433.76036	426.75254	426.75254	426.75254	419.74471	426.75254	447.75782	447.75782	440.75000	426.75254	440.76819	440.76819	433.76036	440.76819

Composé parent → Composition de l'ion	MC-LR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> ·Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> ·Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> ·Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> ·Asp <sup>+</sup> ·ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> ·Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> ·Glu(OHMe) <sup>+</sup> ] -MC-LR	MC-HIR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR	[D-Asp <sup>+</sup> ·MC-HIR ou [D-Asp <sup>+</sup> ·E·Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 3H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>48</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=M(O): C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	442.27364	435.26581	435.26581	435.26581	427.75408	435.26581	449.26327	449.26327	435.26581	442.27364	449.26327	442.27364	449.26327
[C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> -Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	446.22856	432.21291	446.22856	446.22856	432.21291	432.21291	432.21291	432.21291	432.21291	460.24421	446.22856	432.21291	446.22856
[Arg-Adda-HNH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> Adda: R=CH <sub>3</sub> (C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> ) DMAAdda: R=H (C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> ) ADMAdda: R=CH <sub>2</sub> CO (C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> )	453.28602	453.28602	453.28602	439.27037	439.27037	453.28602	481.28093	481.28093	453.28602	453.28602	453.28602	453.28602	453.28602
[O=C-Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>48</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	455.76718	448.75936	448.75936	448.75936	441.75153	448.75936	462.75682	462.75682	448.75936	455.76718	462.77501	448.75936	462.77501
[X-Me-Asp-Arg-Adda-Glu-MDha + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>48</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	463.76310	455.75528	455.75528	455.75528	448.74745	455.75528	469.75274	469.75274	448.74745	463.76310	469.77093	463.76310	463.76310
[Me-Asp-Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR+H)] <sup>+</sup> - C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	465.28200	465.28200	451.26635	465.28200	465.28200	451.26635	465.28200	451.26635	451.26635	451.26635	465.28200	465.28200	451.26635
[M + 2 H - (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C=NH] <sup>2+</sup> = [M - CH <sub>3</sub> N] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>48</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> S X=Trp: C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	468.75749	461.74966	461.74966	461.74966	454.74184	461.74966	475.74712	475.74712	454.74184	468.75749	475.76531	468.75749	468.75749
[Ala-X-Me-Asp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	470.27216	470.27216	456.25651	470.27216	470.27216	442.24086	470.27216	470.27216	456.25651	456.25651	484.28781	484.28781	470.27216
[Arg-Adda + H] <sup>+</sup> - C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	470.31257	470.31257	470.31257	456.29692	456.29692	470.31257	498.30748	498.30748	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257
[M + 2 H - COOH] <sup>2+</sup> = [M + H - CO <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>48</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	475.76283	468.77501	468.77501	468.77501	461.76718	461.76718	482.77247	482.77247	461.76718	475.76283	482.79066	475.76283	475.76283
[M + 2 H - ROH] <sup>2+</sup> - Adda: [M - CH <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>48</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	482.26855	475.26073	475.26073	475.26073	468.25903	468.25903	475.26073	475.26073	468.25903	482.26855	489.27638	482.26855	482.26855

Composé parent → Composition de l'ion	MC-LR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> , Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> , Asp <sup>+</sup> , ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , Glu(OMe) <sup>+</sup> ] -MC-LR	MC-HIR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR	[D-Asp <sup>+</sup> ]-MC-HIR ou [D-Asp <sup>+</sup> , E-Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR
[M + 2 H - CO] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>68</sub> H <sub>116</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>117</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>120</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>117</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>121</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	484.28420	477.27638	477.27638	477.27638	477.27638	470.26855	487.29871	491.27384	487.29871	487.29871	470.26855	484.28420	491.29203	484.28420	484.28420
[Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>28</sub> H <sub>49</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>29</sub> H <sub>51</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>29</sub> H <sub>51</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>29</sub> H <sub>51</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	487.29871	487.29871	473.26306	487.29871	487.29871	487.29871	487.29871	473.26306	487.29871	487.29871	473.26306	473.26306	501.31436	501.31436	487.29871
[M + 2 H - NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> ; [M - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>68</sub> H <sub>117</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>118</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>68</sub> H <sub>117</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>121</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	488.76839	482.76056	482.76056	482.76056	482.76056	475.75274	487.29871	496.75802	487.29871	487.29871	475.75274	488.76839	496.77621	488.76839	489.76839
[M + 2 H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>68</sub> H <sub>118</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>119</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>68</sub> H <sub>118</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>122</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	498.28166	491.27384	491.27384	491.27384	491.27384	484.26601	498.28166	505.27129	498.28166	498.28166	484.26601	498.28166	505.27129	498.28166	498.28166
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>28</sub> H <sub>49</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>29</sub> H <sub>51</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>29</sub> H <sub>51</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>29</sub> H <sub>51</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	525.31436	511.29871	511.29871	525.31436	511.29871	511.29871	487.28306	511.29871	511.29871	487.28306	497.28306	511.29871	539.33001	525.31436	525.31436
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>28</sub> H <sub>47</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>27</sub> H <sub>47</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	536.28272	522.26707	522.26707	536.28272	522.26707	522.26707	539.29362	522.26707	522.26707	539.29362	508.25142	522.26707	550.29837	536.28272	536.28272
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>28</sub> H <sub>49</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=Arg: C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=Tyr: C <sub>29</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>27</sub> H <sub>49</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>29</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>29</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	553.30927	539.29362	539.29362	553.30927	539.29362	539.29362	553.30927	539.29362	539.29362	553.30927	525.27797	539.29362	567.32895	553.30927	553.30927
[Arg-Adda-Glu + H - COOH] <sup>+</sup> ; C <sub>59</sub> H <sub>100</sub> N <sub>10</sub> O <sub>4</sub> [MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)] <sup>+</sup> ; C <sub>59</sub> H <sub>101</sub> N <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	554.35751	554.35751	554.35751	540.34186	540.34186	540.34186	554.35751	582.35242	582.35242	554.35751	554.35751	568.37316	554.35751	554.35751	554.35751
	567.32895	567.32895	553.31330	567.32895	567.32895	567.32895	553.31330	567.32895	567.32895	553.31330	553.31330	553.31330	567.32895	567.32895	553.31330

Composé parent → Composition de l'ion	MC-LR	[Dha] <sup>+</sup> -MC-LR	[Asp] <sup>-</sup> -MC-LR	[DMAAdda] <sup>+</sup> -MC-LR	[DMAAdda] <sup>+</sup> -MC-LR	[ADMAdda] <sup>+</sup> -MC-LR	[ADMAdda] <sup>+</sup> -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> , Asp <sup>+</sup> , ADMAdda] <sup>+</sup> -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , Glu(OMe) <sup>+</sup> -MC-LR	MC-HIR	[Dha] <sup>+</sup> -MC-HIR	[D-Asp] <sup>-</sup> , MC-HIR ou [D-Asp <sup>+</sup> , E-Dha] <sup>+</sup> -MC-HIR
(MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> + H] <sup>+</sup> X = Leu; C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X = Arg; C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr; C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X = M(O); C <sub>29</sub> H <sub>54</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp; C <sub>31</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X = Phe; C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	570.33582	556.32017	556.32017	570.33582	556.32017	556.32017	556.32017	542.30452	542.30452	556.32017	584.35147	570.33582	570.33582
[Arg-Adda-Glu + H - COJ] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	571.36025	571.36025	571.36025	557.34460	557.34460	559.35516	559.35516	599.35516	571.36025	565.37590	571.36025	571.36025	571.36025
[Arg-Adda-Glu-H <sup>+</sup> - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	582.32861	582.32861	582.32861	568.31296	568.31296	610.32353	610.32353	610.32353	582.32861	596.34426	582.32861	582.32861	582.32861
[Arg-Adda-(ROH)-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	597.33951	583.32386	583.32386	583.32386
[MeAsp-Arg-Adda-(Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-H-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459	594.32459
[Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	597.32828	597.32828	597.32828	583.31263	583.31263	625.32319	625.32319	611.30754	583.31263	611.34983	597.32828	597.32828	597.32828
[Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	598.35516	598.35516	598.35516	585.33951	585.33951	627.35007	627.35007	627.35007	598.35516	613.37081	599.35516	599.35516	599.35516
[Arg-Adda-(Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-Glu-MDha-Ala + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	619.35622	605.34057	619.35622	619.35622	605.34057	619.35622	619.35622	619.35622	605.34057	633.37187	619.35622	619.35622	619.35622
[Arg-Adda-(Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-Glu-MDha-Ala + 3H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	620.36405	606.34840	620.36405	620.36405	606.34840	620.36405	620.36405	620.36405	606.34840	634.37970	620.36405	620.36405	620.36405
[Arg-Adda-Glu-MDha + H - COJ] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	654.39736	640.38171	654.39736	640.38171	626.36606	654.39736	654.39736	654.39736	640.38171	668.41301	654.39736	654.39736	654.39736
[MeAsp-Arg-Adda-(Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-H-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	677.36170	663.34605	663.34605	677.36170	663.34605	677.36170	663.34605	663.34605	649.33040	677.36170	677.36170	663.34605	663.34605
[Glu-MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X = Leu; C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X = Arg; C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr; C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X = M(O); C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp; C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X = Phe; C <sub>34</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	682.35187	668.33622	668.33622	682.35187	668.33622	682.35187	682.35187	682.35187	654.32057	682.35187	696.36752	682.35187	682.35187
[Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	682.39227	668.37662	682.39227	668.37662	654.36097	710.38719	710.38719	710.38719	668.37662	696.40792	682.39227	668.37662	682.39227
[C <sub>1</sub> -H <sub>2</sub> -O-Glu-MDha-Ala-X-Measp + H] <sup>+</sup> X = Leu; C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X = Arg; C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X = Tyr; C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> X = M(O); C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S X = Trp; C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> X = Phe; C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	688.35522	674.33957	674.33957	688.35522	674.33957	688.35522	688.35522	688.35522	660.32392	688.35522	702.37087	688.35522	688.35522
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH)-Glu] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	696.37154	686.37154	682.35589	696.37154	686.37154	682.35589	682.35589	682.35589	682.35589	696.37154	696.37154	686.37154	682.35589
[Adda-Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X = Leu; C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X = Arg; C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr; C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X = M(O); C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp; C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X = Phe; C <sub>34</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	710.41234	696.39669	710.41234	696.39669	682.38104	696.39669	696.39669	724.39161	696.39669	724.42799	724.42799	710.41234	724.42799
[MeAsp-Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	728.39775	728.39775	714.38210	714.38210	714.38210	742.37702	742.37702	742.37702	714.38210	714.38210	728.39775	728.39775	714.38210
[Ala-X-MeAsp-Arg-Adda-(ROH) + H] <sup>+</sup> X = Leu; C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X = Arg; C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr; C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X = M(O); C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp; C <sub>34</sub> H <sub>56</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X = Phe; C <sub>34</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	751.45012	751.45012	737.43447	751.45012	751.45012	751.45012	751.45012	723.41882	751.45012	737.43447	765.46577	765.46577	751.45012
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	753.42839	738.41374	753.42839	738.41374	725.39809	739.41374	739.41374	767.40865	738.41374	767.44504	753.42839	738.41374	753.42839
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	754.43721	740.42156	754.43721	740.42156	726.40591	740.42156	740.42156	782.43213	740.42156	768.45286	754.43721	740.42156	754.43721
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH)-Glu-MDha] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	779.40865	765.39300	765.39300	779.40865	765.39300	765.39300	765.39300	765.39300	765.39300	779.40865	779.40865	765.39300	765.39300
[MeAsp-Arg-Adda-Glu-MDha + H - COJ] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	783.43995	769.42430	769.42430	769.42430	755.40865	769.42430	769.42430	797.41922	769.42430	783.43995	783.43995	769.42430	769.42430

Composé parent → Composition de l'ion	MC-LR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMDAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> , Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> , Asp <sup>+</sup> , ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , Glu(OMe) <sup>+</sup> ] -MC-LR	MC-HIR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR	[D-Asp <sup>+</sup> ]-MC-HIR ou [D-Asp <sup>+</sup> , E-Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR
[Ala-X-Me-Asp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Arg: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Tyr: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub>	783.47634	783.47634	769.46069	769.46069	769.46069	769.46069	755.44504	811.47125	797.45560	811.47125	797.45560	769.46069	769.46069	797.49199	797.49199	783.47634
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR - (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CNH] <sup>+</sup> - Adda: [M - C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>1</sub> O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>49</sub> H <sub>83</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub>	802.43463	788.41888	788.41888	802.43463	802.43463	788.41888	774.40323	788.41888	788.41888	788.41888	774.40323	774.40323	802.43463	816.46018	802.43463	802.43463
[Adda(-ROH+H)-Glu-MDha-Ala-X-Me-Asp] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	807.42872	793.41307	793.41307	807.42872	807.42872	793.41307	779.39742	793.41307	793.41307	793.41307	779.39742	779.39742	807.42872	821.44437	807.42872	807.42872
[Adda(-ROH+H)-Glu-MDha-Ala-X-Me-Asp + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	808.43654	794.42089	794.42089	808.43654	808.43654	794.42089	780.40524	794.42089	794.42089	794.42089	780.40524	780.40524	808.43654	822.45219	808.43654	808.43654
[Me-Asp-Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	811.43487	797.41922	797.41922	797.41922	797.41922	783.40357	797.41922	825.41413	825.41413	825.41413	825.41413	783.40357	811.43487	811.43487	797.41922	797.41922
[MDha-Ala-X-Me-Asp-Arg-Adda(-ROH)+ H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> X=M(O): C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> S X=Trp: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	834.48724	820.47159	820.47159	820.47159	820.47159	806.45594	806.45594	848.46650	848.46650	848.46650	834.45085	806.45594	820.47159	848.50289	834.48724	834.48724
[MDha-Ala-X-Me-Asp-Arg-Adda + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> X=Arg: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> X=Tyr: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>43</sub> H <sub>71</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	838.51854	824.50289	824.50289	824.50289	824.50289	810.48724	810.48724	852.49780	852.49780	852.49780	838.48215	810.48724	824.50289	852.53419	838.51854	838.51854
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> X=Arg: C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> X=Tyr: C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	838.51854	824.50289	838.51854	824.50289	824.50289	810.48724	824.50289	866.51345	866.51345	866.51345	852.49780	824.50289	852.53419	852.53419	838.51854	852.53419

Composé parent → Composition de l'ion	MC-LR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> , Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> , Asp <sup>+</sup> , ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> , Glu(OMe) <sup>+</sup> ] -MC-LR	MC-HIR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR	[D-Asp <sup>+</sup> , MC-HIR ou [D-Asp <sup>+</sup> , E-Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR
[Adda-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X = M(O): C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X = Trp: C <sub>68</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	839.45493	825.43928	825.43928	825.43928	811.42363	811.42363	867.44985	853.43420	839.41855	811.42363	839.45493	853.47058	839.45493	839.45493
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> - Adda: [M - C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>68</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	844.45633	830.44068	830.44068	844.45633	830.44068	816.42503	844.45633	830.44068	816.42503	816.42503	844.45633	858.47198	844.45633	844.45633
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)-Glu-MDha-Ala] <sup>+</sup> - C <sub>62</sub> H <sub>99</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> [M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>+</sup> - Adda: [M - C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>68</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	850.44577	836.43012	836.43012	850.44577	836.43012	822.41447	850.44577	836.43012	822.41447	822.41447	850.44577	850.44577	836.43012	836.43012
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X = M(O): C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X = Trp: C <sub>68</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	861.48288	847.46723	847.46723	861.48288	847.46723	833.45158	861.48288	847.46723	833.45158	833.45158	861.48288	875.49853	861.48288	861.48288
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X = M(O): C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X = Trp: C <sub>68</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	866.51345	852.49780	852.49780	852.49780	838.48215	838.48215	894.50837	880.49272	866.47707	838.48215	852.49780	880.52910	866.51345	866.51345
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + 2H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X = M(O): C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X = Trp: C <sub>68</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	867.52128	853.50563	867.52128	853.50563	839.48998	853.50563	895.51619	881.50054	881.50054	853.50563	881.53693	881.53693	867.52128	881.53693
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X = M(O): C <sub>64</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X = Trp: C <sub>68</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	883.54000	869.52435	869.52435	869.52435	855.50870	855.50870	911.53492	897.51927	883.50362	855.50870	869.52435	897.55565	883.54000	883.54000

Composé parent →		MC-LR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[DMAAdda <sup>+</sup> Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> Asp <sup>+</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[ADMAdda <sup>+</sup> Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Gly <sup>+</sup> Asp <sup>+</sup> ADMAdda <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> Dha <sup>+</sup> ] -MC-LR	[Asp <sup>+</sup> Glu(OMe) <sup>+</sup> ] -MC-LR	MC-HIR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR	[D-Asp <sup>+</sup> MC-HIR ou [D-Asp <sup>+</sup> E-Dha <sup>+</sup> ] -MC-HIR	
Composition de l'ion																	
[M + H - COOH] <sup>+</sup> - [M - CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>129</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>		950.55839	936.54274	936.54274	936.54274	922.52709	922.52709	922.52709	964.53766	964.53766	964.53766	950.52201	922.52709	950.55839	964.57404	950.55839	950.55839
[M + H - COI] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>129</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		967.56113	953.54648	953.54648	953.54648	939.52983	939.52983	939.52983	981.54039	981.54039	981.54039	967.52474	939.52983	967.56113	981.57678	967.56113	967.56113
[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> - [M - OH] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>68</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>127</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>129</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		977.54548	963.52983	963.52983	963.52983	949.51418	949.51418	949.51418	991.52474	991.52474	991.52474	977.50909	949.51418	977.54548	991.56113	977.54548	977.54548
[M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> - [M - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>68</sub> H <sub>127</sub> N <sub>9</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>127</sub> N <sub>12</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>127</sub> N <sub>9</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>9</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>129</sub> N <sub>9</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>9</sub> O <sub>12</sub>		978.52950	964.51385	964.51385	964.51385	950.49820	950.49820	950.49820	992.50876	992.50876	992.50876	978.49311	950.49820	978.52950	992.54515	978.52950	978.52950
[M + H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAAdda R=H: C <sub>67</sub> H <sub>10</sub> ; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>67</sub> H <sub>11</sub> O; ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>108</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>65</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>109</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		430.23719	423.22943	423.22943	423.22943	423.22943	423.22943	416.22154	423.22943	423.22943	423.22943	416.22154	416.22154	430.23719	437.24502	430.23719	430.23719
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAAdda R=H: C <sub>67</sub> H <sub>10</sub> ; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>67</sub> H <sub>11</sub> O; ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>108</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>65</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>109</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>		430.74117	423.73340	423.73340	423.73340	423.73340	423.73340	416.72552	423.73340	423.73340	423.73340	416.72552	416.72552	430.74117	437.74899	430.74117	430.74117
[M + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>128</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>129</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>		995.55604	981.54039	981.54039	981.54039	967.52474	967.52474	967.52474	1009.53531	1009.53531	1009.53531	995.51966	967.52474	995.55604	1009.57169	995.55604	995.55604
[M + 2 H - 2NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> (MC-RR et dérivés) MC-RR=C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[M + 2 H - 2NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> - XY = RR M = MC-RR: C <sub>68</sub> H <sub>127</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Composé parent → Composition de l'ion	MC-YR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-YR	[Asp <sup>-</sup> ]MC-YR	[DMAAdda <sup>5+</sup> ]MC-YR	[D-Asp <sup>-</sup> , Dha <sup>+</sup> ]MC-YR	[D-Asp <sup>-</sup> , DMAAdda <sup>5+</sup> ]MC-YR	MC-HyR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[DMAAdda <sup>5+</sup> , Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[Asp <sup>-</sup> , Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[Asp <sup>-</sup> ]MC-HyR
[Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> OR R=H (DMAAdda), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdda)	135.08044	135.08044	135.08044	121.06479	135.08044	121.06479	135.08044	135.08044	121.06479	135.08044	135.08044
[MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	155.08150	141.06585	155.08150	155.08150	141.06585	155.08150	155.08150	141.06585	141.06585	155.08150	155.08150
[Arg + H] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839
[Ala-X + H - C=O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O X=Arg: C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O X=Tyr: C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> X=M(O): C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S X=Trp: C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O X=Phe: C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	207.11280	207.11280	207.11280	207.11280	207.11280	207.11280	221.12845	221.12845	221.12845	221.12845	221.12845
[C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O + H] <sup>+</sup>	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174
[Arg + NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> 2H] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494
[Glu-MDha + H - NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	196.06043	182.04478	196.06043	196.06043	182.04478	196.06043	196.06043	182.04478	182.04478	196.06043	196.06043
[Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	213.06698	199.07133	213.06698	213.06698	199.07133	213.06698	213.06698	199.07133	199.07133	213.06698	213.06698
[O=C-Glu-MDha+H] <sup>+</sup> C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	241.08190	227.06625	241.08190	241.08190	227.06625	241.08190	241.08190	227.06625	227.06625	241.08190	241.08190
[Adda + H - ROH - NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O R=H (DMAAdda), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdda)	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869
[MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Arg: C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Tyr: C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> X=M(O): C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S X=Trp: C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Phe: C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	318.14483	304.12918	318.14483	318.14483	304.12918	318.14483	332.16048	318.14483	318.14483	318.14483	332.16048
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg+2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=Arg: C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ou C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=Tyr: C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	302.14791	295.14008	295.14008	302.14791	288.13226	295.14008	309.15573	302.14791	302.14791	295.14008	302.14791
[Adda + H - ROH] <sup>+</sup> C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O R=H (DMAAdda), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdda)	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524
[Glu-MDha-Ala+H] <sup>+</sup> C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	284.12410	270.10845	284.12410	284.12410	270.10845	284.12410	284.12410	270.10845	270.10845	284.12410	284.12410
[MDha-Ala-X-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Arg: C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Tyr: C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> X=M(O): C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S X=Trp: C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Phe: C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	335.17138	321.15573	335.17138	335.17138	321.15573	335.17138	349.18703	335.17138	335.17138	349.18703	349.18703
[MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup> C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	286.15098	286.15098	272.13533	286.15098	272.13533	272.13533	286.15098	286.15098	286.15098	272.13533	272.13533
[Arg-Adda-Glu+2H] <sup>2+</sup> Adda: R=CH <sub>3</sub> (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) DMAAdda: R=H (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) ADMAdda: R=CH <sub>2</sub> C(O) (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	300.18122	300.18122	300.18122	293.17339	300.18122	293.17339	300.18122	300.18122	293.17339	300.18122	300.18122
[MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> + 2H] <sup>2+</sup> = C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [Adda + H] <sup>+</sup> (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	303.17753	303.17753	289.16188	303.17753	289.16188	289.16188	303.17753	303.17753	303.17753	289.16188	289.16188
[DMAAdda + H] <sup>+</sup> (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	314.21146	314.21146	314.21146	300.19581	314.21146	300.19581	314.21146	314.21146	300.19581	314.21146	314.21146
[ADMAdda + H] <sup>+</sup> (C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	329.14556	315.12991	329.14556	329.14556	315.12991	329.14556	329.14556	315.12991	315.12991	329.14556	329.14556
[HC(O)-Glu-MDha-Ala-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> + H] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> [C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	375.19145	361.17580	375.19145	375.19145	361.17580	361.17580	375.19145	361.17580	361.17580	375.19145	375.19145

Composé parent →	MC-YR	[Dha <sup>1</sup> ]-MC-YR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-YR	[DMAAdda <sup>5</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>7</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>7</sup> , DMAAdda <sup>5</sup> ]-MC-YR	MC-HyR	[Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[DMAAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-HyR	
[X-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=MIO: C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	432.18776	432.18776	418.17211	432.18776	418.17211	418.17211	446.20341	446.20341	446.20341	432.18776	432.18776	432.18776
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)-Glu-MDha+H] <sup>2+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>63</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	390.20796	383.20014	383.20014	390.20796	383.20014	383.20014	390.20796	383.20014	383.20014	376.19231	383.20014	383.20014
[Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> X=MIO: C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	447.18743	433.17178	447.18743	447.18743	433.17178	447.18743	461.20308	447.18743	447.18743	447.18743	461.20308	461.20308
[MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> X=MIO: C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	447.18743	433.17178	433.17178	447.18743	419.15613	433.17178	461.20308	447.18743	447.18743	433.17178	447.18743	447.18743
[X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=MIO: C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	449.21431	449.21431	435.19866	449.21431	435.19866	435.19866	463.22986	463.22986	463.22986	449.21431	449.21431	449.21431
[X-MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=MIO: C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	466.24086	466.24086	452.22576	466.24086	452.22576	452.22576	480.25651	480.25651	480.25651	466.24086	466.24086	466.24086
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAAdda R=H: C <sub>37</sub> H <sub>57</sub> O <sub>9</sub> ; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>37</sub> H <sub>55</sub> O <sub>9</sub> ; ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>39</sub> H <sub>57</sub> O <sub>9</sub> X=Leu: C <sub>40</sub> H <sub>63</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>40</sub> H <sub>63</sub> N <sub>12</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>43</sub> H <sub>59</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=MIO: C <sub>43</sub> H <sub>57</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>45</sub> H <sub>59</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>43</sub> H <sub>57</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	455.73079	448.72297	448.72297	455.73079	441.71515	448.72297	462.73862	455.73079	455.73079	448.72297	455.73079	455.73079
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>44</sub> H <sub>69</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>44</sub> H <sub>69</sub> N <sub>15</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>47</sub> H <sub>65</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X=MIO: C <sub>47</sub> H <sub>63</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>49</sub> H <sub>65</sub> N <sub>14</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>47</sub> H <sub>63</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	458.75000	451.74217	458.75000	451.74217	451.74217	451.74217	465.75782	458.75000	451.74217	451.74217	465.75782	465.75782

Composé parent →		MC-YR	[Dha <sup>1</sup> ]-MC-YR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-YR	[DMAdda <sup>5</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>7</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>7</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>7</sup> , DMAdda <sup>5</sup> ]-MC-YR	MC-HyR	[Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-HyR
Composition de l'iron		467.26327	460.25545	467.26327	460.25545	460.25545	460.25545	460.25545	474.27110	467.26327	467.26327	467.26327	474.27110
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 3H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>12</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>12</sub> N <sub>13</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Met: C <sub>64</sub> H <sub>12</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>16</sub> N <sub>11</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>		446.22856	432.21291	446.22856	446.22856	432.21291	432.21291	446.22856	446.22856	432.21291	432.21291	432.21291	432.21291
[Arg-Adda-H-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> Adda: R=CH <sub>3</sub> (C <sub>25</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ) DMAdda: R=H (C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ) ADMAdda: R=CH <sub>2</sub> C(O) (C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )		453.28602	453.28602	453.28602	439.27037	439.27037	453.28602	439.27037	439.27037	453.28602	453.28602	453.28602	453.28602
[O-C-Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> X=Met: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>		480.75682	473.74899	480.75682	473.74899	466.74117	473.74899	473.74899	487.76464	480.75682	480.75682	480.75682	487.76464
[X-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MDha + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>15</sub> X=Met: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>15</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>11</sub> O <sub>14</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub>		487.75274	480.74491	480.74491	480.74491	487.75274	487.75274	487.75274	494.76056	487.75274	480.74491	480.74491	487.75274
[MeAsp-Arg-Adda-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR+H] <sup>+</sup> - C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		465.28200	465.28200	451.26635	465.28200	465.28200	451.26635	451.26635	465.28200	465.28200	451.26635	451.26635	
[M + 2 H - (NH <sub>2</sub> )C=NH] <sup>2+</sup> = [M - CH <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>16</sub> X=Met: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>16</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>11</sub> O <sub>15</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>15</sub>		494.74712	486.73929	466.73929	486.73929	479.73147	479.73147	479.73147	500.75494	493.74712	486.73929	486.73929	493.74712
[Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=Met: C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>		520.25142	520.25142	506.23577	520.25142	520.25142	506.23577	506.23577	534.26707	534.26707	534.26707	520.25142	520.25142
[Arg-Adda + H] <sup>+</sup> - C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		470.31257	470.31257	470.31257	456.29692	456.29692	470.31257	456.29692	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	
[M + 2 H - COOH] <sup>2+</sup> = [M + H - CO <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> X=Met: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>		500.77247	494.76464	494.76464	494.76464	486.75682	486.75682	486.75682	507.78029	500.77247	494.76464	494.76464	500.77247
[M + 2 H - ROH] <sup>2+</sup> - Adda: [M - CH <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>15</sub> X=Met: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>15</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>11</sub> O <sub>14</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>21</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub>		507.25819	500.25036	500.25036	507.25819	500.25036	493.24254	493.24254	514.26601	507.25819	507.25819	500.25036	507.25819

Composé parent →	MC-YR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-YR	[Asp <sup>3</sup> ]MC-YR	[DMAdda <sup>5</sup> ]MC-YR	[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>3</sup> , DMAdda <sup>5</sup> ]-MC-YR	MC-HyR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[DMAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ]MC-HyR	[Asp <sup>3</sup> ]MC-HyR
Composition de l'iron]											
[M + 2 H - CO] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>53</sub> H <sub>79</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>52</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>53</sub> H <sub>79</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>53</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	509.27384	502.26601	502.26601	502.26601	495.25819	495.25819	516.28166	509.27384	502.26601	502.26601	516.28166
[Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>37</sub> H <sub>57</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>42</sub> H <sub>60</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>41</sub> H <sub>59</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>42</sub> H <sub>60</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>42</sub> H <sub>58</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	537.27797	523.26232	523.26232	537.27797	523.26232	523.26232	551.29362	537.27797	551.29362	537.27797	551.29362
[M + 2 H - NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> - [M - NH] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>40</sub> H <sub>62</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>40</sub> H <sub>61</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>45</sub> H <sub>63</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>44</sub> H <sub>62</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>45</sub> H <sub>63</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>45</sub> H <sub>61</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	514.75802	507.75019	507.75019	507.75019	500.74237	500.74237	521.76584	514.75802	500.74237	500.74237	514.75802
[M + 2 H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>53</sub> H <sub>79</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>52</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>53</sub> H <sub>79</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>53</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	523.27129	516.26347	516.26347	516.26347	509.25564	509.25564	530.27912	523.27129	516.26347	516.26347	523.27129
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>23</sub> H <sub>41</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>27</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	575.29362	561.27797	561.27797	575.29362	547.26232	547.26232	589.30983	561.27797	575.29362	561.27797	575.29362
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> X=Arg: C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> X=Tyr: C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>29</sub> H <sub>45</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	586.26199	572.24634	572.24634	586.26199	555.23069	555.23069	600.27764	572.24634	586.26199	572.24634	586.26199
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> X=Arg: C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> X=Tyr: C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>28</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	603.28854	589.27289	589.27289	603.28854	575.25724	575.25724	617.30419	603.28854	603.28854	589.27289	603.28854
[Arg-Adda-Glu + H - COOH] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>4</sub> [MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	540.34186 567.32895	554.35751 553.31330	540.34186 567.32895	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	540.34186 567.32895	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895

Composé parent →		MC-YR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-YR	[Asp <sup>-</sup> ]MC-YR	[DMAAdda <sup>±</sup> ]MC-YR	[D-Asp <sup>-</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-YR	[D-Asp <sup>-</sup> , DMAAdda <sup>±</sup> ] -MC-YR	MC-HyR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[DMAAdda <sup>±</sup> , Dha <sup>+</sup> ] -MC-HyR	[Asp <sup>-</sup> , Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[Asp <sup>-</sup> ]MC-HyR	
Composition de l'ion													
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H <sup>+</sup> ] X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>67</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		620.31509	606.29944	606.29944	620.31509	606.29944	592.28379	606.29944	634.33128	620.31509	606.29944	606.29944	620.31509
[Arg-Adda-Glu + H - CO] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		571.36025	571.36025	571.36025	557.34460	557.34460	571.36025	557.34460	571.36025	557.34460	571.36025	571.36025	
[Arg-Adda-Glu-H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>54</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>		582.32861	582.32861	582.32861	568.31296	568.31296	582.32861	568.31296	582.32861	568.31296	582.32861	582.32861	
[Arg-Adda(-ROH)-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		583.32386	583.32386	583.32386	563.32386	563.32386	583.32386	563.32386	583.32386	563.32386	583.32386	583.32386	
[MeAsp-Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR-H)-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		594.32459	594.32459	594.32459	574.32459	574.32459	594.32459	574.32459	594.32459	574.32459	594.32459	594.32459	
[Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>		597.32828	597.32828	597.32828	583.31263	583.31263	597.32828	583.31263	597.32828	583.31263	597.32828	597.32828	
[Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>54</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>		599.35516	599.35516	599.35516	585.33951	585.33951	599.35516	585.33951	599.35516	585.33951	599.35516	599.35516	
[Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-Glu-MDha-Ala + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>		619.35622	619.35622	619.35622	619.35622	619.35622	619.35622	619.35622	619.35622	619.35622	619.35622	619.35622	
[Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-Glu-MDha-Ala + 3H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>		620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	
[Arg-Adda-Glu-MDha + H - CO] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>		654.39736	640.38171	654.39736	640.38171	640.38171	654.39736	640.38171	654.39736	640.38171	654.39736	654.39736	
[MeAsp-Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR-H)-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		677.36170	663.34605	677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	
[Glu-MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>67</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		732.33113	718.31548	718.31548	732.33113	718.31548	704.29983	718.31548	746.34678	732.33113	718.31548	732.33113	
[Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>		682.39227	688.37662	682.39227	668.37662	668.37662	682.39227	682.39227	682.39227	668.37662	682.39227	682.39227	
[C <sub>1</sub> -H <sub>1</sub> O-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>67</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		738.33448	724.31883	724.31883	738.33448	738.33448	710.30318	738.33448	752.35013	738.33448	724.31883	738.33448	
[MeAsp-Arg-Adda(-ROH-H)-Glu] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	
[Adda-Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>67</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		760.39161	746.37696	760.39161	746.37696	746.37696	746.37696	746.37696	774.40726	760.39161	746.37696	774.40726	
[MeAsp-Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		728.39775	728.39775	728.39775	714.38210	714.38210	728.39775	728.39775	728.39775	714.38210	728.39775	728.39775	
[Ala-X-MeAsp-Arg-Adda(-ROH) + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>67</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		801.42939	801.42939	801.42939	801.42939	801.42939	787.41374	801.42939	815.44504	801.42939	801.42939	801.42939	
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		753.42939	739.41374	753.42939	739.41374	739.41374	739.41374	753.42939	739.41374	739.41374	739.41374	753.42939	
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		754.43721	740.42156	754.43721	740.42156	740.42156	740.42156	754.43721	740.42156	740.42156	740.42156	754.43721	
[MeAsp-Arg-Adda(-ROH-H)-Glu-MDha] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		779.40865	765.39300	765.39300	779.40865	765.39300	779.40865	765.39300	779.40865	765.39300	779.40865	765.39300	
[MeAsp-Arg-Adda-Glu-MDha + H - CO] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>		783.43995	769.42430	769.42430	769.42430	769.42430	769.42430	783.43995	769.42430	769.42430	769.42430	769.42430	

Composé parent →		MC-YR	[Dha <sup>1</sup> ]-MC-YR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-YR	[Dhha <sup>5</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>7</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>7</sup> , DMAdda <sup>1</sup> ]-MC-YR	MC-HyR	[Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[DMAdda <sup>1</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-HyR	
Composition de l'iron]													
[Ala-X-MeAsp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>107</sub> N <sub>14</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>109</sub> N <sub>14</sub> O <sub>9</sub> X=M(O): C <sub>33</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S X=Trp: C <sub>107</sub> H <sub>141</sub> N <sub>19</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>93</sub> H <sub>115</sub> N <sub>17</sub> O <sub>8</sub>		833.45560	833.45560	819.43995	819.43995	819.43995	819.43995	805.42430	847.47125	847.47125	833.45560	833.45560	833.45560
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR - (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CNH <sup>+</sup> - Adda: [M - C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>59</sub> H <sub>89</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>93</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>95</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>33</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>107</sub> H <sub>141</sub> N <sub>19</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>93</sub> H <sub>115</sub> N <sub>17</sub> O <sub>11</sub>		852.41380	838.39815	838.39815	852.41380	838.39815	838.39815	838.39815	866.42945	852.41380	852.41380	838.39815	852.41380
[Adda(-ROH+H)-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>67</sub> H <sub>102</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>107</sub> H <sub>141</sub> N <sub>19</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>93</sub> H <sub>115</sub> N <sub>17</sub> O <sub>10</sub>		857.40798	843.39233	843.39233	857.40798	843.39233	843.39233	843.39233	871.42363	857.40798	843.39233	843.39233	857.40798
[Adda(-ROH+H)-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>67</sub> H <sub>102</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>107</sub> H <sub>141</sub> N <sub>19</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>93</sub> H <sub>115</sub> N <sub>17</sub> O <sub>10</sub>		858.41581	844.40016	844.40016	858.41581	844.40016	844.40016	844.40016	872.43146	858.41581	844.40016	844.40016	858.41581
[MeAsp-Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>2+</sup> - C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>14</sub> O <sub>10</sub>		811.43487	797.41922	797.41922	797.41922	797.41922	797.41922	811.43487	797.41922	797.41922	797.41922	797.41922	
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda(-ROH+ H)] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>99</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>103</sub> N <sub>11</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>105</sub> N <sub>11</sub> O <sub>9</sub> X=M(O): C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S X=Trp: C <sub>107</sub> H <sub>141</sub> N <sub>19</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>93</sub> H <sub>115</sub> N <sub>17</sub> O <sub>8</sub>		884.46650	870.45085	870.45085	870.45085	870.45085	870.45085	870.45085	898.48215	884.46650	870.45085	870.45085	884.46650
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X=Arg: C <sub>68</sub> H <sub>102</sub> N <sub>11</sub> O <sub>8</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>104</sub> N <sub>11</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>107</sub> H <sub>141</sub> N <sub>19</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>93</sub> H <sub>114</sub> N <sub>17</sub> O <sub>7</sub>		888.49780	874.48215	874.48215	874.48215	860.46650	860.46650	860.46650	902.51345	888.49780	874.48215	874.48215	888.49780
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>67</sub> H <sub>102</sub> N <sub>11</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>11</sub> O <sub>9</sub> X=M(O): C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S X=Trp: C <sub>107</sub> H <sub>141</sub> N <sub>19</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>93</sub> H <sub>115</sub> N <sub>17</sub> O <sub>8</sub>		888.49780	874.48215	888.49780	874.48215	860.46650	860.46650	874.48215	902.51345	888.49780	874.48215	888.49780	902.51345

Composé parent → Composition de l'ion	MC-YR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-YR	[Asp <sup>+</sup> ]MC-YR	[DMAAdda <sup>+</sup> ]MC-YR	[D-Asp <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>+</sup> , DMAAdda <sup>+</sup> ]-MC-YR	MC-HyR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[DMAAdda <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[Asp <sup>+</sup> ]MC-HyR
[Adda-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X = M(O): C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> S X = Trp: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub>	889.43420	875.41855	875.41855	875.41855	861.40290	861.40290	903.44948	889.43420	875.41855	875.41855	889.43420
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR - NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> - Adda: [M - C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>99</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>109</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub>	894.43560	880.41985	880.41985	884.43560	866.40430	866.40430	908.45125	894.43560	884.43560	880.41985	894.43560
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)-Glu-MDha-Ala] <sup>+</sup> - C <sub>62</sub> H <sub>100</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> [M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> - Adda: [M - C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>99</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>109</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub>	850.44577	836.43012	836.43012	850.44577	822.41447	836.43012	850.44577	836.43012	836.43012	822.41447	836.43012
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>99</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>109</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	911.46214	897.44649	897.44649	911.46214	883.43084	897.44649	925.47779	911.46214	911.46214	897.44649	911.46214
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>99</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>109</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	916.49272	902.47707	902.47707	902.47707	888.46142	888.46142	930.50837	916.49272	902.47707	902.47707	916.49272
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>99</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>109</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	917.50054	903.48489	917.50054	903.48489	903.48489	903.48489	931.51619	917.50054	903.48489	917.50054	931.51619
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>99</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>109</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	933.51927	919.50362	919.50362	919.50362	905.48797	905.48797	947.53492	933.51927	919.50362	919.50362	933.51927

Composé parent →		MC-YR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-YR	[Asp <sup>+</sup> ]MC-YR	[DMAAdda <sup>+</sup> ]MC-YR	[D-Asp <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ]-MC-YR	[D-Asp <sup>+</sup> , DMAAdda <sup>+</sup> ]-MC-YR	MC-HyR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[DMAAdda <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ]-MC-HyR	[D-Asp <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ]-MC-HyR	[D-Asp <sup>+</sup> , DMAAdda <sup>+</sup> ]-MC-HyR	[Dha <sup>+</sup> ]MC-HyR	[DMAAdda <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>+</sup> ]MC-HyR	[Asp <sup>+</sup> , Dha <sup>+</sup> ]-MC-HyR	[Asp <sup>+</sup> ]MC-HyR	
Composition de l'iron		1000.53766	986.52201	986.52201	986.52201	972.50635	972.50635	1014.55331	1000.53766	986.52201	986.52201	986.52201	1000.53766	986.52201	986.52201	1000.53766		
[M + H - COH] <sup>+</sup> , [M - CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>51</sub> H <sub>82</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>52</sub> H <sub>84</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>51</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>		1017.54039	1003.52474	1003.52474	1003.52474	989.50909	989.50909	1031.55804	1017.54039	1003.52474	1003.52474	1003.52474	1017.54039	1003.52474	1003.52474	1017.54039	1017.54039	
[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M - OH] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>46</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>46</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>49</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>46</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>51</sub> H <sub>82</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>50</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		1027.52474	1013.50909	1013.50909	1013.50909	999.49344	999.49344	1041.54039	1027.52474	1013.50909	1013.50909	1013.50909	1027.52474	1013.50909	1013.50909	1027.52474	1027.52474	
[M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , [M - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>46</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>46</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>49</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>46</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>51</sub> H <sub>82</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>50</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>		1028.50876	1014.49311	1014.49311	1014.49311	1000.47746	1000.47746	1042.52441	1028.50876	1014.49311	1014.49311	1014.49311	1028.50876	1014.49311	1014.49311	1028.50876	1028.50876	
[M + H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAAdda R=H: C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> O; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> O; ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>50</sub> H <sub>70</sub> O X=Leu: C <sub>49</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>49</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>48</sub> H <sub>62</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>53</sub> H <sub>74</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>52</sub> H <sub>62</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		457.24248	450.23465	450.23465	450.23465	443.22689	443.22689	464.25030	457.24248	450.23465	450.23465	450.23465	464.25030	457.24248	450.23465	457.24248	457.24248	
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAAdda R=H: C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> O; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>51</sub> H <sub>70</sub> O; ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>50</sub> H <sub>70</sub> O X=Leu: C <sub>49</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>49</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>48</sub> H <sub>62</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>53</sub> H <sub>74</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>52</sub> H <sub>62</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		457.74645	450.73862	450.73862	450.73862	443.73080	443.73080	464.75427	457.74645	450.73862	450.73862	450.73862	464.75427	457.74645	450.73862	457.74645	457.74645	
[M + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>46</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>46</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>49</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>46</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>51</sub> H <sub>82</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>50</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>		1045.53531	1031.51966	1031.51966	1031.51966	1017.50401	1017.50401	1059.55096	1017.50401	1031.51966	1031.51966	1031.51966	1059.55096	1045.53531	1031.51966	1045.53531	1045.53531	
[M + 2H - 2NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> , XY = RR M = MC-RR: C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Composé parent → Composition de l'ion	MC-RR	[Dha] <sup>-</sup> -MC-RR	[D-Asp] <sup>-</sup> -MC-RR	[Glu(OH) <sup>0</sup> , Dha] <sup>-</sup> -MC-RR	[D-Asp <sup>-</sup> , Glu(OH) <sup>0</sup> ] <sup>-</sup> -MC-RR	[DMAAdda <sup>-</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>-</sup> , Dha] <sup>-</sup> -MC-RR	[DMAAdda <sup>-</sup> , Dha] <sup>-</sup> -MC-RR	[D-Asp <sup>-</sup> , DMAAdda <sup>-</sup> ] -MC-RR	[L-Ser <sup>-</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>-</sup> , MeSer <sup>-</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>-</sup> , Dha] <sup>-</sup> -MC-RR	[Gly <sup>-</sup> , Asp <sup>-</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>-</sup> , Asp <sup>-</sup> , DMAAdda <sup>-</sup> ] -MC-RR
[Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>-</sup> - C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> OR R=H (DMAAdda), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdda)	135.08044	135.08044	135.08044	135.08044	135.08044	121.06479	135.08044	121.06479	121.06479	135.08044	135.08044	135.08044	135.08044	163.07536
[MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155.08150	141.06585	155.08150	141.06585	155.08150	155.08150	141.06585	141.06585	155.08150	159.07642	173.09207	127.05020	141.06585	141.06585
[Arg + H] <sup>+</sup> - C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839
[Ala-X + H - C <sup>+</sup> O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O X=Arg: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=Ile: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=Met: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=Trp: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O	200.15059	200.15059	200.15059	200.15059	200.15059	200.15059	200.15059	200.15059	200.15059	200.15059	200.15059	186.13494	186.13494	186.13494
[C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> O + H] <sup>+</sup>	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174
[Arg + NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494
[Glu-MDha + H - NH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> - C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	196.06043	182.04478	196.06043	182.04478	196.06043	196.06043	182.04478	182.04478	196.06043	200.05535	214.07700	182.04478	196.06043	196.06043
[Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	213.08698	199.07133	213.08698	199.07133	213.08698	213.08698	199.07133	199.07133	213.08698	217.08190	231.09755	199.07133	213.08698	213.08698
[O=C-Glu-MDha+H] <sup>+</sup> C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	241.08190	227.06625	241.08190	227.06625	241.08190	241.08190	227.06625	227.06625	241.08190	243.07681	259.09246	227.06625	241.08190	241.08190
[Adda + H - ROH - NH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> - C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> O R=H (DMAAdda), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdda)	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869
[MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=Arg: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Ile: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Met: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Trp: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	311.18262	297.16696	311.18262	297.16696	297.16696	311.18262	297.16696	297.16696	311.18262	315.17753	329.19318	283.15132	297.16696	297.16696
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg+2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=Arg: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ou C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Ile: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Met: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Trp: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	298.16289	291.15506	291.15506	291.15506	291.15506	298.16289	284.14724	291.15506	291.15506	300.16034	300.16034	284.14724	284.14724	284.14724
[Adda + H - ROH] <sup>+</sup> C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O R=H (DMAAdda), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdda)	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524
[Glu-MDha-Ala+H] <sup>+</sup> C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	284.12410	270.10845	284.12410	270.10845	284.12410	284.12410	270.10845	270.10845	284.12410	288.11901	302.13466	256.09280	270.10845	270.10845
[MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=Arg: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Ile: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Met: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Trp: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	328.20916	314.19351	328.20916	314.19351	314.19351	328.20916	314.19351	314.19351	328.20916	332.20408	346.21973	300.17786	314.19351	314.19351
[MeAsp-Arg+H] <sup>+</sup> C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	286.15098	286.15098	272.13533	286.15098	272.13533	286.15098	272.13533	286.15098	272.13533	272.13533	272.13533	286.15098	272.13533	272.13533
[Arg-Adda-Glu+2H] <sup>2+</sup> Adda: R=CH <sub>3</sub> (C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) DMAAdda: R=H (C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) ADMAdda: R=CH <sub>2</sub> C(O) (C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	300.18122	300.18122	300.18122	307.18904	307.18904	293.17339	300.18122	293.17339	293.17339	300.18122	300.18122	300.18122	300.18122	314.17868
[MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>2+</sup> = C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	303.17753	303.17753	288.16188	303.17753	288.16188	303.17753	288.16188	303.17753	288.16188	303.17753	288.16188	303.17753	288.16188	288.16188
[Adda + H] <sup>+</sup> (C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	314.21146	314.21146	314.21146	314.21146	314.21146	300.19581	314.21146	300.19581	300.19581	314.21146	314.21146	314.21146	314.21146	342.20637
[DMAAdda + H] <sup>+</sup> (C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	329.14556	315.12991	329.14556	329.14556	329.14556	329.14556	315.12991	315.12991	329.14556	333.14048	347.15613	301.11426	315.12991	315.12991
[ADMAdda + H] <sup>+</sup> (C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	375.19145	361.17580	375.19145	375.19145	375.19145	375.19145	361.17580	361.17580	375.19145	379.18636	383.20201	361.17580	375.19145	375.19145
[HC(O)-Glu-MDha-Ala-NH <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup> - C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>														
[C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> O-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>														

Composé parent → Composition de l'ion	MC-RR	[Dha] <sup>+</sup> -MC-RR	[D-Asp] <sup>+</sup> -MC-RR	[Glu(OMe) <sup>+</sup> Dha] <sup>+</sup> -MC-RR	[D-Asp <sup>+</sup> Glu(OMe) <sup>+</sup> Dha] <sup>+</sup> -MC-RR	[DMAdda] <sup>+</sup> -MC-RR	[Asp <sup>+</sup> Dha] <sup>+</sup> -MC-RR	[DMAdda <sup>+</sup> Dha] <sup>+</sup> -MC-RR	[D-Asp <sup>+</sup> DMAdda] <sup>+</sup> -MC-RR	[L-Ser] <sup>+</sup> -MC-RR	[Asp <sup>+</sup> MeSer] <sup>+</sup> -MC-RR	[Gly <sup>+</sup> Dha] <sup>+</sup> -MC-RR	[Gly <sup>+</sup> Asp] <sup>+</sup> -MC-RR	[Gly <sup>+</sup> Asp <sup>+</sup> DMAdda] <sup>+</sup> -MC-RR
[X-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	425.22554	425.22554	411.20989	425.22554	411.20989	425.22554	411.20989	425.22554	411.20989	425.22554	411.20989	425.22554	411.20989	411.20989
[MeAsp-Arg-Adda: (ROH+H)-Glu-MDha+H] <sup>2+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>64</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	390.20796	383.20014	385.20014	390.20796	390.20796	390.20796	376.19231	385.20014	385.20014	392.20542	382.20542	383.20014	383.20014	383.20014
[Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S X=Trp: C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	440.22521	426.20956	440.22521	440.22521	454.24086	426.20956	426.20956	440.22521	426.20956	444.22012	458.23577	412.19391	426.20956	426.20956
[MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S X=Trp: C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	440.22521	426.20956	426.20956	426.20956	426.20956	440.22521	412.19391	426.20956	426.20956	444.22012	444.22012	412.19391	412.19391	412.19391
[X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	442.25209	442.25209	428.23644	442.25209	428.23644	442.25209	428.23644	442.25209	428.23644	442.25209	428.23644	442.25209	428.23644	428.23644
[X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + 2H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	459.27919	459.27919	445.26299	459.27919	445.26299	459.27919	445.26299	459.27919	445.26299	459.27919	445.26299	459.27919	445.26299	445.26299
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAdda R=H: C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> ; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> ; O: ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub> X=Leu: C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>12</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>12</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	452.24969	445.24186	445.24186	452.24969	452.24969	452.24969	438.23404	445.24186	445.24186	454.24715	454.24715	438.23404	438.23404	438.23404
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>47</sub> H <sub>66</sub> N <sub>8</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>32</sub> H <sub>46</sub> N <sub>8</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>46</sub> H <sub>66</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>44</sub> H <sub>66</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>	455.26889	448.26106	455.26889	455.26889	462.27671	448.26106	448.26106	441.25324	448.26106	457.26635	464.27417	441.25324	448.26106	462.25852

Composé parent → Composition de l'ion	MC-RR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Glu(OMe) <sup>6</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>5</sup> , Glu(OMe) <sup>6</sup> ] -MC-RR	[DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR	[DMAAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>5</sup> , DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR	[L-Ser <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , MeSer <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 3H] <sup>2+</sup> X= Leu: C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> X= Arg: C <sub>44</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X= Tyr: C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= M(O): C <sub>43</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X= Trp: C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X= Phe: C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	463.78216	456.77434	463.78216	463.78216	470.78999	456.77434	449.76651	456.77434	465.77982	472.78744	449.76651	456.77434	470.77179
[C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> [Arg-Adda-HNH] <sup>+</sup> Adda: ReCH <sub>3</sub> (C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ) DMAAdda: R=H (C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ) ADMAdda: R=CH <sub>3</sub> CO (C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> )	446.22856	432.21291	446.22856	446.22856	480.24421	446.22856	432.21291	446.22856	450.22348	464.23913	418.19726	432.21291	432.21291
[OC-Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>2+</sup> X= Leu: C <sub>48</sub> H <sub>71</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= Arg: C <sub>43</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= Tyr: C <sub>46</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= M(O): C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X= Trp: C <sub>46</sub> H <sub>69</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= Phe: C <sub>46</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>	477.27571	470.26788	477.27571	477.27571	484.28353	470.26788	463.26006	470.26788	479.27316	486.28099	463.26006	470.26788	484.26534
[X-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MDha + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>49</sub> H <sub>71</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= Tyr: C <sub>49</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X= M(O): C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X= Trp: C <sub>49</sub> H <sub>69</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= Phe: C <sub>49</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	484.27163	477.26380	477.26380	484.27163	484.27163	477.26380	470.25598	470.25598	486.26908	486.26908	477.26380	477.26380	491.26126
[MeAsp-Arg-Adda( - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR+H)] <sup>+</sup> - C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> [M + 2 H - (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C=NH] <sup>2+</sup> = [M - CH <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>49</sub> H <sub>71</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X= Tyr: C <sub>49</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X= M(O): C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X= Trp: C <sub>49</sub> H <sub>69</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X= Phe: C <sub>49</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	490.26601	483.25819	485.25819	490.26601	490.26601	485.25819	476.25036	476.25036	492.26347	492.26347	476.25036	476.25036	490.24782
[Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X= Arg: C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X= Tyr: C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> X= M(O): C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S X= Trp: C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> X= Phe: C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	513.28921	513.28921	499.27356	513.28921	499.27356	513.28921	499.27356	513.28921	513.28921	499.27356	499.27356	485.25791	485.25791
[Arg-Adda + H] <sup>+</sup> - C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> [M + 2 H - COOH] <sup>2+</sup> = [M + H - CO <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= Tyr: C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= M(O): C <sub>27</sub> H <sub>52</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X= Trp: C <sub>31</sub> H <sub>51</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= Phe: C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	456.29692	456.29692	456.29692	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	486.30748
[M + 2 H - ROH] <sup>2+</sup> - Adda: [M - CH <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>49</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= Tyr: C <sub>49</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X= M(O): C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X= Trp: C <sub>49</sub> H <sub>69</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= Phe: C <sub>49</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	503.77708	496.76925	496.76925	503.77708	503.77708	503.77708	489.76143	503.77708	496.76925	505.77453	489.76143	489.76143	503.75888

Composé parent →	MC-RR	[Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Glu(OMe) <sup>6</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> , Glu(OMe) <sup>6</sup> ] -MC-RR	[DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[DMAAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> , DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR	[L-Ser <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , MeSer <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> , DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR
[M + 2 H - CO] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>77</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>51</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>57</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>58</sub> H <sub>77</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>51</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	505.79273	498.78490	498.78490	505.79273	505.79273	498.78490	491.77708	491.77708	491.77708	507.79018	507.79018	491.77708	491.77708	505.77453
[Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	530.31575	530.31575	516.30010	530.31575	516.30010	530.31575	516.30010	530.31575	516.30010	530.31575	516.30010	516.30010	502.28445	502.28445
[M + 2 H - NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> - [M - NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	511.27691	504.26908	504.26908	511.27691	511.27691	504.26908	497.26126	497.26126	497.26126	513.27437	513.27437	497.26126	497.26126	511.25872
[M + 2 H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>48</sub> H <sub>77</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>51</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>57</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>58</sub> H <sub>77</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>52</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	519.79018	512.78236	512.78236	519.79018	519.79018	512.78236	505.77453	505.77453	505.77453	521.78764	521.78764	505.77453	505.77453	519.79018
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S X=Trp: C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	568.33141	554.31575	554.31575	568.33141	554.31575	568.33141	540.30010	540.30010	540.30010	572.32632	572.32632	540.30010	540.30010	540.30010
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S X=Trp: C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	579.29977	565.28412	565.28412	579.29977	565.28412	579.29977	551.28847	551.28847	551.28847	583.29469	583.29469	551.28847	551.28847	551.28847
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> X=Arg: C <sub>24</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> X=Tyr: C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>31</sub> H <sub>31</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	598.32632	582.31067	582.31067	598.32632	582.31067	598.32632	568.29502	568.29502	568.29502	600.32123	600.32123	568.29502	568.29502	568.29502
[Arg-Adda-Glu + H - COOH] <sup>+</sup> - C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> [MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)] <sup>+</sup> - C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	554.35751	554.35751	554.35751	554.35751	554.35751	540.34186	554.35751	540.34186	540.34186	567.32895	567.32895	554.35751	554.35751	567.32895
	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895	567.32895

Composé parent →		MC-RR	[Dha] <sup>+</sup> -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Glu(OHMe) <sup>6</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> , Glu(OHMe) <sup>6</sup> ] -MC-RR	[DMAdda <sup>6</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> , DMAdda <sup>6</sup> ] -MC-RR	[L-Ser <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , MeSer <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>6</sup> ] -MC-RR	
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>65</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		613.35287	599.33722	599.33722	599.33722	599.33722	599.33722	613.35287	595.32157	599.33722	617.34778	617.34778	595.32157	595.32157	585.32157
[Arg-Adda-Glu + H - COJ] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		571.36025	571.36025	571.36025	585.37590	585.37590	585.37590	557.34460	571.36025	557.34460	571.36025	571.36025	571.36025	571.36025	585.32157
[Arg-Adda-Glu + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		592.32861	583.32861	583.32861	596.34426	596.34426	596.34426	568.31296	582.32861	568.31296	582.32861	582.32861	582.32861	582.32861	610.32353
[Arg-Adda-(ROH)-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		583.32386	583.32386	583.32386	597.33951	597.33951	597.33951	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386	583.32386
[MeAsp-Arg-Adda-(Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-H]-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		594.32459	580.30894	580.30894	608.34024	608.34024	608.34024	594.32459	580.30894	594.32459	580.30894	580.30894	580.30894	580.30894	580.30894
[Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		597.32828	583.31263	583.31263	597.32828	611.30754	611.30754	583.31263	583.31263	583.31263	601.32319	615.33884	583.31263	583.31263	611.30754
[Arg-Adda-(Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-Glu-MDha-Ala + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		599.35516	599.35516	599.35516	613.37081	613.37081	613.37081	585.33951	585.33951	585.33951	599.35516	599.35516	599.35516	599.35516	627.35007
[Arg-Adda-(Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-Glu-MDha-Ala + 3H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		629.36405	606.34840	606.34840	620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	606.34840	620.36405	620.36405	620.36405	620.36405	606.34840	606.34840
[Arg-Adda-Glu-MDha + H - COJ] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		654.38736	640.38171	640.38171	654.39736	668.41301	668.41301	640.38171	640.38171	640.38171	658.39227	672.40792	640.38171	654.39736	662.39227
[MeAsp-Arg-Adda-(Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-H]-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	677.36170	663.34605	677.36170	681.35662	681.35662	677.36170	663.34605	663.34605
[Glu-MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		725.36891	711.35326	711.35326	725.36891	725.36891	725.36891	725.36891	697.33761	711.35326	729.36383	729.36383	697.33761	697.33761	697.33761
[Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		682.39227	682.39227	682.39227	682.39227	682.39227	682.39227	668.37662	668.37662	668.37662	686.38719	700.40284	668.37662	682.39227	710.38719
[C <sub>1</sub> -H <sub>1</sub> -O-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		731.37227	717.35662	717.35662	731.41070	731.41070	731.41070	731.41070	703.34097	717.35662	735.36718	735.36718	703.34097	703.34097	703.34097
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH)-Glu] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	682.35589	696.37154	682.35589	682.35589	696.37154	682.35589	682.35589
[Adda-Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		753.42939	739.41374	739.41374	753.42939	767.44504	767.44504	739.41374	739.41374	739.41374	757.42430	771.43995	739.41374	739.41374	767.40865
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		794.46717	794.46717	794.46717	794.46717	780.45152	780.45152	794.46717	780.45152	794.46717	794.46717	780.45152	780.45152	766.43587	766.43587
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		753.42939	739.41374	739.41374	753.42939	767.44504	767.44504	739.41374	739.41374	739.41374	757.42430	771.43995	739.41374	739.41374	753.39300
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		754.43721	740.42156	740.42156	754.43721	768.45286	768.45286	740.42156	740.42156	740.42156	760.42156	776.43577	740.42156	740.42156	754.40083
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH)-H]-Glu-MDha] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		779.40865	765.39300	765.39300	779.40865	779.40865	779.40865	779.40865	761.37735	765.39300	783.40357	783.40357	765.39300	765.39300	765.39300
[MeAsp-Arg-Adda-Glu-MDha + H - COJ] <sup>+</sup> - C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Leu, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Arg, C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = M(O); C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X = Trp, C <sub>39</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> X = Phe, C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>		783.43995	769.42430	769.42430	783.43995	783.43995	783.43995	769.42430	765.40865	755.40865	787.43487	787.43487	769.42430	769.42430	797.41922

Composé parent → Composition de l'ion]	MC-RR	[Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Glu(O)Me <sup>6</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> , Glu(O)Me <sup>6</sup> ] -MC-RR	[DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[DMAAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> , DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR	[L-Ser <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , MeSer <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> , DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR
[Ala-X-MeAsp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Arg: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Tyr: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub>	826.49339	826.49339	812.47773	826.49339	812.47773	812.47773	812.47773	812.47773	798.46208	826.49339	812.47773	812.47773	798.46208	826.45700
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR - (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CNH <sup>+</sup> - Adda: [M - C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>1</sub> O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub>	845.45158	831.43593	831.43593	845.45158	845.45158	831.43593	817.42028	831.43593	831.43593	849.44649	812.47773	817.42028	817.42028	817.42028
[Adda-(ROHH)-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub>	850.44577	836.43012	836.43012	850.44577	850.44577	836.43012	822.41447	822.41447	822.41447	854.44068	815.42978	822.41447	822.41447	850.44577
[Adda-(ROHH)-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub>	851.45359	837.43794	837.43794	851.45359	851.45359	837.43794	823.42229	823.42229	823.42229	855.44851	815.42978	823.42229	823.42229	851.45359
[MeAsp-Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> : C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub> [MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda-(ROH)+ H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Arg: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Tyr: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub>	811.43487	797.41922	797.41922	811.43487	811.43487	797.41922	783.40357	783.40357	783.40357	815.42978	797.41922	797.41922	797.41922	825.41413
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Arg: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Tyr: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub>	877.50428	863.48863	863.48863	863.48863	863.48863	863.48863	849.47298	863.48863	863.48863	881.49920	811.49920	849.47298	849.47298	877.46790
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Arg: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Tyr: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub>	881.53558	867.51993	867.51993	867.51993	867.51993	867.51993	853.50428	853.50428	853.50428	885.53050	815.53050	853.50428	853.50428	881.49920
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Arg: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Tyr: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub>	881.53558	867.51993	867.51993	881.53558	881.53558	867.51993	867.51993	867.51993	867.51993	885.53050	815.53050	867.51993	867.51993	885.51485

Composé parent → Composition de l'ion	MC-RR	[Dha <sup>+</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Glu(O)Me <sup>6</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> , Glu(O)Me <sup>6</sup> ] -MC-RR	[DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[DMAAdda <sup>5</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[D-Asp <sup>3</sup> , DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR	[L-Ser <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>3</sup> , MeSer <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Dha <sup>1</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> , DMAAdda <sup>5</sup> ] -MC-RR
[Adda-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Arg: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X = Trp: C <sub>68</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	882.47198	868.45633	868.45633	882.47198	882.47198	868.45633	854.44068	854.44068	854.44068	886.46690	886.46690	854.44068	854.44068	882.43560
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR - NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> - Adda: [M - C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	887.47338	873.45773	873.45773	887.47338	887.47338	873.45773	869.44208	873.45773	873.45773	891.46829	891.46829	869.44208	869.44208	889.44208
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)-Glu-MDha-Ala] <sup>+</sup> - C <sub>72</sub> H <sub>109</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> [M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>+</sup> - Adda: [M - C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	850.44577	836.43012	836.43012	850.44577	850.44577	836.43012	822.41447	836.43012	836.43012	854.44068	854.44068	822.41447	822.41447	822.41447
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X = M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X = Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Phe: C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	909.53050	895.51485	895.51485	909.53050	895.51485	890.48428	876.46863	890.48428	890.48428	908.49484	908.49484	876.46863	876.46863	904.49893
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X = M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X = Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Phe: C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	909.53050	895.51485	909.53050	909.53050	895.51485	890.48428	876.46863	890.48428	890.48428	908.49484	908.49484	876.46863	876.46863	904.49893
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + 2H] <sup>2+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X = M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X = Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Phe: C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	910.53832	896.52267	910.53832	910.53832	896.52267	896.52267	886.52267	896.52267	896.52267	914.53296	914.53296	886.52267	886.52267	924.51759
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Tyr: C <sub>68</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X = M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X = Trp: C <sub>69</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X = Phe: C <sub>68</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	926.55705	912.54140	912.54140	912.54140	912.54140	912.54140	896.52575	912.54140	912.54140	930.55196	930.55196	884.51010	888.52575	926.52066

Composé parent →		MC-RR	[Dha] <sup>1</sup> -MC-RR	[D-Asp] <sup>3</sup> -MC-RR	[Glu(OMe) <sup>6</sup> , Dha] <sup>1</sup> -MC-RR	[D-Asp <sup>5</sup> , Glu(OMe) <sup>6</sup> ] -MC-RR	[DMAAdda <sup>8</sup> ] -MC-RR	[Asp <sup>9</sup> , Dha] <sup>1</sup> -MC-RR	[DMAAdda <sup>8</sup> , Dha] <sup>1</sup> -MC-RR	[D-Asp <sup>5</sup> , DMAAdda <sup>8</sup> ] -MC-RR	[L-Ser] <sup>7</sup> -MC-RR	[Asp <sup>9</sup> , MeSer] <sup>7</sup> -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Dha] <sup>1</sup> -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> ] -MC-RR	[Gly <sup>1</sup> , Asp <sup>3</sup> , ADMAAdda <sup>8</sup> ] -MC-RR	
[M + H - COOH] <sup>+</sup> - [M - CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>		993.57544	979.55979	979.55979	983.57544	983.57544	983.57544	979.55979	965.54414	965.54414	965.54414	965.54414	965.54414	965.54414	965.54414	993.53905
[M + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		1010.57818	996.56253	996.56253	1010.57818	1010.57818	1010.57818	996.56253	982.54688	982.54688	982.54688	982.54688	982.54688	982.54688	982.54688	1010.54179
[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> - [M - OH] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		1020.56253	1006.54688	1006.54688	1020.56253	1020.56253	1020.56253	1006.54688	992.53123	992.53123	992.53123	992.53123	992.53123	992.53123	992.53123	1020.52614
[M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> - [M - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>72</sub> N <sub>9</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>70</sub> N <sub>9</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>70</sub> N <sub>9</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>72</sub> N <sub>9</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>72</sub> N <sub>9</sub> O <sub>13</sub> S X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>70</sub> N <sub>9</sub> O <sub>12</sub>		1021.54654	1007.53089	1007.53089	1021.54654	1021.54654	1021.54654	1007.53089	993.51524	993.51524	993.51524	993.51524	993.51524	993.51524	993.51524	1021.51016
[M + H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAAdda R=H: C <sub>61</sub> H <sub>50</sub> ; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>61</sub> H <sub>51</sub> O; ADMAAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>66</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>66</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>66</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		451.74572	444.73789	444.73789	451.74572	451.74572	451.74572	451.74572	437.73007	444.73789	444.73789	453.74317	437.73007	437.73007	437.73007	437.73007
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAAdda R=H: C <sub>61</sub> H <sub>50</sub> ; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>61</sub> H <sub>51</sub> O; ADMAAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>66</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>66</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>66</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>64</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		452.24969	445.24186	445.24186	452.24969	452.24969	452.24969	445.24186	438.23404	445.24186	445.24186	454.24715	438.23404	438.23404	438.23404	438.23404
[M + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>		1038.57309	1024.55744	1024.55744	1038.57309	1038.57309	1038.57309	1024.55744	1010.54179	1010.54179	1010.54179	1010.54179	1010.54179	1010.54179	1010.54179	1038.53671
[M + 2 H - 2NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> - XY = RR M = MC-RR: C <sub>64</sub> H <sub>71</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>		460.74184	453.73401	453.73401	460.74184	460.74184	460.74184	453.73401	446.72619	446.72619	446.72619	446.72619	446.72619	446.72619	446.72619	460.72364
		502.76364	495.75581	495.75581	502.76364	502.76364	495.75581	488.74799	488.74799	488.74799	488.74799	488.74799	488.74799	488.74799	502.74544	

Composé parent → Composition de l'ion]	MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	MC-WR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-WR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	MC-FR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[DMAdha <sup>5</sup> ]-MC-FR
[Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>+</sup> - C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> OR R=H (DMAdha), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdha)	135.08044	135.08044	135.08044	135.08044	135.08044	135.08044	135.08044	135.08044	121.06479
[MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	155.08150	141.06585	155.08150	155.08150	141.06585	155.08150	155.08150	141.06585	155.08150
[Arg + H] <sup>+</sup> - C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839	157.10839
[Ala-X + H - C=O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O X= Arg: C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O X= Tyr: C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> X= M(O): C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S X=Trp: C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O X=Phe: C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O	191.08488	191.08488	230.12879	230.12879	230.12879	191.11789	191.11789	191.11789	191.11789
[C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O + H] <sup>+</sup>	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174	163.11174
[Arg + NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494	174.13494
[Glu-MDha + H - NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> - C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	196.06043	182.04478	196.06043	196.06043	182.04478	196.06043	196.06043	182.04478	196.06043
[Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	213.08698	195.07133	213.08698	213.08698	195.07133	213.08698	213.08698	195.07133	213.08698
[O=C-Glu-MDha+H] <sup>+</sup> - C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	241.08190	227.06625	241.08190	241.08190	227.06625	241.08190	241.08190	227.06625	241.08190
[Adda + H - ROH - NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> - C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O R=H (DMAdha), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdha)	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869	265.15869
[MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Arg: C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Tyr: C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> X=M(O): C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S X=Trp: C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Phe: C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	302.11690	288.10125	341.16082	341.16082	327.14517	302.14992	302.14992	288.13427	302.14992
[MDha-Ala-X-Me-Asp-Arg+2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ou C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>1</sub> O <sub>7</sub> X=Tyr: C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	294.13384	287.15045	313.65590	306.64807	306.64807	294.15045	287.14262	294.15045	294.15045
[Adda + H - ROH] <sup>+</sup> - C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O R=H (DMAdha), R=CH <sub>3</sub> (Adda), R=CH <sub>2</sub> C(O) (ADMAdha)	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524	282.18524
[Glu-MDha-Ala+H] <sup>+</sup> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	284.12410	270.10845	284.12410	284.12410	270.10845	284.12410	284.12410	270.10845	284.12410
[MDha-Ala-X-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> + 2H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Arg: C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Tyr: C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> X=M(O): C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S X=Trp: C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> X=Phe: C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	319.14345	305.12780	358.18737	358.18737	344.17172	319.17647	319.17647	305.16082	319.17647
[Me-Asp-Arg+H] <sup>+</sup> C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	286.15098	286.15098	286.15098	272.13533	286.15098	286.15098	272.13533	286.15098	286.15098
[Arg-Adda-Glu+2H] <sup>2+</sup> Adda: R=CH <sub>3</sub> (C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) DMAdha: R=H (C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) ADMAdha: R=CH <sub>2</sub> C(O) (C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	300.18122	300.18122	300.18122	300.18122	300.18122	300.18122	300.18122	300.18122	293.17339
[Me-Asp-Arg-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	303.17753	303.17753	303.17753	289.16188	303.17753	303.17753	289.16188	303.17753	303.17753
[Adda + H] <sup>+</sup> (C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	314.21146	314.21146	314.21146	314.21146	314.21146	314.21146	314.21146	314.21146	300.19581
[DMAdha + H] <sup>+</sup> (C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	329.14556	315.12991	329.14556	329.14556	315.12991	329.14556	329.14556	315.12991	329.14556
[H(CO)-Glu-MDha-Ala-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> + H] <sup>+</sup> - C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	375.19145	361.17580	375.19145	375.19145	361.17580	375.19145	375.19145	361.17580	375.19145
[C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>									

Composé parent →	MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	MC-WR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-WR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	MC-FR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[DMAAdda <sup>5</sup> ]-MC-FR
[X-MeAsp-Arg + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	416.16038	416.16038	455.20374	441.18809	455.20374	416.19285	402.17720	416.19285	416.19285
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)-Glu-MDha+H] <sup>2+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	390.20796	393.20014	390.20796	383.20014	393.20014	390.20796	383.20014	383.20014	390.20796
[Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> X=Trp: C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	431.15950	417.14385	470.20341	470.20341	456.18776	431.19251	431.19251	417.17686	431.19251
[MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> X=Trp: C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	431.15950	417.14385	470.20341	456.18776	456.18776	431.19251	417.17686	417.17686	431.19251
[X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	433.18638	433.18638	472.23029	458.21464	472.23029	433.21939	419.20374	433.21939	433.21939
[X-MeAsp-Arg-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Arg: C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Tyr: C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> X=M(O): C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Trp: C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> X=Phe: C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	450.21293	450.21293	489.25684	475.24119	489.25684	450.24594	436.23029	450.24594	450.24594
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAAdda R=H: C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> O; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> O; ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>40</sub> H <sub>72</sub> O <sub>2</sub> X=Leu: C <sub>40</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>40</sub> H <sub>68</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>43</sub> H <sub>65</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>36</sub> H <sub>65</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Trp: C <sub>44</sub> H <sub>63</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>42</sub> H <sub>67</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	440.71530	433.70747	467.23879	460.23097	460.23097	447.73334	440.72552	440.72552	447.73334
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Arg: C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Tyr: C <sub>47</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>38</sub> H <sub>77</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X=Trp: C <sub>46</sub> H <sub>75</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>44</sub> H <sub>79</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	450.73603	443.72821	470.25799	470.25799	463.25016	450.75254	450.75254	443.74471	443.74471

Composé parent → Composition de l'ion	MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	MC-WR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-WR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	MC-FR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[DMAAdda <sup>5</sup> ]-MC-FR
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 3H] <sup>2+</sup> X= Leu: C <sub>64</sub> H <sub>12</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X= Arg: C <sub>64</sub> H <sub>12</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X= Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>12</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>12</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>12</sub> N <sub>11</sub> O <sub>9</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>12</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	459.24931	452.24148	478.77126	478.77126	471.76344	459.26581	459.26581	452.25799	452.25799
[C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	446.22856	432.21251	446.22856	446.22856	432.21251	446.22856	446.22856	432.21251	446.22856
[Arg-Adda-H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> Adda: R=CH <sub>3</sub> (C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ) DMAAdda: R=H (C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ) ADMAAdda: R=CH <sub>2</sub> CO (C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> )	453.28602	453.28602	453.28602	453.28602	453.28602	453.28602	453.28602	453.28602	439.27037
[O=C-Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X-NH <sub>2</sub> + 2H] <sup>2+</sup> X= Leu: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= Arg: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X= Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>	472.74285	465.73503	492.26481	492.26481	485.25698	472.75936	472.75936	465.75153	465.75153
[X-Me-Asp-Arg-Adda-Glu-MDha + 2H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	479.73877	472.73095	499.26073	492.25290	492.25290	479.75528	472.74745	472.74745	472.74745
[Me-Asp-Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR+H)] <sup>+</sup> H <sup>+</sup> - C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	465.28200	465.28200	465.28200	461.26635	465.28200	465.28200	461.26635	465.28200	465.28200
[M + 2 H - (NH <sub>2</sub> )C=NH] <sup>2+</sup> = [M - CH <sub>3</sub> N] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>17</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>17</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	485.73315	478.72533	505.25511	498.24729	498.24729	485.74966	478.74184	478.74184	478.74184
[Ala-X-Me-Asp-Arg + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>67</sub> H <sub>18</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> X= Arg: C <sub>67</sub> H <sub>18</sub> N <sub>13</sub> O <sub>6</sub> X= Tyr: C <sub>70</sub> H <sub>18</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X= M(O): C <sub>70</sub> H <sub>18</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>70</sub> H <sub>18</sub> N <sub>11</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>70</sub> H <sub>18</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	504.22349	504.22349	543.26741	529.25176	543.26741	504.25651	490.24086	504.25651	504.25651
[Arg-Adda + H] <sup>+</sup> - C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257	470.31257
[M + 2 H - COOH] <sup>2+</sup> = [M + H - CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>16</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>69</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>16</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>	492.75650	485.75068	512.28046	505.27263	505.27263	493.27892	486.27110	486.27110	486.27110
[M + 2 H - ROH] <sup>2+</sup> - Adda: [M - CH <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>16</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>69</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>69</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>69</sub> H <sub>16</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>69</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	499.24422	492.23640	518.76618	511.75635	511.75635	499.26073	492.25290	492.25290	499.26073

Composé parent →	MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	MC-WR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-WR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	MC-FR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[DMAAdda <sup>5</sup> ]-MC-FR
Composition de l'ion] [M + 2 H - CO] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>127</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>63</sub> H <sub>124</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>144</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>124</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	501.25987	494.25205	520.78183	513.77400	513.77400	501.27638	494.26855	494.26855	494.26855
[Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>67</sub> H <sub>138</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>67</sub> H <sub>160</sub> N <sub>11</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>137</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>71</sub> H <sub>157</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>64</sub> H <sub>137</sub> N <sub>11</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>137</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	521.25004	521.25004	560.29396	546.27831	560.29396	521.28306	507.26741	521.28306	521.28306
[M + 2 H - NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> - [M - NH] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>60</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>62</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>68</sub> H <sub>141</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>64</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>62</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	506.76839	499.76056	526.26601	519.25819	519.25819	506.76056	499.75274	499.75274	499.75274
[M + 2 H] <sup>2+</sup> X=Leu: C <sub>60</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>62</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>68</sub> H <sub>141</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>64</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>62</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	515.25733	508.24950	534.77929	527.77146	527.77146	515.27384	508.26601	508.26601	508.26601
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg +H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> N <sub>11</sub> O <sub>6</sub> X=Tyr: C <sub>62</sub> H <sub>109</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>130</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> S X=Trp: C <sub>62</sub> H <sub>109</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> X=Phe: C <sub>61</sub> H <sub>109</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	559.26569	545.25004	598.30861	584.29396	584.29396	559.29871	545.28306	545.28306	559.29871
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg +H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>108</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X=Arg: C <sub>67</sub> H <sub>139</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X=Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>168</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>72</sub> H <sub>188</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>168</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>168</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	570.23406	566.21841	609.27797	595.26232	595.26232	570.26707	556.25142	556.25142	570.26707
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg +H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>114</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X=Arg: C <sub>67</sub> H <sub>140</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X=Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>169</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X=M(O): C <sub>72</sub> H <sub>189</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>67</sub> H <sub>169</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X=Phe: C <sub>67</sub> H <sub>169</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	587.26061	573.24486	626.30452	612.28887	612.28887	587.29362	573.27797	573.27797	587.29362
[Arg-Adda-Glu + H - COOH] <sup>+</sup> - C <sub>60</sub> H <sub>84</sub> N <sub>10</sub> O <sub>4</sub> [MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)] <sup>+</sup> - C <sub>63</sub> H <sub>101</sub> N <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	554.35751 567.32895	540.34186 567.32895

Composé parent →		MC-M(O)R	[Dha <sup>1</sup> ]-MC-M(O)R	MC-WR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-WR	[Dha <sup>1</sup> ]-MC-WR	MC-FR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>1</sup> ]-MC-FR	[DMAdha <sup>5</sup> ]-MC-FR	
Composition de l'ion]											
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> + H <sup>+</sup> ] X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		604.28716	590.27151	643.33107	629.31542	629.31542	604.32017	590.30452	590.30452	604.32017	
[Arg-Adda-Glu + H - CO] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [Arg-Adda-Glu-H - NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> [Arg-Adda-(ROH)-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [MeAsp-Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR-H)-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> [Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> [Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-Glu-MDha-Ala + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> [Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR)-Glu-MDha-Ala + 3H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> [Arg-Adda-Glu-MDha + H - CO] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> [MeAsp-Arg-Adda(-Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR-H)-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		571.36025 582.32861 583.32386 594.32459 597.32828 599.35516 619.35622 606.34840 654.39736 677.36170	571.36025 582.32861 583.32386 594.32459 597.32828 599.35516 619.35622 606.34840 640.38171 663.34605	571.36025 582.32861 583.32386 594.32459 597.32828 599.35516 619.35622 620.36405 654.39736 677.36170	571.36025 582.32861 583.32386 594.32459 597.32828 599.35516 619.35622 620.36405 654.39736 677.36170	571.36025 582.32861 583.32386 594.32459 597.32828 599.35516 619.35622 606.34840 640.38171 663.34605	571.36025 582.32861 583.32386 594.32459 597.32828 599.35516 619.35622 620.36405 640.38171 663.34605	571.36025 582.32861 583.32386 594.32459 597.32828 599.35516 619.35622 620.36405 640.38171 663.34605	571.36025 582.32861 583.32386 594.32459 597.32828 599.35516 619.35622 620.36405 640.38171 663.34605	571.36025 582.32861 583.32386 594.32459 597.32828 599.35516 619.35622 620.36405 640.38171 663.34605	
[Glu-MDha-Ala-X-MeAsp-Arg + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		716.30320	702.28755	755.34711	741.33146	741.33146	716.33622	702.32057	702.32057	716.33622	
[Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> [C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		682.39227	668.37662	682.39227	682.39227	682.39227	682.39227	682.39227	682.39227	682.39227	
[MeAsp-Arg-Adda(-ROH-H)-Glu] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [Adda-Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	696.37154	
[MeAsp-Arg-Adda-Glu + H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [Ala-X-MeAsp-Arg-Adda(-ROH) + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Arg: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>12</sub> O <sub>7</sub> X = Tyr: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X = M(O): C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X = Trp: C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> X = Phe: C <sub>67</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub>		728.39775	728.39775	728.39775	714.38210	728.39775	728.39775	728.39775	728.39775	728.39775	
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [Arg-Adda-Glu-MDha-Ala + 2H] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [MeAsp-Arg-Adda(-ROH-H)-Glu-MDha] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> [MeAsp-Arg-Adda-Glu-MDha + H - CO] <sup>+</sup> - C <sub>38</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		753.42939 754.43721 779.40865 783.43995	739.41374 740.42156 765.39300 769.42430	753.42939 754.43721 779.40865 783.43995	753.42939 754.43721 765.39300 769.42430	753.42939 754.43721 765.39300 769.42430	739.41374 740.42156 765.39300 769.42430	753.42939 754.43721 779.40865 783.43995	753.42939 754.43721 765.39300 769.42430	739.41374 740.42156 765.39300 769.42430	739.41374 740.42156 779.40865 769.42430

Composé parent →		MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	MC-WR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-WR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	MC-FR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[DMAAdda <sup>5</sup> ]-MC-FR
Composition de l'ion]										
[Ala-X-Me-Asp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X= Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>11</sub> O <sub>8</sub> X= Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X= M(O): C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X=Trp: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub>		817.42767	817.42767	856.47159	842.45594	856.47159	817.46069	803.44504	817.46069	803.44504
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR - (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CNH <sup>+</sup> - Adda: [M - C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>		836.38642	822.37022	875.42978	861.41413	861.41413	836.41888	822.40323	822.40323	836.41888
[Adda(-ROH+H)-Glu-MDha-Ala-X-Me-Asp] <sup>+</sup> X= Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X= Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X= Trp: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= Phe: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>		841.38005	827.36440	880.42397	866.40832	866.40832	841.41307	827.39742	827.39742	841.41307
[Adda(-ROH+H)-Glu-MDha-Ala-X-Me-Asp + H] <sup>+</sup> X= Leu: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= Arg: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X= Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X= M(O): C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X= Trp: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= Phe: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>		842.38788	828.37223	881.43179	867.41614	867.41614	842.42089	828.40524	828.40524	842.42089
[Me-Asp-Arg-Adda-Glu-MDha + H] <sup>+</sup> - C <sub>68</sub> H <sub>124</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>		811.43487	797.41922	811.43487	797.41922	797.41922	811.43487	797.41922	797.41922	797.41922
[MDha-Ala-X-Me-Asp-Arg-Adda(-ROH)+ H] <sup>+</sup> X= Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X= Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>11</sub> O <sub>9</sub> X= Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> S X= Trp: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X= Phe: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>		868.43857	854.42292	907.48249	893.46684	893.46684	868.47159	854.45594	854.45594	868.47159
[MDha-Ala-X-Me-Asp-Arg-Adda + H - CO] <sup>+</sup> X= Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X= Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>11</sub> O <sub>8</sub> X= Tyr: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X= M(O): C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S X= Trp: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> X= Phe: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub>		872.46987	858.45422	911.51379	897.49814	897.49814	872.50289	858.48724	858.48724	872.50289
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X-H + CO] <sup>+</sup> X= Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X= Arg: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>11</sub> O <sub>9</sub> X= Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X= M(O): C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> S X= Trp: C <sub>65</sub> H <sub>105</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> X= Phe: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub>		872.46987	858.45477	911.51433	911.51433	897.49814	872.50289	872.50289	858.48724	858.48724

Composé parent → Composition de l'ion]	MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	MC-WR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-WR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	MC-FR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[DMAdha <sup>5</sup> ]-MC-FR
[Adda-Glu-MDha-Ala-X-MeAsp + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>63</sub> H <sub>103</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X = M(O): C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X = Trp: C <sub>64</sub> H <sub>102</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X = Phe: C <sub>63</sub> H <sub>97</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub>	873.40627	859.39062	912.45018	898.43453	899.43453	873.43928	859.42363	859.42363	859.42363
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR - NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> - Adda: [M - C <sub>3</sub> H <sub>12</sub> NO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>64</sub> H <sub>102</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>97</sub> N <sub>13</sub> O <sub>11</sub>	878.40767	864.39202	917.45158	903.43593	903.43593	878.44068	864.42503	864.42503	878.44068
[MeAsp-Arg-Adda-(ROH+H)-Glu-MDha-Ala] <sup>+</sup> - C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> [M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> - Adda: [M - C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> O] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>60</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>60</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>62</sub> H <sub>100</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>56</sub> H <sub>88</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>60</sub> H <sub>94</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>59</sub> H <sub>89</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	850.44577	836.43012	850.44577	836.43012	836.43012	850.44577	836.43012	836.43012	850.44577
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X = M(O): C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X = Trp: C <sub>64</sub> H <sub>102</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Phe: C <sub>63</sub> H <sub>97</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	900.46554	886.44914	939.50870	925.49305	925.49305	900.49780	886.48215	886.48215	886.48215
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X = M(O): C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X = Trp: C <sub>64</sub> H <sub>102</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Phe: C <sub>63</sub> H <sub>97</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	900.46479	886.44914	939.50870	939.50870	925.49305	900.49780	900.49780	886.48215	886.48215
[Arg-Adda-Glu-MDha-Ala-X + 2H] <sup>2+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X = M(O): C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X = Trp: C <sub>64</sub> H <sub>102</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Phe: C <sub>63</sub> H <sub>97</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	901.47261	887.45696	940.51653	940.51653	926.50088	901.50563	901.50563	887.48998	887.48998
[MDha-Ala-X-MeAsp-Arg-Adda-NH <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> X = Leu: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Arg: C <sub>64</sub> H <sub>104</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Tyr: C <sub>66</sub> H <sub>106</sub> N <sub>13</sub> O <sub>10</sub> X = M(O): C <sub>62</sub> H <sub>98</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S X = Trp: C <sub>64</sub> H <sub>102</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub> X = Phe: C <sub>63</sub> H <sub>97</sub> N <sub>13</sub> O <sub>9</sub>	917.49134	903.47569	966.53625	942.51960	942.51960	917.52435	903.50870	903.50870	903.50870

Composé parent → Composition de l'ion]	MC-M(O)R	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-M(O)R	MC-WR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-WR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-WR	MC-FR	[Asp <sup>3</sup> ]-MC-FR	[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	[DMAdda <sup>5</sup> ]-MC-FR
[M + H - COOH] <sup>+</sup> - [M - CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>63</sub> H <sub>126</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Arg: C <sub>64</sub> H <sub>128</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> X=Tyr: C <sub>63</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=M(O): C <sub>67</sub> H <sub>124</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> S X=Trp: C <sub>63</sub> H <sub>123</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> X=Phe: C <sub>63</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub>	984.50973	970.49408	1023.55364	1009.53799	1009.53799	984.54274	970.52709	970.52709	970.52709
[M + H - CO] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>130</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>130</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>124</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>70</sub> H <sub>126</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>65</sub> H <sub>125</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>124</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	1001.51247	987.49682	1040.55638	1026.54073	1026.54073	1001.54548	987.52983	987.52983	987.52983
[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> - [M - OH] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>128</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>128</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>69</sub> H <sub>124</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>65</sub> H <sub>123</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	1011.48682	997.48117	1050.54073	1036.52508	1036.52508	1011.52983	997.51418	997.51418	997.51418
[M + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> - [M - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>127</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>69</sub> H <sub>123</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>65</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>121</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	1012.48083	998.46518	1051.52474	1037.50909	1037.50909	1012.51385	998.49820	998.49820	998.49820
[M + H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAdda R=H: C <sub>63</sub> H <sub>102</sub> ; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> ; O: ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>66</sub> H <sub>110</sub> O <sub>2</sub> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>126</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>126</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>120</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>70</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>65</sub> H <sub>121</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>120</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	440.21132	433.20350	466.73482	459.72699	459.72699	447.22943	440.22160	440.22160	447.22943
[M + 2H - Ph-CH <sub>2</sub> -CH=OR] <sup>2+</sup> DMAdda R=H: C <sub>63</sub> H <sub>102</sub> ; Adda R=CH <sub>3</sub> : C <sub>63</sub> H <sub>104</sub> ; O: ADMAdda R=C(O)CH <sub>3</sub> : C <sub>66</sub> H <sub>110</sub> O <sub>2</sub> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>126</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>126</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub> X=Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>120</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=M(O): C <sub>70</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> S X=Trp: C <sub>65</sub> H <sub>121</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>120</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	440.71530	433.70747	467.23879	460.23097	460.23097	447.73340	440.72552	440.72552	447.73340
[M + H] <sup>+</sup> X=Leu: C <sub>66</sub> H <sub>126</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Arg: C <sub>66</sub> H <sub>126</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub> X=Tyr: C <sub>65</sub> H <sub>120</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> X=M(O): C <sub>70</sub> H <sub>122</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S X=Trp: C <sub>65</sub> H <sub>121</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub> X=Phe: C <sub>65</sub> H <sub>120</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	1029.50738	1015.49173	1068.55129	1054.53564	1054.53564	1029.54039	1015.52474	1015.52474	1015.52474
[M + 2H - 2(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C=NH] <sup>2+</sup> (MC-RR et dérivés) MC-RR-C <sub>64</sub> H <sub>107</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[M + 2H - 2NH <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> - XY = RR M = MC-RR: C <sub>69</sub> H <sub>127</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-