THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ingénierie Biomoléculaire

École doctorale Sciences Chimiques Balard

Université de Montpellier, Institut des Biomolécules Max Mousseron

Développements méthodologiques en spectrométrie de masse pour l'analyse structurale de peptides naturels

Présentée par Elodie LOGEROT

Le 8 Novembre 2022

Sous la direction de Christine Enjalbal

Devant le jury composé de

Mme. Emmanuelle SACHON, Maître de conférences, LBM, Sorbonne Université	Rapportrice
M. David TOUBOUL, Directeur de recherche CNRS, ICSN, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Mme. Catherine PERRIN, Professeure, IBMM, Université de Montpellier	Présidente
M. Antony MEMBOEUF, Maître de conférences, CEMCA, Université de Brest	Examinateur
M. Vincent CARRE, Maître de conférences, LCP-A2MC, Université de Lorraine	Examinateur
Mme. Christine ENJALBAL, Professeure, IBMM, Université de Montpellier	Directrice

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Résumé

Les peptides, présents dans de nombreux extraits naturels, constituent une classe de biomolécules à fort potentiel thérapeutique. Parmi les nombreuses modifications post-traductionnelles répertoriées, l'amidation C-terminale du squelette peptidique est considérée comme une signature d'activité biologique, d'où l'importance de s'intéresser plus particulièrement à ces peptides C-amidés. Cependant, ces peptides modifiés diffèrent d'uniquement 0.984 Da des peptides natifs présentant une fonction acide carboxylique C-terminale, résultant alors en une superposition de leurs massifs isotopiques en spectrométrie de masse. Cette particularité entraîne des difficultés pour la détection et la caractérisation spécifique des peptides amides en générant des spectres MS/MS potentiellement chimériques contenant des ions fragments issus des deux séquences. De plus, cette différence de masse peut également s'expliquer par certains couples de résidus où la modification acide/amide est localisée en chaîne latérale (acide aspartique/asparagine ou acide glutamique/glutamine), générant alors une problématique de régiosélectivité.

Les travaux de thèse ont alors été focalisés sur la caractérisation structurale de peptides carboxylés et amidés par spectrométrie de masse en tandem sous activation CID et ETD d'ions moléculaires protonés et sodés. La spectrométrie de masse résolue en énergie a permis de différencier sans ambigüité des séquences amidées et carboxylées, à partir de leurs comportements de dissociations en phase gazeuse. Enfin, la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution ainsi que les techniques séparatives conventionnelles comme la chromatographie liquide haute performance mais aussi l'électrophorèse capillaire ont été mises en œuvre pour sonder la faisabilité de détection et de quantification de traces du peptide acide en mélange avec le peptide amide.

Summary

Peptides that are present in many natural extracts, constitute a class of biomolecules with high therapeutic potency. Among the numerous archived post-translational modifications, the peptide backbone C-terminal amidation is considered as a signature of biological activity. We hence focused our attention on such C-amidated sequences. As a matter of fact, these modified peptides differ by only 0.984 Da from the native ones with a C-terminal carboxylic acid function, resulting in overlapping isotopic clusters in mass spectrometry. This particularity leads to difficulties for the detection and specific characterization of amidated peptides by generating potentially chimeric MS/MS spectra containing fragment ions issued from both sequences. Moreover, this mass difference can also be encountered with couples of residues where the acid/amide modification is localized in the side chain (aspartic acid/asparagine or glutamic acid/glutamine), thus generating regioselectivity concern.

The thesis work was thus focused on the structural characterization of carboxylated and amidated peptides by tandem mass spectrometry under CID and ETD activations of protonated and sodiated ions. Energy-resolved mass spectrometry allowed the unambiguous differentiation of amidated and carboxylated sequences, based on their dissociation behavior in the gas phase. Finally, ultra-high resolution mass spectrometry as well as conventional separative techniques such as high performance liquid chromatography and also capillary electrophoresis were used to probe the feasibility of detecting and quantifying traces of the acidic peptide contaminating the amidated peptide.

Remerciements

A tous ceux qui, au long de ces années de thèse, m'ont aidée de leur savoir, leur encouragement et leur soutien, je tiens à exprimer ici ma gratitude.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse Christine Enjalbal pour avoir encadré cette thèse et m'avoir permis de réaliser des expérimentations très diverses par l'intermédiaire de collaborations. J'ai ainsi pu apprendre énormément de nouvelles choses ces trois dernières années. Je tiens également à la remercier pour ses relectures méticuleuses.

Mes remerciements vont également aux membres du jury qui, en dépit de leurs responsabilités, m'ont fait l'honneur d'accepter de donner de leur temps afin de juger ce travail : Dr. Emmanuelle Sachon, Dr. David Touboul, Pr. Catherine Perrin, Dr. Antony Memboeuf et Dr. Vincent Carré.

Je voudrais également remercier Antony Memboeuf de m'avoir accueillie dans son laboratoire à Brest pour pouvoir apprendre les bases de la technique des ions survivants, ainsi que pour m'avoir aiguillée au travers des résultats obtenus. Également merci à Vincent Carré et Frédéric Aubriet pour avoir accepté de réaliser des analyses sur le FT-ICR auxquelles j'aurais grandement voulu assister.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du LMP qui m'ont suivie tout au long de cette thèse. Je tiens tout d'abord à remercier Guillaume Cazals, sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, de m'avoir conseillée et de m'avoir aidée à dompter ces spectromètres de masses (sans oublier l'UPLC…). Merci à Aurélien Lebrun et ses blagues, sans qui ces longues heures assise devant le spectro auraient parfois été monotones. Également merci à Gilles Valette pour sa disponibilité et son aide. Je ne peux oublier Alexia Fataka et sa force herculéenne, et la remercie pour m'avoir accompagnée tout au long des aventures rocambolesques que nous avons pu vivre au labo. Je voudrais également remercier Eddy Petit, avec qui j'ai partagé le petit amaZon, de m'avoir laissé ses réservations à de nombreuses reprises lors de petits moments critiques, ainsi que pour son aide.

Merci à Pascal Verdie et Elodie Carretero qui m'ont permis de replonger pendant quelques semaines dans les joies de la synthèse. Ces peptides nous ont donné du fil à retordre, mais notre obstination nous a permis d'y arriver.

Je remercie l'équipe F12 pour m'avoir accompagnée et soutenue tout au long de cette thèse. Un merci tout particulier à Claudia Muracciole Bich, pour qui j'ai beaucoup de reconnaissance. Merci pour les discussions scientifiques mais aussi pour avoir pris le temps de me redonner confiance et de m'encourager à continuer tout au long de ces années. Également merci à Catherine Perrin et Yoann Ladner pour leurs conseils ainsi que pour m'avoir formée et surtout aidée à l'analyse par électrophorèse capillaire, qui n'était vraiment pas de tout repos. Merci aussi à Adrien Chouchou et Sébastien Dutertre pour leur aide sur différents aspects.

Je voudrais également remercier les enfants de l'équipe F12. Tout d'abord Thao Nhi Le et Fabrice Saintmont pour votre bienveillance, votre soutien, mais également vos conseils ces derniers mois. Également merci à Aline Cournut pour son aide scientifique. J'espère que vous continuerez à faire résonner les douces chansons de Keen'V dans ce bureau quand je serai partie.

Merci à Ella Tyson, stagiaire M1, pour sa bonne volonté pendant ses deux mois de stage ainsi que pour m'avoir aidée à l'interprétation de quelques spectres en retard. Merci également à Marius Jouan qui m'a aidée à récupérer des données essentielles en dernière minute.

Il y a les amis, il y a la famille, et puis il y a les amis qui deviennent la famille.

Merci à vous : Synthia (aka la biscotte), Laure (aka Booba Kaaris), Roxane (aka Roxette), Maxime (aka Maximus), Samantha (aka Xena Brutus), Florian (aka le triton). Merci pour tous ces moments passés au labo, en dehors du labo, pour ces soirées en ville, à la plage ou au QG (merci Flo). Merci pour avoir embelli mes deux dernières années par nos fous rires, nos discussions. Merci pour votre soutien inconditionnel, pour avoir toujours cru en moi, pour m'avoir aidée à remonter la pente. Merci pour tous les 'copaings'. Je ne peux oublier les derniers arrivés, Luigi, Joao et Maxime (trois petits rayons de soleil ou démons, je ne sais pas encore) : merci pour votre soutien ces derniers mois.

Un merci tout particulier à Florian, Samantha et Fanny, mes petits cafards. Merci pour votre présence, votre aide, votre amitié. Vous savez déjà tout !

Merci aussi à ma petite Mireille (ou Emilie) pour ton soutien et ta confiance ; d'y avoir cru quand je n'y croyais plus. Merci de m'avoir toujours redonné confiance.

Merci à l'irremplaçable Karl (encore connu sous le doux prénom de Jérémie) pour ton aide précieuse, tes cours sur power point ou excel ou je ne sais quoi d'autre. Tes blagues et jeux de mots douteux ne me manquent pas, contrairement à nos fous rires au labo.

Je tiens également à remercier ma petite salsera Feten pour ces moments de légèreté qui m'ont permis de penser à autre chose ces deniers mois. J'espère pouvoir bientôt t'appeler petite tanguera.

Enfin, je tiens à remercier ma famille : ma moman, Jean-Jean et mon petit frère adoré. Merci d'avoir toujours répondu présent, pour vos allers-retours à Montpellier pour me rebooster, d'avoir toujours cru en moi. Ces trois années ont été complexes, mais vous ne m'avez pas lâchée et je vous en remercie. Vous pouvez souffler, ces prochaines années seront plus calmes. Enfin… je crois…

Titres et travaux

Publications :

JASMS 2020 - Dissociation Pattern of Sodiated Amide Peptides as a Tool for De Novo Sequencing, DOI: 10.1021/jasms.0c00269

Analytical Biochemistry 2022 - Revealing C-terminal peptide amidation by the use of the survival yield technique, DOI : 10.1016/j.ab.2022.114823

Talanta 2022 - Quantitating α-Amidated Peptide Degradation by Separative Technologies and Ultra-High Resolution Mass Spectrometry, DOI : 10.1016/j.talanta.2022.124036

Communications

Orales

10/12/20 | *Demi-journée scientifique du club jeune de la SFSM*

Dissociation de peptides amides sodés comme outil de séquençage De Novo

18/06/21 | *Journées Françaises de Spectrométrie de Masse 2021*

Séparation par spectrométrie de masse de peptides amidés et carboxylés à partir de la technique des ions survivants

Posters

15-18/06/21 | *Balard Chemistry Conference 2021 - Montpellier*

Amidated and carboxylated peptides mass spectrometric separation based on the survival yield technique

29/08/22 - 02/09/22 | *International Mass Spectrometry Conference 2022 - Maastricht*

Revealing C-terminal peptide amidation by the use of the survival yield technique

05-08/09/22 | *Analytics 2022 - Nantes*

Quantitating α-Amidated Peptide Degradation by Separative Technologies and Mass Spectrometry

Sommaire

Résumé **3**

Remerciements **5**

Titres et travaux **7**

Publications 7

Communications 7

Sommaire **9**

Abréviations **13**

Positionnement et résumé des travaux de thèse **15**

Références 18

Contexte des travaux de thèse **21**

Echantillons 21

Instrumentations 21

Collaborations 21

Encadrement 21

Participation aux congrès/colloques 21

Organisation du manuscrit **23**

I. Introduction **27**

1) Synthèse peptidique 27

a) Principe 27

b) Synthèses réalisées 32

c) Rendements obtenus 33

2) Caractérisation de peptide par spectrométrie de masse 34

a) Spectrométrie de masse 34

b) Fragmentation peptidique 50

c) Séquençage De Novo 61

3) Techniques séparatives 62

a) Chromatographie Liquide 62

b) Electrophorèse capillaire 63

4) Références 65

5) Liste Figures et Tableaux 74

II. Dissociation de peptides amides et acides par différents agents d'ionisation **77**

1) Dissociation de peptides amides sodés comme outil de séquençage *de novo* 77

a) Publication (DOI : 10.1021/jasms.0c00269, JASMS, 2020) 77

b) Supplemental information 94
2) Cationisation par un métal alcalino-terreux : le magnésium 110
a) Matériel et Méthode 110
b) Résultats 110
3) Conclusion 112
4) Références 113
5) Annexes 114
6) Liste Figures et Tableaux 125
III. Caractérisation spécifique de peptides amides par la technique des ions survivants 129
1) Usage de la spectrométrie de masse résolue en énergie 129
a) Publication (Analytical Biochemistry, 2022, DOI : 10.1016/j.ab.2022.114823) 130
b) Supplemental information 148
2) Cationisation au magnésium 170
3) Impact de certains résidus 172
a) Effets des résidus amides et acides 172
b) Etude de la régiosélectivité (chaine latérale *vs* squelette) 175
4) Peptides dichargés 178
5) Application à des peptides naturels isolés et caractérisés 179
6) Application à un mélange naturel complexe 184
a) Matériel et Méthode 184
b) Développement d'une méthode LC 185
c) Modification de la méthode MS^2 186
d) Couplage LC-MS/MS 187
7) Références 191
8) Annexes 194
9) Liste Figures et Tableaux 215
IV. Séparation de peptides amide et acide par différentes méthodes analytiques 219
1) Utilisation de la mobilité ionique 219
a) Matériel et Méthode 220
b) Résultats 222
2) Séparation des peptides amides et acides - Quantification du peptide acide par spectrométrie de masse et des techniques séparatives 224
a) Publication (Talanta, 2022, DOI : 10.1016/j.talanta.2022.124036) 224
b) Supplemental information 241
3) Références 252
4) Annexes 254

5) Liste Figures et Tableaux 273
V. Comparaison de recouvrements de séquences de peptides activés par CID ou ETD 277
1) Introduction 277
2) Matériel et méthode 282
3) Résultats 284
a) Exemple d'interprétation des résultats pour un peptide 284
b) Dissociations de peptides trypsiques et non trypsiques amidés 286
c) Dissociations de peptides amide et acide 290
4) Conclusion 291
5) Références 292
6) Annexes 296
7) Liste Figures et Tableaux 310
VI. Perspectives 313
1) Peptides contenant des résidus de série D 313
2) Le résidu Glycine 316
3) Références 321
4) Annexes 325
5) Liste Figures et Tableaux 328
VII. Conclusion 331

Abréviations

ACN : Acétonitrile

ADME : Adsorption-Distribution-Métabolisation-Excrétion

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BGE : B*ackGround Electrolyte ;* Electrolyte de fond

BIRD : *Blackbody infrared radiative dissociation ;* Dissociation radiative infrarouge du corps noir

Boc : Tert-butoxycarbonyle

CID / CAD : *Collision induced/activated dissociation* ; Dissociation induite par collision

CCS : *Cross collision section* ; Section efficace de collision

CRF : *Charge remote fragmentation* ; Mécanisme éloigné de la charge

CZE : *Capillary zone electrophoresis* ; Electrophorèse capillaire de zone

DCM : Dichlorométhane

DIC : N,N'-diisopropylcarbodiimide

DIEA : N,N-Diisopropyléthylamine

DMF : N,N-diméthylformamide

DT-IMS : *Drift-tube ion mobility spectrometry* ; Spectrométrie de mobilité ionique à tube de dérive

ECD : *Electron capture dissociation* ; Dissociation par capture d'électron

EoF : *Electroosmotic flow* ; Flux électro-osmotique

ERMS : *Energy resolved mass spectrometry* ; Spectrométrie de masse résolue en énergie

ESI : Electrospray ionization

ETD : *Electron transfer dissociation* ; Dissociation par transfert d'électron

FDA : Food and Drug Administration

Fmoc : Fluorénylméthoxycarbonyle

FT-ICR MS : *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry* ; Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier

HATU : Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium

HCD : *High collision dissociation* ; Dissociation induite par collision à haute énergie

HPLC : *High pressure liquid chromatography* ; Chromatographie liquide à haute pression

IM-MS (IMS) : *Ion mobility mass spectrometry* ; Spectrométrie de masse à mobilité ionique

IRMPD : *Infrared multiphoton dissociation* ; Dissociation par infrarouge multi-photon

IT : *Ion trap* ; Piège d'ions

LC : Liquid chromatography ; Chromatographie liquide

LID : Laser induced dissociation ; Dissociation induite par laser

MALDI : *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*

MeOH : Méthanol

MPT : Modification Post-Traductionnelle

MS : Spectrométrie de masse

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

MS^n : Spectrométrie de masse itérative

ppm : Partie par million

Oxyma : Cyanohydroxyiminoacétate d'éthyle

RPLC : *Reversed phase liquid chromatography* ; Chromatographie liquide en phase inverse

SPPS : *Solid phase peptide synthesis* ; Synthèse de peptide sur support solide

SY : Survival Yield

TFA : Acide trifluoroacétique

TIS : Triisopropylsilane

Tof : Temps de vol

Trt : Trityl

UVPD : *Ultraviolet photodissociation* ; Photodissociation par ultra-violet

Q : Quadripôle

Positionnement et résumé des travaux de thèse

Les produits naturels sont connus pour contenir un grand nombre de molécules bioactives qui peuvent être utilisées comme point de départ pour la découverte de nouveaux médicaments [1-4]. En effet, les molécules présentes dans des échantillons issus de plantes, d'organismes marins, de micro-organismes ou encore de venins [4], ont plus de chance d'être biologiquement actives que des composés issus d'approches de synthèse dirigée ou combinatoire [5] puisque ces molécules ont été sélectionnées au cours de l'évolution pour leurs activités et spécificités. Les produits naturels présentent une très grande diversité de structures chimiques et possèdent des caractéristiques particulières par rapport aux molécules synthétiques [6] : l'hydrophilie, la rigidité du squelette carboné, la masse moléculaire, le nombre d'accepteurs et de donneurs de liaisons hydrogènes sont généralement bien plus élevés [5]. Ainsi, en fonction des propriétés recherchées dans le but de développer un candidat médicament, les chimistes sont en capacité d'adapter les éléments structuraux des molécules extraites du milieu naturel afin d'optimiser leurs activités, leurs spécificités, leurs propriétés d'absorption-distribution-métabolisation-excrétion (profil ADME) tout en limitant leurs toxicités [4].

Au sein des biomolécules présentes dans les échantillons naturels cités précédemment, on retrouve des métabolites primaires et secondaires (petites molécules organiques), de l'acide désoxyribonucléique ou de l'acide ribonucléique (respectivement ADN et ARN), des lipides, des sucres, des acides aminés, des protéines, des enzymes ou encore des peptides [4,7]. Parmi tous ces composés de structures chimiques et de poids moléculaires très divers, les peptides ont des propriétés attrayantes en tant qu'agents thérapeutiques en raison de leur grande spécificité, faible toxicité, large couverture de cibles avec des mécanismes d'actions connus et un faible risque d'interaction médicamenteuse [8-10]. De ce fait, les peptides thérapeutiques ont progressivement été introduits dans l'industrie pharmaceutique [11]. Sur l'année 2021, la Food Drug Administration (FDA) a autorisé la mise sur le marché de 8 peptides sur 50 nouveaux médicaments (dont 36 nouvelles entités chimiques et 14 produits biologiques). Sur la période 2016-2021, les peptides et oligonucléotides représentent 13% des médicaments approuvés par la FDA [12].

Malgré les nombreux avantages des peptides thérapeutiques, leur administration par voie orale constitue néanmoins un défi. En effet, ces biomolécules présentent une faible perméabilité aux membranes cellulaires, une stabilité limitée, et donc une faible biodisponibilité orale. Leurs temps de demi-vie relativement courts font qu'ils sont généralement administrés par injection sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse [8,9]. A titre d'illustration, parmi les 8 peptides mis sur le marché en 2021, seuls deux d'entre eux sont prescrits par voie orale. Pour pallier ces difficultés, il est possible de procéder à des modifications chimiques. Ainsi, une première méthode consiste à transformer les fonctions N- et C-terminales du peptide afin de les rendre plus résistants aux peptidases. Ces enzymes, présentes dans l'organisme pour dégrader les peptides, diminuent leur temps de demi-vie et affectent leur stabilité. Alternativement aux groupements protecteurs introduits aux extrémités, il est également envisageable de cycliser les peptides par l'intermédiaire d'un pont disulfure créé entre deux cystéines ou par la formation d'une liaison covalente entre les extrémités N- et C-terminales (cyclisation tête-queue). Des modifications du squelette peptidique ou de chaines latérales de certains résidus, voire l'incorporation d'acides aminés non naturels sont aussi réalisables [13].

Les venins d'animaux sont connus pour contenir un grand nombre de peptides bioactifs (composants majeurs de ces échantillons) [7,14-16]. Par la grande diversité d'espèces venimeuses, de très nombreuses investigations ont été menées dans une démarche de découverte de médicaments afin d'identifier des séquences peptidiques d'intérêt. Ces études dites de vénomique visent à identifier des toxines à forte activité et sélectivité pour les exploiter comme agent thérapeutique [17-19]. Par exemple, en 1981, le premier médicament basé sur une toxine animale dérivée d'un venin de serpent (Bothrops jararaca) a été approuvée par la FDA pour un usage sur l'Homme (effet hypotensif) [15,16]. Parmi les espèces animales étudiées pour leur venin, les cônes (genre *Conus*, gastéropodes marins prédateurs), qui constituent le plus grand genre vivant d'animaux marins (500 espèces), sont étudiés au laboratoire par S. Dutertre. La majorité des composants de leurs venins sont des peptides riches en pont disulfures, généralement d'une longueur de 7 à 35 acides aminés qui présentent également un grand nombre de modifications post-traductionnelles [20].

Parmi les modifications post-traductionnelles (MPT) répertoriées pour les toxines de cône, on retrouve l'épimérisation des résidus L en résidus D, la sulfonation des tyrosines, la bromation des tryptophanes, la glycosylation des sérines et thréonines, l'hydroxylation de prolines ou encore l'amidation de la fonction C-terminale [20]. Comme énoncé précédemment, cette dernière modification post-traductionnelle présente l'avantage d'augmenter le temps de demi-vie et la stabilité des peptides au sein de l'organisme où ils ont été administrés [13,21]. De plus, une majorité des peptides amides connus, quels que soient leurs origines, présentent une activité biologique [22,23], d'où l'importance de s'intéresser à ces peptides en particulier, au-delà de l'attrait qu'ils présentent pour des recherches en vénomique.

Dans le cadre de cette thèse effectuée dans l'équipe Sciences analytiques de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, les travaux de recherche ont été focalisés sur la détection et la caractérisation de peptides C-amidés afin de les mettre en évidence dans des mélanges complexes tels que les extraits naturels issus de venins de cônes.

Bien que connue pour contribuer à l'activité biologique d'un peptide (ou d'une protéine) [24], il est important de souligner que l'amidation de la fonction C-terminale est une modification post-traductionnelle qui n'a pas fait l'objet de beaucoup d'attention à ce jour. D'un point de vue analytique, en raison du nombre de peptides biologiquement actifs dans les extraits naturels, et le manque d'informations génomiques, transcriptomiques et protéomiques à partir desquelles les bases de données de peptides virtuels sont générées, le séquençage *de novo* par spectrométrie de masse constitue l'outil de choix pour l'étude de peptides naturels [16].

D'un point de vue de la spectrométrie de masse, les peptides amides diffèrent de 0.984 Da des peptides dits natifs (possédant une fonction acide carboxylique C-terminale), résultant en une superposition des deux massifs isotopiques. Cette superposition empêche une caractérisation spécifique des peptides amides en générant des spectres MS/MS chimériques enregistrés avec des spectromètres de masse de basse ou haute résolution. De plus, cette différence de masse peut également s'expliquer par la différence de masse entre certains couples de résidus comme l'acide aspartique et l'asparagine ou l'acide glutamique et la glutamine. Comme pour la modification C-terminale du squelette peptidique, la modification de ces chaines latérales peut se produire à partir de réactions de dégradation (hydrolyse de la fonction amide en fonction acide, lors du stockage ou de la manipulation de l'échantillon) compliquant l'analyse par la problématique de la régiosélectivité. D'une manière générale, il est important de pouvoir identifier sans ambigüité la présence de ces

peptides de séquences identiques mais terminés à une extrémité par une fonction amide ou acide carboxylique, puisque les deux molécules peuvent présenter des propriétés biologiques différentes [25-27].

Cette thèse s'est donc centrée sur la caractérisation structurale de peptides carboxylés et amidés par spectrométrie de masse en tandem avec diverses configurations instrumentales : sources d'ionisation Electrospray (ESI) et Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), analyseurs de masse à Temps de vol (QTof) et pièges d'ions (IT et ICR), activations vibrationnelles et électroniques (CID basse énergie, ETD), mobilité ionique (IM-MS). Des études de longue date menées dans l'équipe sur les comportements de dissociation des peptides en phase gazeuse [28-31] ont été poursuivies afin de contribuer à la connaissance approfondie des règles de fragmentation requises pour un séquençage De Novo efficace et fiable de peptides naturels issus de venins de cônes [32]. Un séquençage partiel en raison de longues séquences, de peptides structurés par des ponts disulfures ou portant des modifications post-traductionnelles constitue une problématique particulièrement délicate dans de nombreux cas, rencontrés couramment dans les extraits naturels ciblés. La mise au point d'outils analytiques destinés d'une part, à différencier sans ambiguïté les peptides amidés des séquences carboxylées permettant la caractérisation des composés isomères (modification latérale ou C-terminale) et, d'autre part, à améliorer la couverture de séquence pour une identification la plus complète possible a été explorée (publication n°1). Parallèlement à leur identification, la séparation des couples de peptides acides/amides a aussi été entreprise afin de répondre aux enjeux d'études vénomiques. Des expériences de spectrométrie de masse résolues en énergie ont donné des résultats très prometteurs (publication n°2). Cette technologie a été appliquée à un échantillon de venin. Enfin, la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution ainsi que les techniques séparatives conventionnelles comme la chromatographie liquide haute performance mais aussi l'électrophorèse capillaire ont été mises en œuvre pour sonder la faisabilité de détection et de quantification de traces du peptide acide comme produit de dégradation du peptide amide dans le cadre du contrôle qualité de peptides thérapeutiques (publication n°3).

Références

1. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JM, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM, Stuppner H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv.* 2015 Dec;33(8):1582-1614. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.
2. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*. 2015 Feb;14(2):111-29. doi: 10.1038/nrd4510.
3. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012 Mar 23;75(3):311-35. doi: 10.1021/np200906s.
4. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jun;1830(6):3670-95. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
5. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM; International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Mar;20(3):200-216. doi: 10.1038/s41573-020-00114-z.
6. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012 Apr 16;2(2):303-36. doi: 10.3390/metabo2020303
7. Waheed H, Moin SF, Choudhary MI. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. *Curr Med Chem*. 2017;24(17):1874-1891. doi: 10.2174/0929867324666170605091546
8. Di L. Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *AAPS J.* 2015 Jan;17(1):134-43. doi: 10.1208/s12248-014-9687-3.
9. Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des*. 2013 Jan;81(1):136-47. doi: 10.1111/cbdd.12055.
10. Dubey SK, Parab S, Dabholkar N, Agrawal M, Singhvi G, Alexander A, Bapat RA, Kesharwani P. Oral peptide delivery: challenges and the way ahead. *Drug Discov Today*. 2021 Apr;26(4):931-950. doi: 10.1016/j.drudis.2021.01.001
11. de la Torre BG, Albericio F. Peptide Therapeutics 2.0. *Molecules*. 2020 May 13;25(10):2293. doi: 10.3390/molecules25102293.
12. Al Shaer D, Al Musaimi O, Albericio F, de la Torre BG. 2021 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022 Feb 13;15(2):222. doi: 10.3390/ph15020222.
13. McGregor DP. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Oct;8(5):616-9. doi: 10.1016/j.coph.2008.06.002.
14. Smallwood TB, Clark RJ. Advances in venom peptide drug discovery: where are we at and where are we heading? *Expert Opin Drug Discov*. 2021 Oct;16(10):1163-1173. doi: 10.1080/17460441.2021.1922386.
15. Bordon KCF, Cologna CT, Fornari-Baldo EC, Pinheiro-Júnior EL, Cerni FA, Amorim FG, Anjolette FAP, Cordeiro FA, Wiezel GA, Cardoso IA, Ferreira IG, de Oliveira IS, Boldrini-França J, Pucca MB, Baldo MA, Arantes EC. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Front Pharmacol.* 2020 Jul 24;11:1132. doi: 10.3389/fphar.2020.01132.
16. Vetter I, Davis JL, Rash LD, Anangi R, Mobli M, Alewood PF, Lewis RJ, King GF. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino Acids*. 2011 Jan;40(1):15-28. doi: 10.1007/s00726-010-0516-4.

17. Oldrati V, Arrell M, Violette A, Perret F, Sprüngli X, Wolfender JL, Stöcklin R. Advances in venomics. *Mol Biosyst.* 2016 Nov 15;12(12):3530-3543. doi: 10.1039/c6mb00516k.
18. Escoubas P, King GF. Venomics as a drug discovery platform. *Expert Rev Proteomics*. 2009 Jun;6(3):221-4. doi: 10.1586/epr.09.45.
19. Dutertre S. Venomics in medicinal chemistry. *Future Med Chem.* 2014 Oct;6(15):1609-10. doi: 10.4155/fmc.14.117.
20. Craig AG, Bandyopadhyay P, Olivera BM. Post-translationally modified neuropeptides from Conus venoms. *Eur J Biochem.* 1999 Sep;264(2):271-5. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00624.x.
21. Henninot A, Collins JC, Nuss JM. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J Med Chem.* 2018 Feb 22;61(4):1382-1414. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00318.
22. Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, González LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N. Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J Biol Chem.* 2007 Sep 7;282(36):26354-60. doi: 10.1074/jbc.M701665200.
23. Eipper BA, Stoffers DA, Mains RE. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu Rev Neurosci.* 1992;15:57-85. doi: 10.1146/annurev.ne.15.030192.000421.
24. Jakubowski JA, Kelley WP, Sweedler JV. Screening for post-translational modifications in conotoxins using liquid chromatography/mass spectrometry: an important component of conotoxin discovery. *Toxicon*. 2006 May;47(6):688-99. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.01.021.
25. Konopińska D, Rosiński G, Sobótka W. Insect peptide hormones, an overview of the present literature. *Int J Pept Protein Res.* 1992 Jan;39(1):1-11. doi: 10.1111/j.1399-3011.1992.tb01548.x.
26. Liu DT. Deamidation: a source of microheterogeneity in pharmaceutical proteins. *Trends Biotechnol.* 1992 Oct;10(10):364-9. doi: 10.1016/0167-7799(92)90269-2.
27. Stefanucci A., Dimmito M. P., Tenore G., Pieretti S., Minosi P., Zengin G., Sturaro C., Calò G., Novellino E., Cichelli A., Mollica A., Plant-derived peptides rubiscolin-6, soymorphin-6 and their c-terminal amide derivatives: Pharmacokinetic properties and biological activity. *Journal of Functional Foods*. 2020;73 1-9. doi: 10.1016/j.jff.2020.104154.
28. Mouls L, Aubagnac JL, Martinez J, Enjalbal C. Low energy peptide fragmentations in an ESI-Q-Tof type mass spectrometer. *J Proteome Res*. 2007 Apr;6(4):1378-91. doi: 10.1021/pr060574o.
29. Shenar N. , Sommerer N., Martinez J. and Enjalbal C., Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides. *J Mass Spectrom.* 2009 May;44(5):621-32. doi: 10.1002/jms.1535.
30. Dupré M, Cantel S, Verdié P, Martinez J, Enjalbal C. Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011 Feb;22(2):265-79. doi: 10.1007/s13361-010-0022-7.
31. Dupré M, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C. Occurrence of C-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2012 Feb;23(2):330-46. doi: 10.1007/s13361-011-0254-1
32. Giribaldi J, Wilson D, Nicke A, El Hamdaoui Y, Laconde G, Faucherre A, Moha Ou Maati H, Daly NL, Enjalbal C, Dutertre S. Synthesis, Structure and Biological Activity of CIA and CIB, Two α-Conotoxins from the Predation-Evoked Venom of Conus catus. *Toxins (Basel).* 2018 Jun 1;10(6):222. doi: 10.3390/toxins10060222.

Contexte des travaux de thèse

Echantillons :

Les méthodologies analytiques ont été développées à partir de peptides synthétiques disponibles au laboratoire sous forme acide et amide (une centaine de séquences). Afin de répondre à certains questionnements, 26 séquences supplémentaires ont été préparées avec l'aide de Pascal Verdie (Plateforme SynBio3 de l'IBMM). Le venin de cône constituant le modèle de validation des stratégies proposées a été fourni en fin de thèse par Sébastien Dutertre de l'équipe Sciences Analytiques de l'IBMM.

Instrumentations :

J'ai utilisé trois spectromètres de masse basse et haute résolution du Laboratoire de Mesures Physiques (Plateforme technologique de l'Université de Montpellier) après habilitation dispensée par Guillaume Cazals (amaZon speed, Bruker et Synapt G2S, Waters) et Gilles Valette (rapifleX, Bruker). Par ailleurs, G. Cazals a aussi contribué à l'optimisation des paramètres d'acquisition du piège d'ions (amaZon speed, Bruker) lors des expériences de spectrométrie de masse résolue en énergie (co-auteur de la publication n°2).

Collaborations :

Une collaboration avec Antony Memboeuf de l'Université de Brest a été initiée afin d'appliquer la spectrométrie de masse résolue en énergie à la problématique de séparation des peptides acides/amides. J'ai effectué un séjour d'une semaine (du 2 au 7 mars 2020) dans son laboratoire pour être formée aux rudiments de cette technique sur un spectromètre de masse triple quadripôlaire (Quattro Ultima, Waters). La difficulté a été de transposer la méthodologie sur un instrument d'une plateforme (non modifiable car à usage multiple) qui ne pouvait donc pas subir les mêmes types de réglages/conditions opératoires.

Une deuxième collaboration a été nouée avec Vincent Carré et Frédéric Aubriet pour compléter les outils de spectrométrie de masse à disposition à l'Université de Montpellier pour la séparation des peptides acide/amide avec la technologie FT-ICR. Les analyses de spectrométrie de masse référencées dans la publication n°3 ont ainsi été effectuées dans le cadre de l'infrastructure IR INFRANALYTICS FR-2054 CNRS.

Enfin, Catherine Perrin et Yoann Ladner de l'équipe Sciences Analytiques de l'IBMM, qui m'ont formée aux techniques séparatives, ont contribué aux développements des méthodes HPLC et EC décrites dans la publication n°3.

Encadrement :

L'étudiante Ella Tyson en Master 1 Chimie des Biomolécules de l'Université de Montpellier a participé aux travaux de thèse de mai à juillet 2022. Je l'ai encadrée sur l'application de la méthode développée en spectrométrie de masse résolue en énergie à un échantillon de venin.

Participation aux congrès/colloques

Lors de ces trois années de thèse (Octobre 2019-Septembre 2022), j'ai pu participer à différents congrès (en distanciel en 2020-2021 ou en présentiel en 2022) au niveau local (Conférences Balard), national (SFSM, Analytics) ainsi qu'international (IMSC, Maastricht). Pour ce dernier congrès, je tiens à remercier la SFSM qui m'a octroyé une bourse pour que je puisse y participer.

Organisation du manuscrit

Les références ainsi que les figures seront référencées à la fin de chaque chapitre correspondant. Les peptides seront numérotés par chapitre et non sur l'ensemble du manuscrit car ils ont été sélectionnés dans différents contextes.

Trois chapitres sont constitués de publications parues accompagnées des informations supplémentaires. De plus, des résultats complémentaires n'ayant pas fait l'objet de mention/discussion dans ces publications sont également présentés pour chaque partie.

L'organisation du mémoire se présente ainsi.

En introduction, le principe de la synthèse peptidique employée pour préparer des peptides de séquences spécifiques d'intérêt est présenté. Puis, les différentes technologies utilisées en spectrométrie de masse (ESI-IT, ESI-QTof, MALDI-Tof/Tof, ESI-FT-ICR), ainsi que les techniques séparatives (chromatographie liquide et électrophorèse capillaire) sont développées.

Dans le **Chapitre 1**, la fragmentation de peptides amides et acides cationisés par un ion sodium a été étudiée dans le but de trouver des fragmentations spécifiques aux peptides amides pouvant permettre leur caractérisation (DOI : 10.1021/jasms.0c00269, JASMS, 2020). La dissociation issue d'une cationisation de peptides par un ion magnésium a été étudiée en complément.

En se basant sur ces résultats, des courbes d'ions survivants (spectrométrie de masse résolue en énergie) ont été réalisées grâce aux comportements de fragmentation différents des peptides acides et amides sur un piège à ions de basse résolution décrit dans le **Chapitre 2**. Cette méthode permet de séparer les deux peptides dans le but de caractériser la séquence amidée spécifiquement, et ce malgré la superposition initiale des deux massifs isotopiques (DOI : 10.1016/j.ab.2022.114823, Analytical Biochemistry, 2022). Cette stratégie MS/MS n'a cependant pas été concluante pour la quantification de peptide acide présent dans le massif isotopique du peptide amide. En supplément, la régiosélectivité de la position variable acide/amide (chaine latérale *vs* squelette), l'application de la méthode à des peptides supérieurs à 1000 $g.mol^{-1}$, à des peptides naturels ainsi qu'à un mélange complexe (venin de cône) ont été étudiés. Les principaux résultats sont présentés à la suite de la publication.

Pour compléter les investigations sur la séparation des peptides amides et acides par spectrométrie de masse, des expériences de mobilité ionique ont été menées et décrites dans le **Chapitre 3**. En parallèle de cette stratégie de séparation en phase gazeuse, la distinction des peptides amides et acides a été obtenue par les techniques séparatives de chromatographie liquide et d'électrophorèse capillaire. Les méthodes ainsi développées afin de détecter et quantifier des traces du peptide acide dans un échantillon de peptide C-amidé ont été comparées aux valeurs obtenues en spectrométrie de masse FT-ICR d'ultra-haute résolution (DOI : 10.1016/j.talanta.2022.124036).

Enfin, le **Chapitre 4** résume les expériences complémentaires à celles décrites dans le chapitre 1 pour optimiser le recouvrement de séquence en comparant les méthodes d'activation CID et ETD pour une sélection de peptides à différents états de charge générés par des agents d'ionisation différents (protonés et sodés).

Une conclusion et des perspectives clôturent ce mémoire.

I. INTRODUCTION

I. Introduction

I) Synthèse peptidique

a) Principe

La synthèse de peptides s'effectue de façon automatisée sur support solide. Pour ce faire, les 20 acides aminés protéinogéniques de configuration L, qui sont prédominants dans le monde du vivant (voir Tableau 1), ont été utilisés pour la préparation des séquences nécessaires aux travaux de thèse. Les acides aminés de configuration D, très présents dans les peptides issus des animaux marins, ne seront pas utilisés pour la synthèse des peptides, puisqu'il est délicat de différencier les stéréoisomères en spectrométrie de masse. La méthodologie de la synthèse peptidique sur support solide (SPPS) est brièvement présentée ci-dessous.

La synthèse sur support solide fut introduite en 1963 par le Professeur R.B. Merrifield [1]. Il eut l'idée d'utiliser un polymère insoluble (polystyrène réticulé) sur lequel était ancré le premier acide aminé. Cette méthode de synthèse permettait donc d'éviter les réactions secondaires puisque l'un des acides aminés est immobilisé sur une phase solide, et ne présente donc plus qu'une seule fonction disponible pour le couplage peptidique. Cette découverte valut au Pr. Merrifield le Prix Nobel en 1984.

Contrairement aux processus biologiques, la synthèse chimique de peptides s'effectue par couplage successif d'acide aminé de la fonction C-terminale vers la fonction N-terminale afin d'éviter toute racémisation. De plus, la synthèse peptidique doit se dérouler dans des conditions suffisamment douces pour garantir l'intégrité du peptide, et également éviter la formation de produits secondaires [2]. En particulier, les fonctions réactives des chaines latérales des acides aminés sont masquées au préalable par des groupements protecteurs stables lors de l'élongation de la séquence.

Il existe deux grandes stratégies pour la synthèse peptidique sur support solide : la méthode Fmoc développée par Sheppard [3] et la méthode Boc originelle [1]. Ces deux approches diffèrent selon la nature du support solide (billes de résine de polystyrène ou de polyamide) et du réactif de clivage pour libérer le peptide en croissance. La méthode Fmoc nécessite de l'acide trifluoroacétique (TFA) concentré tandis que la méthode Boc requiert de l'acide fluorhydrique (HF) qui ne peut être manipulé que sous certaines conditions très strictes de sécurité en raison de sa dangerosité. De fait, la stratégie Fmoc est la plus utilisée car elle est plus simple de mise en œuvre, efficace, rapide et permet de libérer le peptide du support tout en déprotégeant les chaines latérales en une seule étape [4].

La synthèse peptidique peut donc se résumer à une succession d'étapes de couplage et de déprotection jusqu'à obtenir le peptide attendu après décrochage du support (voir Figure 1).

Pour garantir la formation des liaisons peptidiques, des agents de couplage sont utilisés pour activer la fonction acide de l'acide aminé à ajouter (Aa_2 sur la Figure 1) en la présence d'une base. Ainsi, l'amine libre de l'acide aminé rattaché au support solide (Aa_1 sur la Figure 1) attaque l'acide carboxylique activé pour créer une fonction amide entre les deux acides aminés comme décrit dans la Figure 1. Il existe plusieurs types d'agents de couplage comme les carbodiimides, ou les uroniums qui ont été utilisés. Pour cette dernière famille, le réactif HATU permet un couplage rapide, donne de très bons rendements, induit peu de racémisation et ne produit pas de produits secondaires toxiques [2,4].

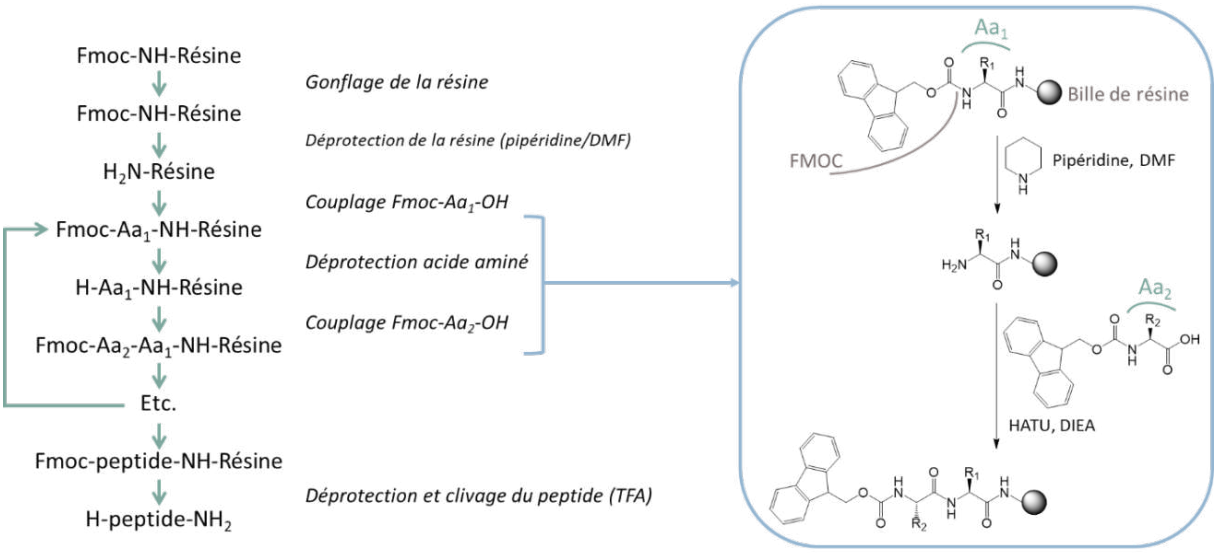
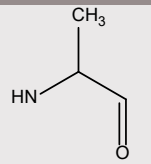
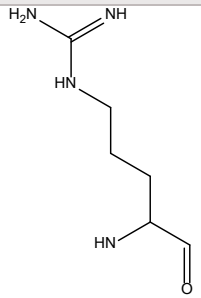
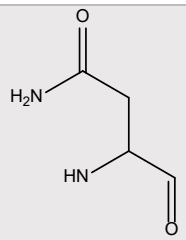
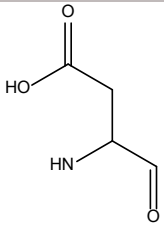
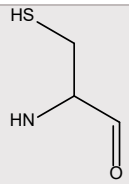
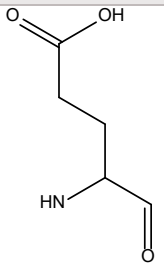
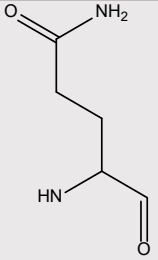


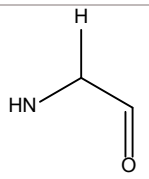
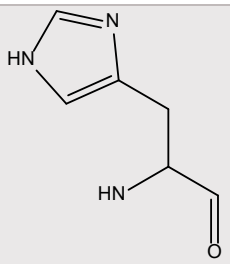
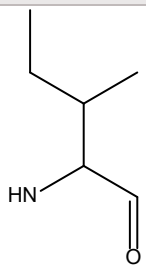
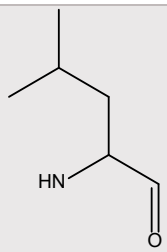
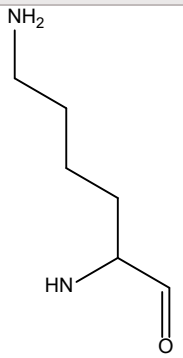
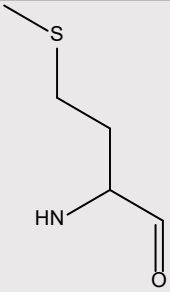
Figure 1 : Principe de la synthèse d'un peptide amide sur support solide en stratégie Fmoc

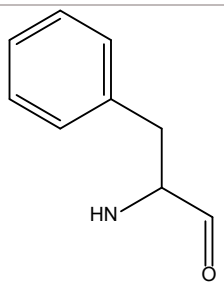
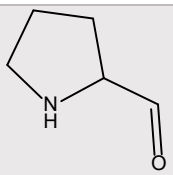
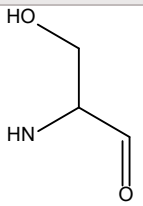
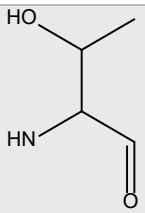
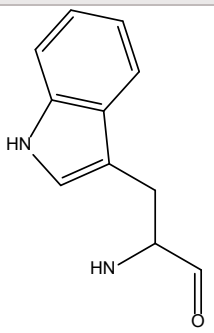
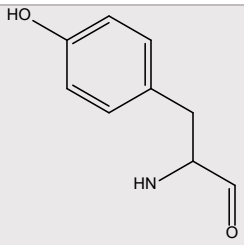
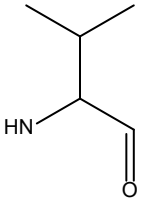
La formation de la liaison peptidique entre deux acides aminés nécessite également la protection de leurs chaines latérales. De façon générale, tous les acides aminés possédant une fonction susceptible de réagir sont commercialisés sous forme protégée. Les protections des chaines latérales des acides aminés restent intactes tout au long de la synthèse du peptide, il est donc nécessaire que les groupements protecteurs utilisés soient orthogonaux à la protection de l'amine en N-terminal. Deux groupes protecteurs sont dit orthogonaux si les conditions de clivage de l'un n'affectent pas la stabilité de l'autre [2,4].

Une fois l'étape d'élongation terminée, la séquence est décrochée des billes de résines par une étape finale de clivage. Cette dernière étape dépend de la résine utilisée, et permet d'obtenir des peptides acides, amides, ou thioesters en fonction de l'ancrage à la résine et du réactif de clivage. Les conditions de clivage doivent donc être compatibles avec la stratégie de synthèse utilisée. Lors de cette dernière étape de clivage, les chaînes latérales sont généralement déprotégées en même temps [2,4].

<u>Tableau 1 :</u> Masses (Da) et structures des résidus des 20 acides aminés protéinogéniques

Acide aminé	Code 3 lettres	Code 1 lettre	Formule brute du résidu	Structure du résidu	Masse mono-isotopique	Masse d'ion caractéristique (ion immonium)
Alanine	Ala	A	C_3H_5NO		71.03711	44.05003
Arginine	Arg	R	$C_6H_{12}N_4O$		156.10111	129.14400
Asparagine	Asn	N	$C_4H_6N_2O_2$		114.04293	87.05584
Acide aspartique	Asp	D	$C_4H_5NO_3$		115.02694	88.03986
Cystéine	Cys	C	C_3H_5NOS		103.00919	76.0221
Acide glutamique	Glu	E	$C_5H_7NO_3$		129.04259	102.05550
Glutamine	Gln	Q	$C_5H_8N_2O_2$		128.05858	101.07150

Glycine	Gly	G	C_2H_3NO		57.02146	
Histidine	His	H	$C_6H_7N_3O$		137.05891	110.07180
Isoleucine	Ile	I	$C_6H_{11}NO$		113.08406	86.09698
Leucine	Leu	L	$C_6H_{11}NO$		113.08406	86.09698
Lysine	Lys	K	$C_6H_{12}N_2O$		128.09496	101.10790 (84.08136)
Méthionine	Met	M	C_5H_9NOS		131.04049	104.05340

Phénylalanine	Phe	F	C_9H_9NO		147.06841	120.08130
Proline	Pro	P	C_5H_7NO		97.05276	70.06510
Serine	Ser	S	$C_3H_5NO_2$		87.03203	60.04440
Thréonine	Thr	T	$C_4H_7NO_2$		101.04768	74.06568
Tryptophane	Trp	W	$C_{11}H_{10}N_2O$		186.07931	159.09220
Tyrosine	Tyr	Y	$C_9H_9NO_2$		163.06333	136.07620
Valine	Val	V	C_5H_9NO		99.06841	72.08133

b) Synthèses réalisées

Les peptides amides et acides du tableau 2 ont été synthétisés sur phase solide sous activation micro-onde grâce au robot Liberty Blue (CEM). Deux méthodes différentes explicitées ci-dessous ont été choisies (réactif DIC/base Oxyma et réactif HATU/base DIEA).

i. Synthèse de peptide amide

Les peptides amides ont été synthétisés à partir d'une résine Rink Amide (RAM) de charge 0.27 $mmol.g^{-1}$, permettant la génération d'une fonction amide C-terminale. Les chaines latérales des résidus Asn sont protégées par un groupement Trt, afin d'éviter des réactions de couplage sur la fonction amide de sa chaine latérale. Pour chaque résidu incorporé, le cycle suivant est appliqué :

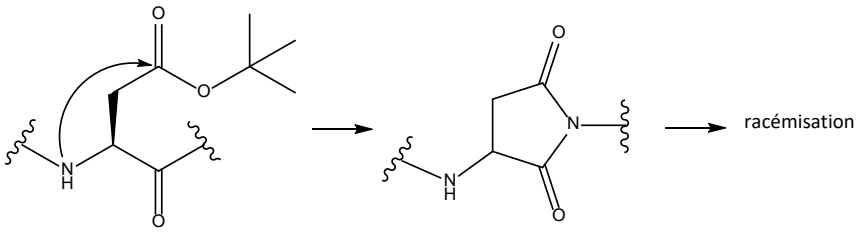
- Déprotection du groupement protecteur de l'acide aminé rattaché à la résine par un mélange pipéridine/DMF (20/80, v/v) à 155W pendant 15 secondes à 75°C puis 30W pendant 50 secondes à 90°C
- 3 lavages de la résine par du DMF
- Double couplage du résidu avec un activateur (DIC) et une base (Oxyma) à 170W pendant 15 secondes à 75°C puis 30W pendant 110 secondes à 90°C.

Une fois tous les résidus incorporés, la résine est lavée à trois reprises avec un mélange DCM/MeOH/DIEA (17/2/1, v/v/v) dans le but de masquer les fonctions n'ayant pas réagi (capping), puis avec du DMF et enfin du DCM. Le peptide est ensuite clivé de la résine avec 10mL d'un mélange TFA/TIS/H_2O (94/3/3, v/v/v), permettant également de déprotéger les chaines latérales des résidus concernés, pendant 1h30 à température ambiante. Le TFA ainsi que le DCM ajoutés sont ensuite évaporés, puis le peptide est précipité dans de l'éther froid. Après lyophilisation, les peptides sont caractérisés par LC-MS. Les peptides amides ainsi générés étant pratiquement purs n'ont pas été purifiés.

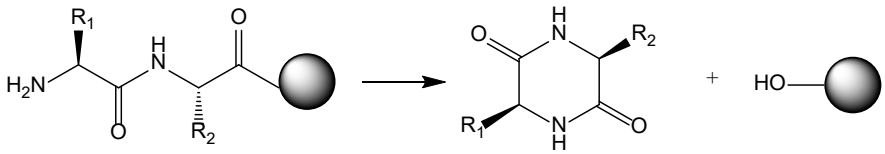
ii. Synthèse de peptide acide

La méthode de synthèse des peptides amides par micro-ondes à chaud ne peut pas être appliquée à la synthèse des peptides acides. En effet, si l'on chauffe alors que le peptide à synthétiser contient une fonction acide protégée sur une chaine latérale ou en position C-terminale, plusieurs réactions peuvent se produire :

- Formation d'aspartimide :



- Formation de dicétopipérazine à partir du deuxième résidu par une réaction intramoléculaire :



De ce fait, les peptides acides (ou les peptides amides contenant un résidu Asp) sont synthétisés par activation micro-ondes à 25°C. Il est également nécessaire d'ajouter le premier résidu C-terminal manuellement en amont, sur une résine 2-chloro-chlorotrityle de charge 0.16 mmol.g^{-1}. Le cycle suivant est donc appliqué sur le robot de synthèse :

- 2 déprotections du groupement protecteur de l'acide aminé rattaché à la résine par un mélange pipéridine/DMF (20/80, v/v) à 15W pendant 600 secondes (10 minutes chacun)
- 3 lavages par du DMF
- 2 couplages à 15W pendant 1500 secondes (25 minutes chacun) avec un activateur (HATU) et une base (DIEA)

Les étapes suivantes (lavages, clivage) sont identiques à la synthèse des peptides amides. Après lyophilisation, les peptides acides sont caractérisés par LC-MS montrant la présence d'impuretés.

c) Rendements obtenus

D'après les analyses LC-MS, la synthèse par HATU/DIEA à 25°C a généré plus de produits secondaires (double incorporation de résidu, délétion, …) que la synthèse par micro-onde à chaud. De ce fait, les peptides dont le pic chromatographique était très proche d'autres produits secondaires pouvant gêner les analyses ultérieures de spectrométrie de masse ont été purifiés (les peptides acides ainsi que les deux peptides amides contenant un résidu Asp). Ces peptides ont été purifiés sur une HPLC préparative PLC 2050 (Gilson) à partir d'une colonne Luna® 5 µm C18(2) 100 Å, 100 x 21.2 mm, AXIA™ (Phenomenex) (phase A : H_2O 0.01 % TFA / phase B : ACN 0.01 % TFA). Les gradients de purification ont été adaptés aux peptides injectés.

Seuls les rendements des peptides purifiés ont été calculés (voir Tableau 2). Les rendements de synthèse des peptides amides bruts n'ont pas été calculés car non significatifs.

Tableau 2 : Séquences synthétisées et rendements obtenus

	-NH_2	**Rendement**	**-OH**	**Rendement**
LAVGIAN	EL1	-	EL1A	8.1 %
LAVGIAD	EL2	35 %	EL2A	9.5 %
LAVNIAG	EL3	-	EL3A	7.4 %
LAVDIAG	EL4	30.5 %	EL4A	10.1 %
LAVGIAQ	EL5	-	EL5A	25.8 %
LAVGIAE	EL6	-	EL6A	21.3 %
LAVQIAG	EL7	-	EL7A	23.4 %
LAVEIAG	EL8	-	EL8A	7.3 %
LAVGIAW	EL10	-	EL10A	9.6 %
LAVAIAR	EL12	-	EL12A	8.1 %
LAVAIAK	EL13	-	EL13A	13.4 %

2) Caractérisation de peptide par spectrométrie de masse

a) Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est une technique d'analyse amplement utilisée pour l'analyse de biomolécules afin de les identifier voire de les quantifier. Brièvement, les molécules sont tout d'abord ionisées, puis les ions moléculaires à caractériser sont activés afin être dissociés en ions fragments pour être ensuite admis dans l'analyseur de masse. Il est également possible de séparer les ions en phase gazeuse en mobilité ionique afin d'ajouter un élément de connaissance supplémentaire. Toutes les technologies mises en œuvre lors des diverses expériences de spectrométrie de masse conduites dans ce travail de thèse sont décrites ci-dessous afin de faire ressortir les points clés de compréhension des optimisations des conditions opératoires.

Les sources d'ionisation Electrospray (ESI) et Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), les techniques d'activation de type Collision-Induced Dissociation (CID), Laser Induced Dissociation (LID, décompositions métastables) et Electron Transfer Dossociation (ETD) ainsi que les analyseurs de masse basse résolution de type piège d'ions (IT), haute résolution à Temps de Vol (Tof), et ultra-haute résolution (FT-ICR) ont constitué le cadre des études menées sur 3 spectromètres de masse basse et haute résolution disponibles à l'Université de Montpellier au sein de la Plateforme Laboratoire de Mesures Physiques et un instrument ultra-haute résolution de l'infrastructure IR INFRANALYTICS FR-2054 CNRS. J'ai ainsi effectué toutes les expériences en ESI-IT (amaZon speed, Bruker) (voir Figure 2), ESI-IM-QTof (Synapt G2S, Waters) (voir Figure 3) et MALDI-Tof/Tof (rapifleX, Bruker) (voir Figure 4), tandis que les analyses en FT-ICR (Solarix 2XR, Bruker) ont été prises en charge par V. Carré dans le cadre d'une collaboration.

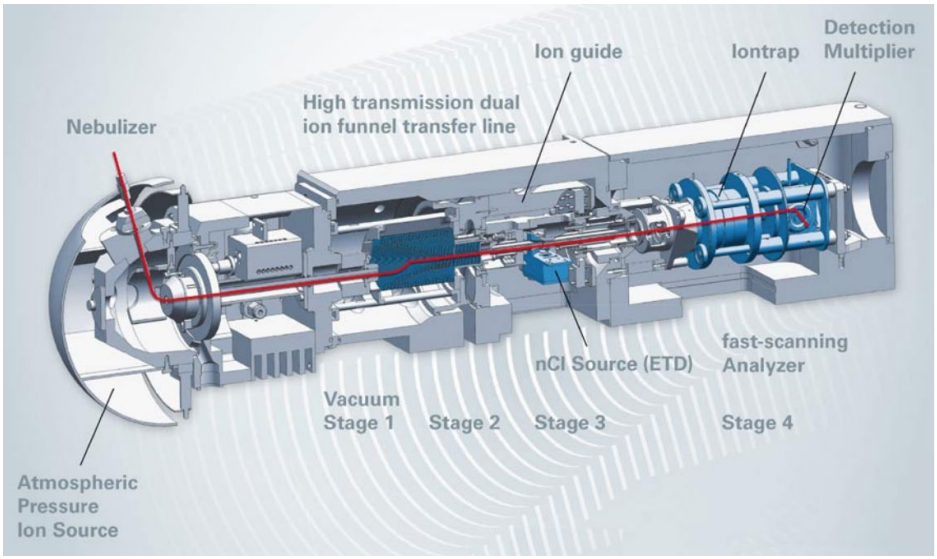


Figure 2 : Représentation de l'amaZon speed, Bruker (d'après la documentation de Bruker)

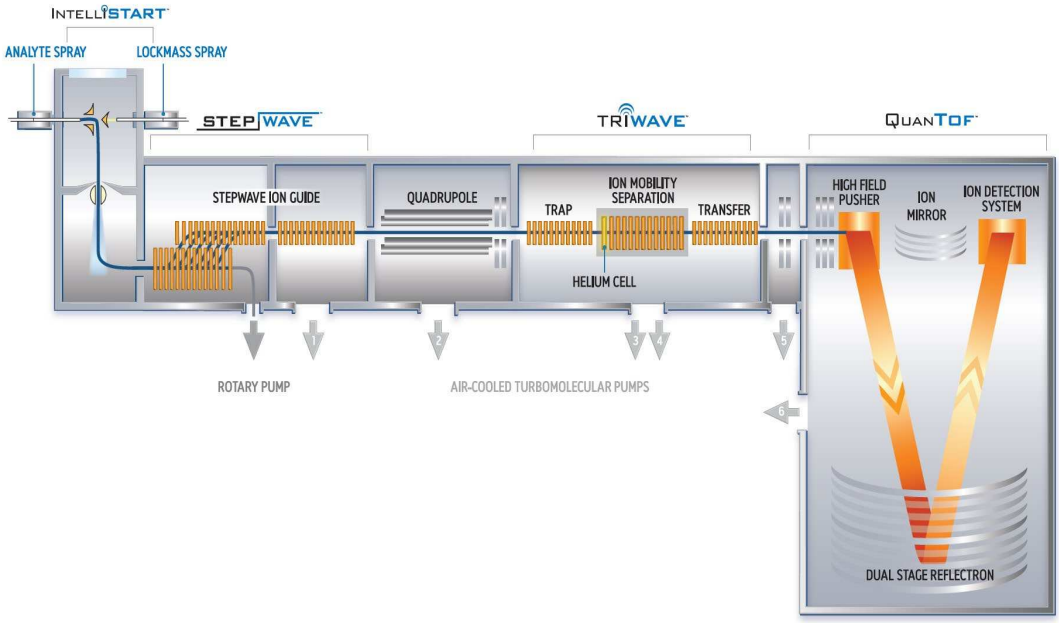


Figure 3 : Représentation du Synapt G2-S, Waters (d'après la documentation Waters)

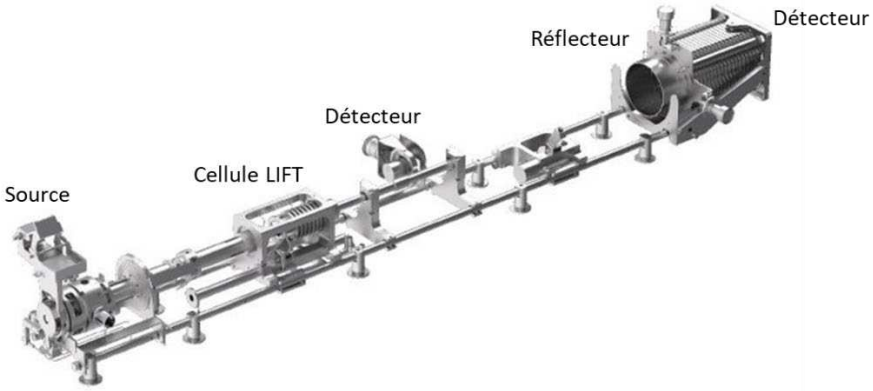


Figure 4 : Représentation du rapifleX, Bruker (d'après la documentation Bruker)

i. Source d'ionisation

La source d'ionisation a pour rôle d'ioniser les molécules qui, après passage en phase gazeuse, sont ensuite dirigées vers l'analyseur de masse. De nombreuses méthodes d'ionisation ont été développées au cours des années. Lorsqu'un spectromètre de masse est couplé à une chromatographie gazeuse, les molécules qui sont déjà en phase gazeuse sont couramment ionisées par les techniques d'ionisation électronique (EI) ou chimique (CI), pour lesquelles les ions sont formés sous vide. Si une chromatographie liquide se trouve en amont du spectromètre de masse, les processus d'ionisation doivent se dérouler dans des conditions atmosphériques ou quasi-atmosphériques. On y retrouve l'ionisation par électronébulisation (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ou encore la photoionisation à pression atmosphérique (APPI). D'autres méthodes peuvent être également utilisées sans être associées en amont à un système chromatographique, telles que le plasma à couplage inductif (ICP), l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI),

l'ionisation par désorption electrospray (DESI), l'ionisation par évaporation rapide (REI) ou encore la désorption thermique (TD) [5].

Les sources d'ionisation peuvent être classées en deux catégories : ionisation dure et ionisation douce. La première génère des ions possédant des contenus énergétiques élevés entraînant des fragmentions promptes tandis que la deuxième préserve les ions moléculaires intacts. Pour atteindre cet objectif, la quantité d'énergie transférée lors de cette étape d'ionisation est réduite au minimum, favorisant ainsi l'association des molécules avec un agent ionisant [6]. Dans de telles conditions, la production d'ions fragments nécessite une étape supplémentaire d'apport d'énergie qui peut être induite selon diverses méthodes d'activation en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Etant donné que les biomolécules ciblées dans ces travaux de thèse sont des peptides, les techniques d'ionisation douces ESI et MALDI ont été utilisées et sont détaillées ci-après dans le contexte des travaux de recherche entrepris.

ESI

La technique d'ionisation ESI permet de transférer des molécules de solutions aqueuses en phase gazeuse. En effet, les analytes sont dilués dans des solvants électriquement conducteurs pourvoyeurs de protons (solvants protiques) comme les mélanges eau/acétonitrile ou eau/méthanol, qui sont également utilisés en chromatographie liquide en phase inverse [7]. Les analytes ainsi solubilisés sont admis dans un capillaire de faible section en acier inoxydable soumis à une haute tension (positive ou négative) [5,6]. Un gaz de nébulisation (généralement de l'azote) est introduit co-axialement pour aider à la formation de ce nébulisat (spray), en particulier dans le cas de débits élevés [8]. En raison de la tension de surface et de la répulsion des charges, des cônes de Taylor se forment donnant lieu à un flux stable de gouttelettes. Sous l'action d'un gaz de désolvatation, qui est souvent un second flux d'azote chauffé, les gouttelettes diminuent en taille formant des microgouttelettes (voir Figure 5) [5,7], augmentant ainsi la concentration de charge jusqu'à atteindre la limite de Rayleigh [9] et déclenchant le processus de fission coulombienne [5]. Selon les modèles de Dole [10] et d'Iribarne et Thomson [11], les ions sont produits en phase gazeuse par désolvatation totale des microgouttelettes ou éjectés/désorbés lors de cette phase d'évaporation [6]. Les ions sont ensuite dirigés vers l'analyseur de masse.

Trois instruments équipés d'une telle source associée à des configurations différentes d'analyseurs de masse ont été sélectionnés (ESI-IT, ESI-IM-QTof et ESI-FT-ICR) afin de couvrir des possibilités d'activation vibrationnelle et électronique en MS/MS tout en proposant des performances de mesure très différentes (basse, haute et ultra-haute résolution).

Les échantillons d'intérêt étant des peptides à caractériser, la solubilisation des échantillons a été effectuée dans des solutions aqueuses contenant un pourcentage d'acétonitrile de 50 % (v/v). L'eau, qui est un bon donneur-accepteur de proton, va permettre des réactions acido-basiques au sein des gouttelettes. Au vu de la présence de nombreux sites basiques sur les séquences peptidiques, le mode positif est le plus approprié. Les ions sont formés par protonation ou par fixation d'un autre agent d'ionisation comme des métaux alcalins tels que Na^+ ou K^+ par exemple, on parle alors dans ce cas d'ion adduit. Il est possible qu'un ion (de masse notée m) porte plusieurs charges en fonction de différents facteurs comme le nombre de sites sur lesquels les charges peuvent être localisées [8], de la taille et de la structure en phase gazeuse de la molécule ionisée. Cela devient avantageux dans le cadre d'analyses de peptides qui sont des biomolécules relativement polaires de poids moléculaires faibles

à élevés (MW 200-5000 g.mol^{-1}). Ainsi, un nombre élevé de charge noté z réduit la valeur de m/z dont la mesure devient accessible aux analyseurs de masse et détecteurs conventionnels [5].

En mode négatif, les molécules sont déprotonées ou elles fixent des anions tels que les formiate, acétate, halogénures (Cl^-, Br^-, ...). De ce fait, les molécules contenant des fonctions acides qui forment très facilement l'espèce déprotonée $[M-H]^-$ sont souvent analysées dans ce mode. Ce mode est plus rarement utilisé pour l'analyse de peptides bien que des résultats très intéressants soient obtenus [12–15].

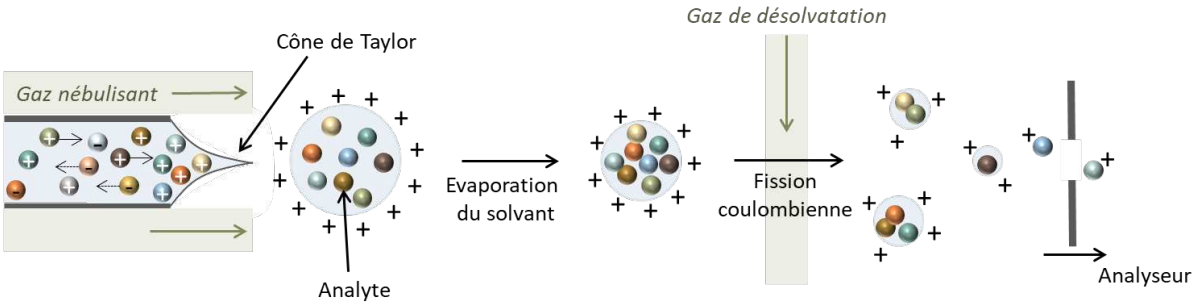


Figure 5 : Technique d'ionisation par électronébulisation (ESI)

MALDI

Dans le cadre d'analyse de peptides par spectrométrie de masse, l'ionisation ESI et MALDI sont les techniques les plus couramment utilisées, la solubilisation des peptides en conditions aqueuses permettant de créer les ions par réactions acido-basiques. Il a été démontré que le choix de la méthode d'ionisation peut avoir un impact sur la détection de peptides, soulignant ainsi la complémentarité des deux techniques [16]. L'ionisation MALDI a donc aussi été utilisée en complément de l'ionisation ESI pour des expériences de spectrométrie de masse en tandem. Le principe est présenté ci-dessous.

La première étape d'une analyse MALDI consiste à co-cristalliser un composé organique appelé matrice avec l'échantillon à analyser. Une matrice est une solution de petites molécules organiques, souvent aromatiques, à très forte concentration qui absorbent à la longueur d'onde du laser et qui aident à la désorption/ionisation de l'analyte. Il existe de nombreuses matrices référencées dans la bibliographie, mais le choix final de celle-ci dépend du type d'échantillon à analyser. Suite à la co-cristallisation de la matrice et de l'analyte sur une plaque métallique conductrice, celle-ci est placée dans la source sous vide poussé du spectromètre de masse. Des impulsions laser sur le dépôt conduisent à l'ionisation et à la désorption des molécules de l'échantillon (voir Figure 6) [6,17].

Généralement, les appareils sont équipés avec des lasers UV constitués de photons de longueurs d'onde à 337 nm (laser à azote) ou 355 nm (lasers solides YaG). Il est également possible de trouver des instruments équipés de lasers infrarouges, qui sont particulièrement utilisés pour des analyses biologiques grâce à leur mode d'ionisation plus doux dû à des photons de plus faibles énergies. Il faut qu'un certain seuil d'énergie soit atteint pour qu'une désorption des molécules ionisées et neutres soit possible. Ce seuil d'énergie est propre à chaque matrice, mais dépend également du rapport molaire matrice/analyte [17], la matrice étant en fort excès.

Plusieurs modèles décrivant le processus d'ionisation en MALDI existent aujourd'hui, dont l'un est le modèle des clusters, ou encore appelé « lucky survivor model » [18]. Ce modèle part du principe que les biomolécules mélangées à la matrice conservent leur charge obtenue en solution aqueuse. Dans le cas d'une matrice acide, les molécules du dépôt ont un excès de charge qui doit être maintenu. Cela implique une cristallisation rapide afin que les molécules du solvant, qui peuvent porter des molécules d'analyte sous forme solvatées, soient intégrées dans les cristaux. Cette hypothèse implique donc que le séchage des dépôts soit suffisamment rapide pour que la cristallisation soit appropriée. Lors de la deuxième étape, le modèle propose une rupture du mélange matrice/analyte suite à l'impulsion laser sous forme de cluster (voir Figure 6). Lors de son expansion, il est supposé que les clusters perdent des molécules neutres de matrice et de solvant après neutralisation par transfert de protons avec les sites de protonation de l'analyte. Ainsi, les charges du peptide sont neutralisées, à l'exception d'une seule charge excédentaire. Ce modèle permet d'expliquer l'observation d'ions monochargés sur les spectres de masse issus de cette méthode d'ionisation [19]. D'autres modèles ont été proposés pour expliquer le phénomène de désorption ionisation comme celui de Garrison et al. [20] ou encore par Knochenmuss et Zenobi pour expliquer des mécanismes secondaires [18].

En l'occurrence, la préparation des échantillons ainsi que la méthode de dépôt sont des étapes cruciales pour l'analyse MALDI. La préparation d'échantillon doit être optimisée en fonction de la nature des molécules à détecter, de la sensibilité attendue et également en fonction de l'information recherchée (simple mesure de masse ou fragmentation). Concernant le dépôt, il existe plusieurs méthodes (goutte sèche, couche mince, sandwich) qui peuvent influencer les processus de désorption/ionisation. Préparer un échantillon revient à choisir la matrice adaptée à la nature du composé que l'on souhaite analyser et à optimiser le mode dépôt.

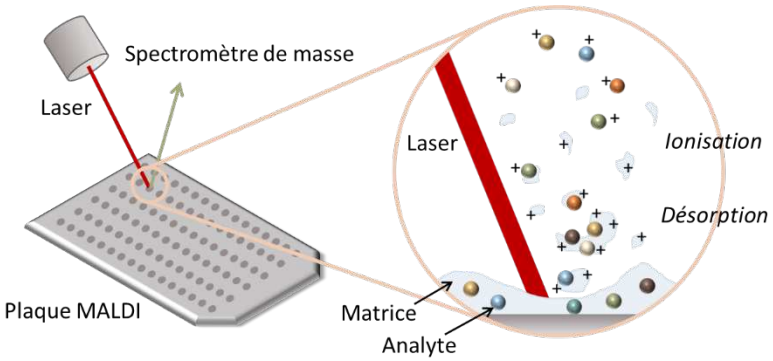


Figure 6 : Technique d'ionisation MALDI

ii. Activation

Suite à une ionisation MALDI, il est possible de générer des ions possédant des énergies internes assez élevées selon les conditions opératoires appliquées (nature de la matrice, fluence du laser, …). Ces ions moléculaires peuvent alors se fragmenter spontanément hors de la source avant d'atteindre le détecteur. On parle alors d'ions métastables étant donné que leurs durées de vie ne sont pas suffisantes pour qu'ils soient stables tout au long de l'analyse. Les dissociations métastables sont subies, non contrôlées, pouvant avoir lieu dans l'analyseur de masse, ce qui donne des ions fragments présentant des signaux très diffus, de faibles abondances. Comme il s'agit d'un mécanisme de dissociation en aval de la source, ces décompositions métastables sont aussi appelées Post-Source

Dissociation (PSD) [21]. Afin de capitaliser sur ces ions fragments ainsi produits pour caractériser les molécules analysées en MALDI, une méthode d'activation en source par augmentation de la fluence laser, nommée LID pour Laser-Induced Dissociation, combinée à des modifications instrumentales de type Tof/Tof ont été proposées par les deux fournisseurs AB Sciex et Bruker afin de contrôler la dissociation des ions moléculaires métastables en aval de la source d'ionisation mais en amont de l'analyseur de masse. Seul l'instrument de la société Bruker a été utilisé et son fonctionnement sera détaillé ci-après.

Concernant les ions générés avec la source ambiante ESI, diverses expériences MS/MS (spectrométrie de masse en tandem) ont été développées pour induire et contrôler la fragmentation de ces molécules d'intérêts. Elles impliquent une étape d'activation qui se déroule après la sélection d'un ion moléculaire de masse donnée (appelé ion précurseur), et qui permet de dissocier cet ion afin d'obtenir des ions fragments caractéristiques.

Selon l'analyseur employé, les expériences MS/MS se déroulent dans le temps ou dans l'espace. On parle d'expérience dans l'espace lorsque l'activation induisant la fragmentation et l'analyse des ions produits se déroulent dans des zones distinctes. Pour les expériences menées dans le temps, il s'agit d'un même analyseur où s'effectuent les différentes étapes : un temps est dédié à la sélection de l'ion précurseur, un second temps est consacré à l'activation et fragmentation de cet ion, tandis qu'un dernier temps est alloué à la détection des ions fragments (voir Figure 7).

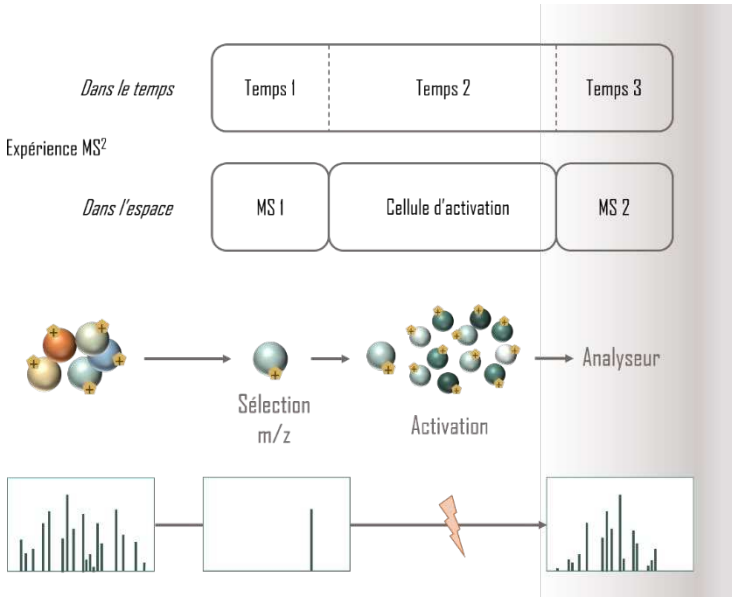


Figure 7 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem

De plus, des méthodes d'activation ont été proposées au fur et à mesure des développements instrumentaux. Elles peuvent être classées en deux catégories : activations vibrationnelles et activations électroniques. Ainsi, plusieurs types d'activations complémentaires ont été développés soit par activation vibrationnelle pour rehausser les énergies des ions sélectionnés par collision avec un gaz inerte (CID, HCD), soit par absorption de photons (IRMPD, UVPD, BIRD), soit par activation électronique (ECD, ETD) produisant des ions radicalaires.

Seules les méthodes d'activation CID et ETD disponibles sur les instruments équipés d'une source à pression atmosphérique utilisés dans le cadre de cette thèse (ESI-IT et ESI-IM-QTof) ainsi que

les décompositions métastables sous activation LID en MALDI-Tof/Tof seront présentées dans cette partie.

CID

La première décomposition d'ions par collision en phase gazeuse fut observée par Thomson en 1913, mais ce n'est que quelques années plus tard que ce résultat a pu être expliqué [22–24]. Afin d'éviter ces phénomènes de collision, une faible pression était maintenue dans les spectromètres de masse. Ce n'est qu'à partir de 1978 que McLafferty [25] et al. et Cooks [26] ont démontré l'utilité de ce phénomène dans la détermination de la structure des ions [27].

Pour augmenter la diversité des ions métastables produits ainsi que leur intensité, et surtout contrôler les évènements de dissociation qui doivent subvenir hors de l'analyseur de masse, la collision avec un gaz inerte (N_2, Ar, Xe) peut être mise en œuvre. Les acronymes CAD ou CID, respectivement Collision Activated Dissociation ou Collision Induced Dissociation, ont été proposés par F. McLafferty et G. Cooks pour décrire ce processus. Celui-ci consiste à sélectionner un ion d'un m/z donné, de l'accélérer au travers le gaz de collision dans un analyseur de masse quadripôlaire utilisé en bande passante [28].

L'activation par CID est décrite comme un processus en deux étapes qui sont séparées dans le temps [24,29], la première correspondant à l'excitation de l'ion par collision (Eq. 1) (étape la plus rapide) et la seconde à la dissociation de ce dernier par perte de neutre (Eq. 2).

Eq. (1) $i_m^+ \rightarrow [i_m^+]^*$

Eq. (2) $[i_m^+]^* \rightarrow i_f^+ + N$

Dans ces équations, i_m^+ renseigne l'ion moléculaire à nombre pair d'électron, i_f^+ l'ion fragment et N le neutre perdu. La deuxième partie du mécanisme correspond à une dissociation unimoléculaire qui est expliquée par la théorie du quasi-équilibre (QET). Celle-ci stipule que les produits de fragmentation dépendent uniquement de l'énergie interne de l'ion et non de la méthode par laquelle l'ion acquiert cette énergie [30]. Si l'on considère qu'un ion possède N atomes non linéaires, il possède 3N-6 modes de vibration. L'énergie interne va se répartir sur tous ses modes vibrationnels accessibles. Si l'ion possède beaucoup d'atomes et peu d'énergie excédentaire, l'énergie se répartit, la molécule vibre mais aucune fragmentation n'aura lieu. Au contraire, si l'ion possède peu d'atomes et beaucoup d'énergie excédentaire, la molécule va se dissocier, en utilisant les voies de fragmentation amenant au clivage des liaisons les plus fragiles. On comprend ainsi que le rendement de dissociation varie de manière inversement proportionnelle à la masse de l'ion. L'activation CID est donc une méthode d'activation ergodique, la vitesse de dissociation étant plus lente que celle d'activation [29].

Les expériences de CID peuvent être séparées en deux catégories en fonction de l'énergie de collision appliquée :

- CID haute énergie, avec une énergie de l'ordre du keV
- CID basse énergie, avec une énergie de 1 à 100 eV

Cette énergie de collision doit être optimisée selon les peptides analysés et l'état de charge de l'ion précurseur afin d'obtenir le meilleur recouvrement de séquence. En général, la CID haute énergie

donne des voies de fragmentation plus simples et plus nettes, tandis que la CID basse énergie conduit à des voies de fragmentations plus diverses, avec souvent plus de réarrangements [31–33].

Les spectres CID haute énergie sont enregistrés avec des analyseurs en capacité d'accommoder des ions haute énergie tels que les secteurs électromagnétiques et les analyseurs à temps de vol (Tof). Avec ce processus haute énergie, une seule collision suffit pour fragmenter l'ion excité suivant des voies de fragmentation nécessitant de hautes énergies d'activation. Les fragmentations sont soit dirigées, soit éloignées de la charge (CRF). Il est également possible d'observer des fragmentations consécutives.

Les spectres CID basse énergie n'apportant pas de contrainte spécifique sont quant à eux enregistrés sur une plus grande diversité d'analyseurs : quadripôles, pièges à ions, Tof, FT-ICR et associations hybrides. Cependant, plusieurs collisions sont nécessaires pour fragmenter les ions (régime multicollisionnel), et les fragmentations sont essentiellement dirigées par la charge. Il est également possible d'observer des réarrangements ou des réactions ion/molécule avec le neutre libéré entre autres. Même si l'énergie déposée est inférieure à celle de la CID haute énergie, les rendements en ions produits sont très importants notamment dû au régime multicollisionnel qui est favorisé par une densité élevée du gaz de collision ainsi que par la longueur de la cellule de collision (Q) ou le temps alloué à la CID dans un piège à ions [29,34].

ETD

D'autres méthodes d'activation à base d'échange d'électrons peuvent également être utilisées pour obtenir des informations complémentaires aux autres techniques d'activation vibrationnelles. Entre autres, l'ECD (Electron Capture Dissociation) et l'ETD (Electron Transfer Dissociation) sont les plus usitées. Les premières expériences d'ECD ont été menées par Zubarev, Kelleher et McLafferty en 1998 [35]. Cette technique d'ionisation consiste à irradier des ions multichargés avec des électrons de faible énergie (<1 eV). Les électrons réagissent avec les ions précurseurs pour ainsi créer une espèce radicalaire possédant une charge en moins que l'ion d'origine. Cet intermédiaire radicalaire se dissociera par la suite pour générer des ions fragments à nombre pair et impair d'électrons. A son commencement, l'ECD était couplé à un analyseur FT-ICR avec une cellule ionique équipée d'électrodes de piégeage des électrons et des cations précurseurs [28]. Cependant, ces analyseurs sont coûteux, nécessitent du personnel qualifié et une infrastructure appropriée. Comme il est difficile de transposer cette technologie à d'autres analyseurs de masse, une autre technologie a donc été proposée pour remédier à cela : l'ETD.

Coon et son équipe [36,37] ont ainsi développé l'ETD quelques années plus tard, une méthode d'activation similaire à l'ECD, se basant également sur le transfert d'électron vers des cations multichargés. Cette fois-ci, un porteur d'électrons anionique est utilisé pour déclencher la capture d'électron par les cations à charge multiple (voir Figure 8) [28,38,39].

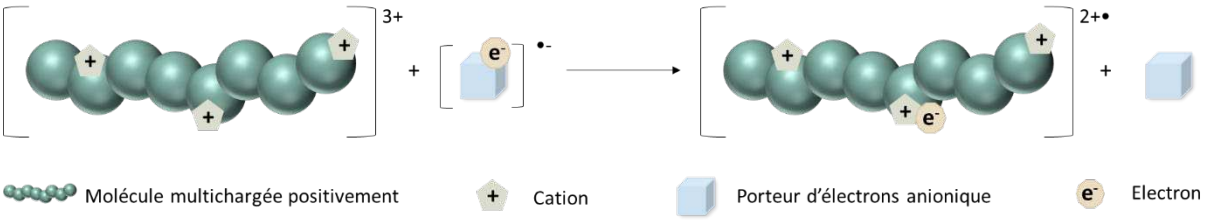


Figure 8 : Principe de la dissociation suite à une activation ETD

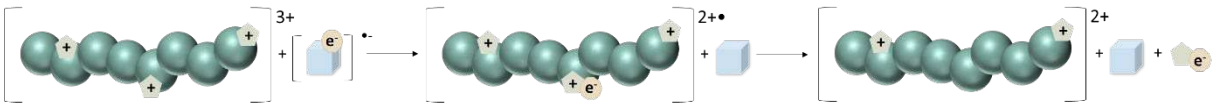
Ainsi, comme pour le CID, l'ETD peut être utilisé avec différents analyseurs comme des pièges à ions ou encore des Q-Tof [36,38]. La principale difficulté pour l'application de la méthode d'activation ETD était de trouver un anion qui transfèrerait un électron avec une molécule multiprotonée plutôt que d'accepter un proton de cette même molécule [28]. Dans cette compétition entre réactivité radicalaire et réaction acido-basique, les premières expériences d'ETD ont été réalisées en utilisant des anions d'anthracène radicaux comme entité générant le transfert d'électrons, obtenus par ionisation chimique [28,38]. Les molécules sont vaporisées dans la source d'ionisation avec des électrons. Toute molécule qui réagit de manière exothermique pour former un anion radicalaire stable (ou transitoirement stable) possède une affinité électronique positive, et peut donc potentiellement être utilisée pour réagir avec les molécules multichargées [38] (voir Eq. 3)

Eq. (3) $C_{14}H_{10} + e^-_{thermique} \rightarrow C_{14}H_{10}^{\bullet -}$ *(anion radical d'anthracène)*

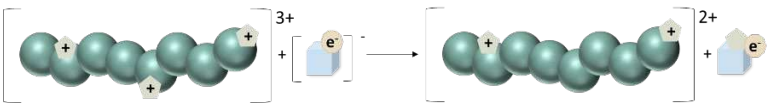
Des molécules alternatives comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques [38] ont été testées comme réactif pour l'ETD. Parmi les anions testés ayant une capacité à transférer un électron à des molécules multichargées, on retrouve le naphtalène, le fluorène, le fluoranthène ou encore le dibenzothiophène. L'introduction d'hétéroatomes dans les cycles ne semble pas affecter leur capacité de transfert d'électron. On peut cependant noter que des anions non radicaux peuvent également être donneurs d'électrons [36].

Une fois que la molécule multichargée ($[M+nH]^{n+}$ avec $n \geq 2$) capte un électron d'un anion à nombre d'électron impair ($A^{\bullet -}$) ou pair (A^-), plusieurs réactions peuvent se produire : soit un transfert d'électron se réalise entre les deux entités (équations ***a*** et ***c***), soit un transfert de cation se réalise (équations ***b*** et ***d***). Les réactions amenant à un transfert d'électron (équations ***a*** et ***c***) produisent des cations radicalaires qui sont à l'initiation de plusieurs mécanismes de fragmentation. Le transfert de cation (équations ***b*** et ***d***) quant à lui diminue la charge de l'espèce multichargée mais ne permet pas de la fragmenter.

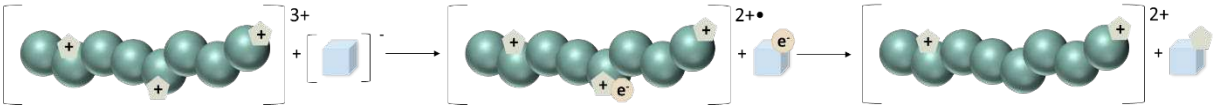
*Eq. **a** :* $[M+nH]^{n+} + A^{\bullet -} \rightarrow [M+nH]^{\bullet (n-1)+} + A \rightarrow [M+(n-1)H]^{(n-1)+} + A + H^{\bullet}$



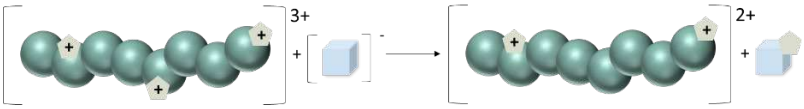
*Eq. **b** :* $[M+nH]^{n+} + A^{\bullet -} \rightarrow [M+(n-1)H]^{(n-1)+} + AH^{\bullet}$



*Eq. **c** :* $[M+nH]^{n+} + A^- \rightarrow [M+nH]^{\bullet(n-1)+} + A^\bullet \rightarrow [M+(n-1)H]^{(n-1)+} + AH$

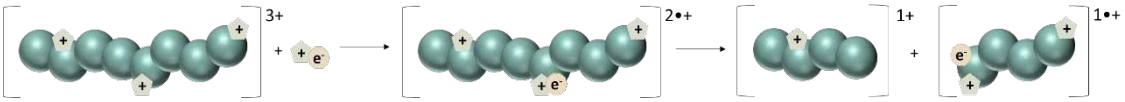


*Eq. **d** :* $[M+nH]^{n+} + A^- \rightarrow [M+(n-1)H]^{(n-1)+} + AH$



Une dernière possibilité est la fragmentation de l'espèce cationique multichargée qui a récupéré un électron de l'espèce anionique selon l'équation ***e*** :

*Eq. **e** :* $[M+(n-1)H]^{\bullet(n-1)+} \rightarrow [X+(m+1)H]^{(m)+} + [Z+(n-1-m)H]^{\bullet(n-1-m)+}$



Les expériences d'ETD réalisées ont été effectuées sur le Synapt G2-S de Waters (voir Figure 9). Quelques milligrammes de poudre de réactif utilisé pour l'ETD (le 1,4-dicyanobenzene) sont placés dans le flacon de réactif. Un flux d'azote circule à travers ce flacon, contrôlant ainsi la pression et le flux de réactif jusqu'à la source. La vapeur est amenée jusqu'à une aiguille creuse située entre le cône d'échantillonnage et le cône d'extraction, sur laquelle est appliquée une tension de 300V. Les anions radicaux y sont générés au moyen d'une décharge corona (glow discharge), entre l'aiguille et le bloc ionique. Le réactif capture un électron provenant de l'ionisation provoquée par la décharge corona et forme un anion radicalaire chargé négativement. Afin de stocker ces anions radicalaires dans la cellule Trap située dans le TriWave du Synapt G2-S, la polarité de la source et de l'optique ionique jusqu'à l'entrée de cette cellule Trap est inversée en permanence. Ainsi, les cations et les anions sélectionnés selon leur m/z arrivent alternativement dans la cellule suivant un cycle opératoire (voir Figure 10). Les anions radicalaires sont tout d'abord stabilisés dans le quadripôle au moyen de radiofréquences radiales et de potentiels de barrière à l'entrée ainsi qu'à la sortie de la cellule Trap. Les cations sont ensuite propulsés axialement vers les anions (voir Figure 10). Le degré ainsi que le temps d'interaction entre les ions sont déterminés principalement par la hauteur et la vitesse de l'onde progressive (voir Figure 9). La pression du gaz dans le piège joue également un rôle dans le contrôle de la réaction ETD [40].

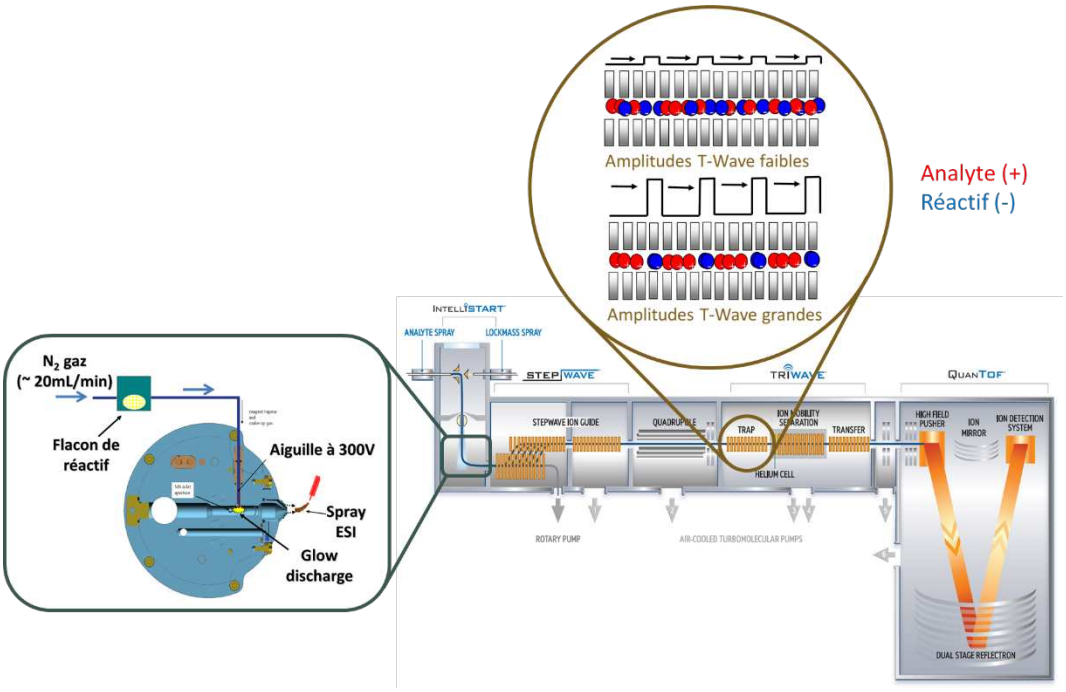


Figure 9 : Utilisation de l'activation ETD sur le Synapt G2-S (Waters)

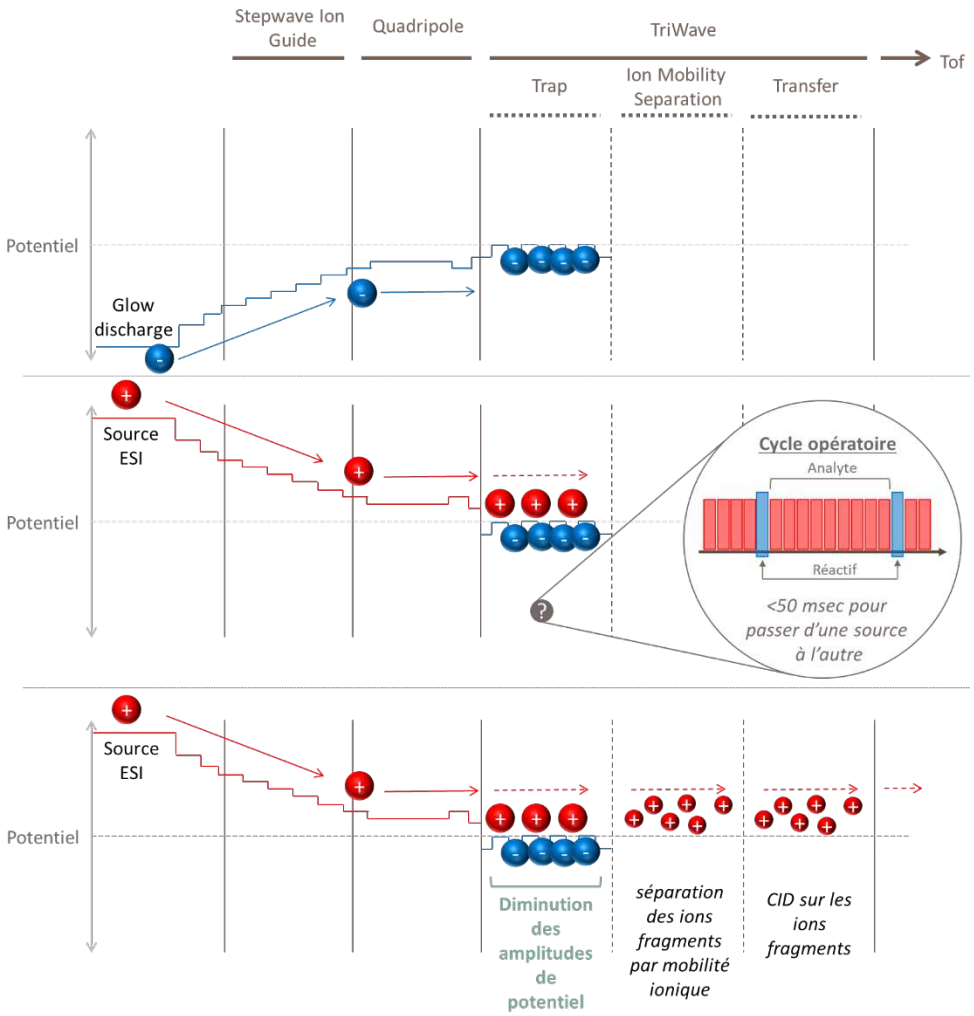


Figure 10 : Principe de l'activation ETD sur le Synapt G2-S (Waters)

Une fois les cations multichargés ayant réagi avec les anions radicalaires en diminuant les valeurs de potentiel de la Trap du TriWave, les fragments sont amenés vers l'analyseur en passant par une cellule de mobilité ionique ainsi qu'un autre quadripôle, permettant ainsi d'ajouter des expériences IM-MS ou de CID supplémentaires si besoin.

iii. Analyseur

Une fois les ions formés en source, et potentiellement activés pour être fragmentés, ils sont séparés selon leur m/z dans un analyseur. Il existe plusieurs types d'analyseurs de masse avec des modes de fonctionnement et des performances différents. On peut retrouver des quadripôles, des pièges à ions basse résolution, des temps de vol ou encore des analyseurs à ultra-haute résolution comme l'ICR et l'Orbitrap™ dont le signal est traité par Transformée de Fourier. Seuls ceux utilisés dans ce travail de thèse seront décrit ci-dessous.

IT

Le piège à ions est un analyseur qui remplit plusieurs fonctions : accumuler, isoler (en 2D ou 3D), exciter et éjecter des ions produits en source en amont [29]. Seul un piège à ions 3D (dit piège à ions quadripôlaire ou piège de Paul) a été utilisé pour répondre à différents questionnements analytiques survenus pendant les travaux de thèse. Son fonctionnement sera donc présenté plus en détail dans la suite.

Le piège à ions quadripôlaire est composé d'une électrode annulaire entre deux électrodes terminales hyperboliques [5,6,8] formant une enceinte ; il est possible de stocker des ions et d'introduire un gaz résiduel. Les électrodes terminales possèdent en leur centre un orifice par lequel les ions peuvent entrer ou sortir du piège (voir Figure 11). Une fois que les ions ont passé l'électrode d'entrée, ils sont piégés à l'intérieur de l'analyseur par des champs électriques alternatifs et continus [5], avec une pression élevée du gaz (He) afin d'aider les ions à maintenir une fréquence sinusoïdale stable et pour concentrer les ions au centre du piège où le champ électrique est le plus symétrique [6,8]. Les ions piégés subissent des mouvements périodiques à la fois dans la direction radiale et dans la direction axiale (direction d'injection et d'éjection des ions), résultant en une trajectoire sinusoïdale complexe. Il est nécessaire de contrôler ces trajectoires pour éviter des pertes d'ions [29]. Cependant, le nombre d'ions maintenus au centre du piège est limité. A partir d'une certaine densité d'ions, les répulsions colombiennes entre les ions de même charge peuvent commencer à dépasser le potentiel de piégeage, déformer le champ électrique affectant la sensibilité et la résolution de ces analyseurs [8]. Les temps d'accumulations typiques sont compris entre 0.01 et 200 ms. En faisant varier ce temps, la gamme dynamique de l'analyseur est considérablement étendue [6,8]. La gamme de masse d'ions qui peuvent être piégés simultanément est décrite par un diagramme de stabilité (diagramme de Mathieu) [41,42]. Pour générer les spectres MS, les ions sont éjectés en dehors du piège en modifiant les amplitudes des radiofréquences de l'électrode annulaire (qui augmente le rayon des trajectoires des ions) et des électrodes terminales [5,8]. La combinaison des tensions de radiofréquences pour rendre un ion instable est spécifique à un m/z : on appelle cette technique l'éjection par résonance [8]. Le spectre de masse est obtenu par balayage des tensions de radiofréquences.

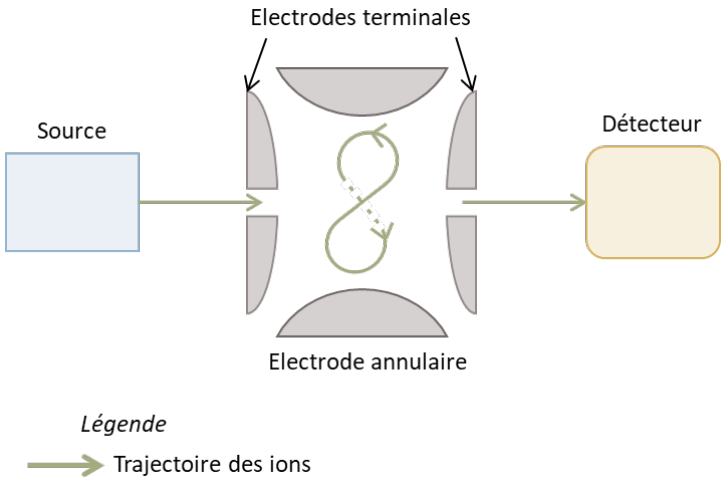


Figure 11 : Représentation d'un piège à ions quadripôlaire

A partir de ce principe, il est possible de sélectionner des ions avec un m/z voulu en générant un spectre de toutes les fréquences de résonance sauf celle correspondant à celle de l'ion précurseur sélectionné. Pour fragmenter les ions isolés et réaliser des expériences de masse en tandem dans le temps, leur énergie interne est augmentée par excitation de résonance. L'amplitude d'excitation appliquée est inférieure à celle utilisée pour éjecter les ions du piège. Une fois excités, les ions entrent en collision avec le gaz de fond (He), qui est initialement utilisé pour aider à maintenir les ions au centre du piège [8], ce qui entraine leur fragmentation. Suite aux dissociations, les ions fragments produits sont soumis à un potentiel de piégeage déterminé par les radiofréquences appliquées pendant la fragmentation. Si celles-ci sont trop élevées, les ions de faibles masses sont directement éjectés du piège. Au contraire, si elles ne sont pas assez élevées, aucune fragmentation ultérieure ne pourra être engagée. En général, les ions de faible masse éjectés correspondent à un peu moins de 1/3 de la valeur m/z de l'ion précurseur (phénomène décrit par l'appellation 'low mass cut-off'). Contrairement à d'autres instruments, seuls les ions précurseurs seront fragmentés suite aux collisions avec le gaz de fond. En effet, les ions fragments ne possèdent pas assez d'énergie interne pour entrainer des fragmentations ultérieures : les spectres MS/MS issus de pièges à ions sont issus d'une seule étape d'activation. Il est également possible de procéder à des étapes supplémentaires d'isolation et de fragmentation pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse itérative MS^n [6].

Pour optimiser des expériences $MS^{(n)}$ sur un piège à ions quadripôlaire, il est possible de modifier les variables suivantes (voir Figure 2) :

- La largeur de la fenêtre d'isolation (Width)
- L'amplitude de fragmentation
- Le temps d'accumulation des ions dans le piège (Delay Time)
- Le temps de fragmentation des ions (Fragmentation Time)

Tof

L'analyseur à temps de vol (Time of Flight) repose sur la mesure du temps que mettent les ions pour parcourir la distance entre la source et le détecteur. Connaissant la distance ainsi que le temps de parcours, il est possible de déduire les vitesses des ions à partir desquelles on peut déduire leurs masses. Suite à leur ionisation dans la source, les molécules chargées sont accélérées par un champ

électrique. La vitesse acquise par ces ions est fonction de leur rapport m/z : les ions avec un petit m/z auront une énergie cinétique plus élevée que les ions avec un grand m/z et atteindront ainsi le détecteur plus rapidement [43]. Le rapport m/z peut être obtenu à partir de la mesure du temps. Un ion d'une masse *m* et de charge *q=ze* est accéléré par un potentiel V_s avant de quitter la source. L'énergie potentielle de l'ion est convertie en énergie cinétique et la vélocité de l'ion quittant la source peut ainsi être calculée. Après cette accélération, l'ion traverse un environnement sans champ en ligne droite avec une vélocité constante jusqu'au détecteur. A partir de ces données, l'équation (4) suivante peut être établie [29] :

Eq. (4) : $t^2 = \frac{m}{z}\left(\frac{s^2}{2eVs}\right)$

avec *t* le temps nécessaire à l'ion pour traverser le tube de vol d'une longueur *s*. Les paramètres entre parenthèse étant constants, il est possible de calculer le rapport m/z à partir du temps de vol *t*.

Plusieurs facteurs peuvent créer une distribution des temps de vol au sein des ions ayant le même m/z, ce qui affecte la résolution de l'analyseur [29,43,44]. Parmi ces facteurs, on retrouve la distribution spatiale (taille du volume où les ions sont formés), la distribution temporelle (impulsion de formation des ions) ainsi que la distribution de l'énergie cinétique (variation de l'énergie cinétique initiale) [29]. Afin de réduire ces phénomènes de dispersion, plusieurs méthodes ont été développées. La première est un mode de fonctionnement à extraction pulsée qui consiste à introduire un délai entre la formation des ions et leur extraction. La deuxième est l'introduction d'un miroir électrostatique appelé réflecteur (reflectron en anglais), qui corrige la dispersion de l'énergie cinétique des ions qui quittent la source avec le même m/z : les ions les plus rapides passeront plus de temps dans le réflecteur que les ions plus lents et arriveront donc tous au même moment sur le détecteur, améliorant ainsi considérablement la résolution de l'analyseur [29,45]. Pour augmenter la résolution, il est aussi possible d'allonger la distance de trajet des ions avant qu'ils arrivent au détecteur [44]. Plusieurs géométries ont donc été proposées : la géométrie en V (les ions ne passent qu'une seule fois dans le réflecteur) ou une géométrie en W (après un premier passage dans le réflecteur, les ions sont renvoyés par un deuxième miroir électrostatique avant d'arriver au détecteur) [6] comme représenté sur la Figure 12.

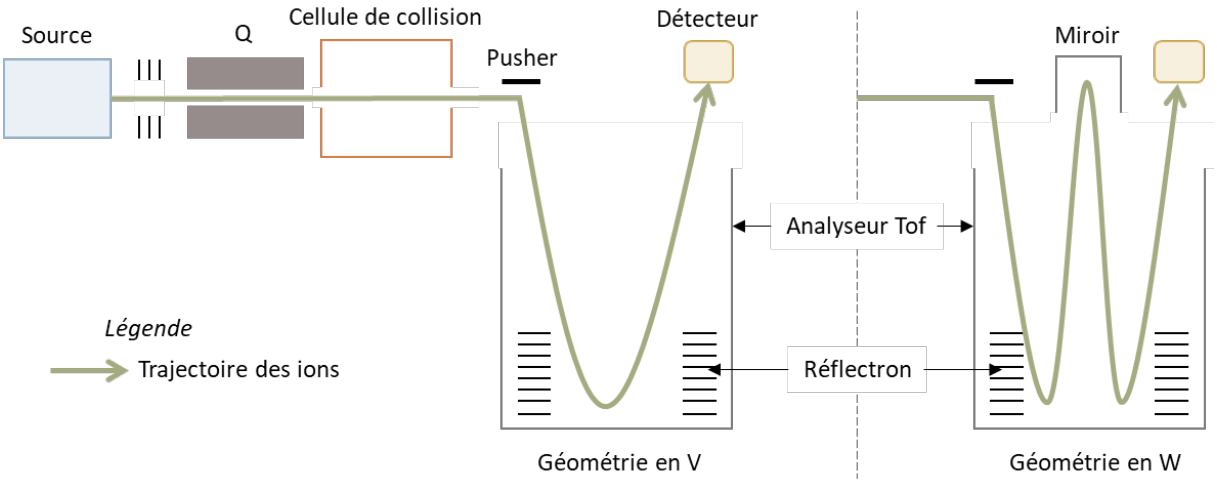


Figure 12 : Représentation d'un l'analyseur QTof avec une géométrie en V ou W

Des expériences de spectrométrie de masse en tandem peuvent être réalisées avec ce type d'analyseur. Il est possible d'effectuer des analyses MS/MS en couplant un Tof à un quadripôle en amont (voir Figure 12). Ce dernier peut être utilisé en bande passante pour réaliser des expériences MS simples, ou bien en mode filtre pour sélectionner un ion en amont de la cellule de collision pour enregistrer des expériences MS/MS [6,29]. Dans le cas de l'ionisation MALDI, les expériences en tandem sont réalisées avec une configuration Tof/Tof. Les ions sont générés en source en favorisant les décompositions métastables par augmentation de la fluence laser (condition de LID). Puis, sur l'appareillage MALDI-Tof/Tof à disposition (rapifleX, Bruker), les ions d'intérêt sont sélectionnés selon leur temps de vol (Ion gating) et traversent ensuite la cellule LIFT qui les accélère. Les ions fragments qui acquièrent ainsi des énergies dépendantes de leur valeur m/z sont ensuite séparés dans l'analyseur [46]. Il est également possible de réaliser du CID haute énergie en introduisant la cellule LIFT sur la trajectoire des ions en ajoutant du gaz dans cette partie du spectromètre de masse (voir Figure 13).

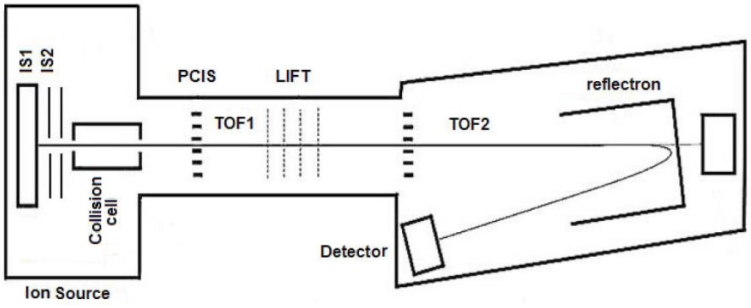


Figure 13 : Représentation du mode Tof/Tof du rapifleX (Bruker)

FT-ICR

L'analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier est composé d'un piège à ions (piège de Penning) situé dans un aimant supraconducteur qui créé un champ magnétique perpendiculaire à la trajectoire des ions à l'intérieur du piège [5,47] (voir Figure 14). Après l'étape d'ionisation, les ions produits sont piégés à l'intérieur de la cellule ICR par un champ électrique (issu des électrodes de piégeage) ainsi qu'un champ magnétique [5,6,43]. En effet, les ions de faible masse ne sont pas capables de se déplacer dans la direction perpendiculaire au champ magnétique. Un champ électrique est donc appliqué dans la direction du centre du piège afin de les y concentrer [47]. Sous l'influence d'un champ magnétique, les ions se déplacent selon une trajectoire circulaire. La fréquence de rotation dépend des m/z des ions piégés ainsi que de l'intensité du champ magnétique (de 7 à 15 Tesla pour les instruments commerciaux). Afin de détecter ces ions, leur mouvement cyclotronique est modifié en appliquant une tension radiofréquence aux électrodes d'excitation (étape d'excitation) (voir Figure 14). Une fois excités et synchronisés, les ions modifient les potentiels des électrodes de détection et génèrent une charge image [47]. Les courants ioniques induits sur les électrodes de détection sont enregistrés en fonction de la fréquence de la cellule ICR [48]. La Transformée de Fourier génère ensuite le spectre de masse des ions enregistrés à partir de ces signaux ICR.

Les expériences MS/MS peuvent être réalisées de la même façon que dans des pièges à ions hyperboliques (fragmentation dans le temps). Cependant, la fragmentation par CID est moins efficace en raison des pressions nettement plus faibles dans la cellule ICR, ce qui peut être compensé par des

temps d'acquisition plus longs [49]. D'autres méthodes d'activation vibrationnelle (UVPD) ou électronique (ECD) sont également compatibles avec l'utilisation de cet analyseur.

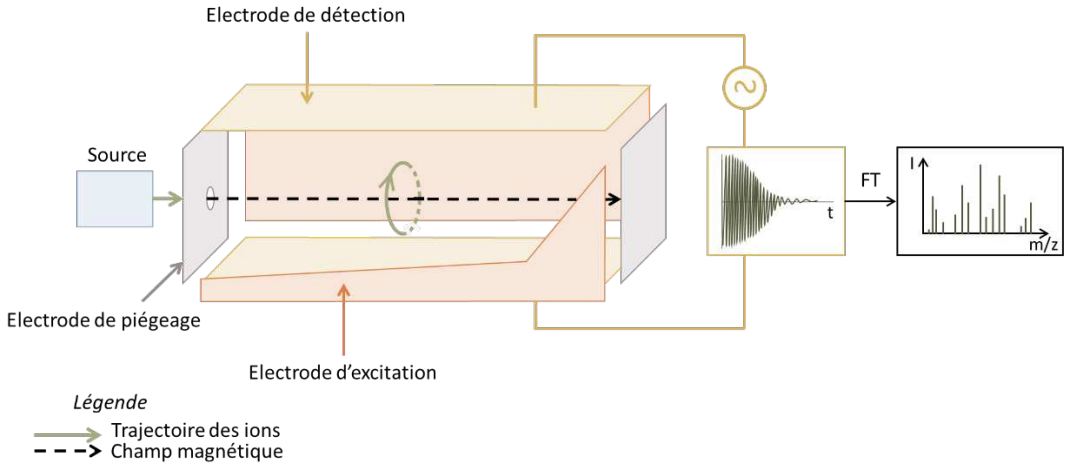


Figure 14 : Représentation d'un analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier

L'avantage de ces analyseurs est leur ultra haute résolution qui permet de détecter les masses des ions avec une grande précision (<1ppm), afin de séparer des ions isobares et de déterminer la composition isotopique des molécules analysées. Il est également possible de le coupler à plusieurs sources (ESI et MALDI à pression atmosphérique) ou encore de réaliser des expériences MS^n [6]. L'analyseur FT-ICR est souvent la meilleure solution pour certaines études qui nécessitent des précisions de mesure permettant la caractérisation des structures isotopiques fines, utiles pour l'identification et la caractérisation de peptides dans le cadre d'un séquençage *de novo*.

iv. Mobilité ionique

La mobilité ionique est une technique séparative en phase gazeuse. Elle permet de différencier les ions en fonction de leur structure et de leur état de charge dans un gaz tampon sous l'influence d'un faible champ électrique [50,51]. La mobilité ionique a donc été implémentée au sein de spectromètres de masse afin d'apporter des informations complémentaires à la mesure des m/z comme détaillé ci-dessous.

En spectrométrie de mobilité ionique à tube de dérive (DT-IMS), première méthode développée, les ions migrent à travers un gaz tampon en présence d'une tension électrique linéaire. La tension pousse les ions en direction opposée au gaz tampon. Pour éviter que les ions ne se fragmentent lors de la collision avec le gaz tampon, et ainsi conserver un régime de diffusion, le champ électrique appliqué doit rester faible (cette valeur dépend du couple ion-gaz [52]): les ions ont ainsi des énergies internes n'induisant pas des dissociations [52,53]. La vitesse de l'ion est donc directement proportionnelle au champ électrique. Le flux de gaz inverse permet de créer une résistance face au champ électrique et donc de réduire la vitesse de certains ions. L'interaction des ions avec le gaz et donc leur vitesse de progression dans le tube de dérive dépend de la section efficace de collision de l'ion (CCS, Collisional Cross Section) ainsi que de sa charge [8,51]. De fait, il est possible de séparer des ions isomères de même masse et de même charge mais de structure tridimensionnelle différente par mobilité ionique [54]. Les technologies de mobilité ionique développées sur divers spectromètres de

masse ne présentent pas toutes les mêmes finalités et performances. Seule la technologie appelé TWIMS présente dans le spectromètre de masse utilisé pour ces expériences (Synapt G2-S, voir Figure 3) est détaillée.

Contrairement au DT-IMS dans lequel un faible champ électrique est maintenu en continu, un champ élevé est appliqué à un segment de la cellule et est balayé à travers celle-ci dans le sens de migration des ions [53,55]. De ce fait, les ions sont déplacés et séparés à travers la cellule de mobilité par impulsions, selon les vagues du champ électrique appliquées. Dans ce modèle-là, le flux de gaz en sens inverse réduit la capacité de la vague de tension à transporter des ions de plus grand CCS et sont basculés à l'arrière de la vague, avant d'être poussés par la vague suivante [6]. Pour travailler sur la séparation d'ions d'intérêt, il est donc possible de travailler sur les paramètres de ces vagues, notamment leur amplitude (en V) et leur vitesse (m/s) [50]. Le réglage de ces deux paramètres est primordial pour une expérience de mobilité ionique réussie, en s'assurant de vider la cellule entre deux passages/vagues d'ions. Le processus de séparation TWIMS du Synapt G2-S est représenté dans la Figure 15.

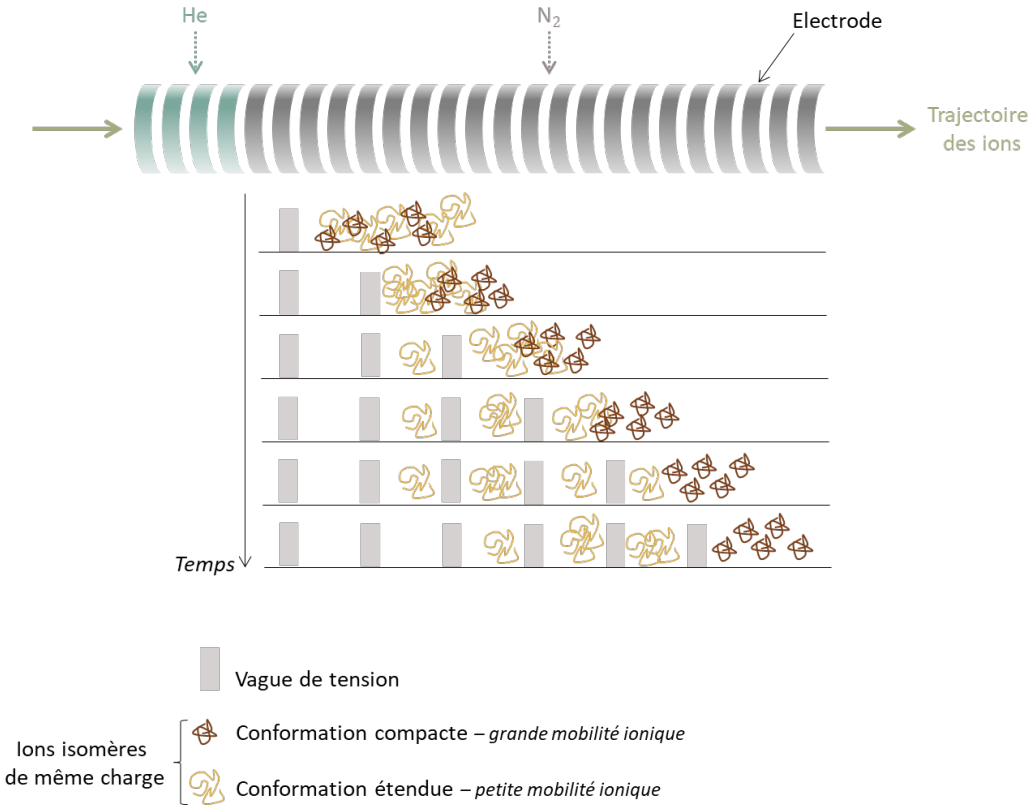


Figure 15 : Principe de séparation en mobilité ionique selon la technologie TWIMS

b) Fragmentation peptidique

Grâce aux différentes méthodes d'activation citées précédemment et aux diverses configurations d'analyseurs, la caractérisation de peptides par des expériences complémentaires de spectrométrie de masse en tandem devient plus fiable. Les ions fragments générés suite à l'activation des peptides sont nommés selon la nomenclature de Roepstorff-Fohlmann [56] complétée par Biemann [57] (voir Figure 16). On retrouve globalement des ions b, a et c qui renseignent la partie N-terminale du

peptide, ainsi que des ions y, z et x qui contiennent l'information C-terminale. La nature et les abondances de ces ions sur les spectres MS/MS peuvent varier en fonction de la méthode d'activation employée, des réglages opérés mais également la structure du peptide. Les ions b, a et y sont produits suite à un type d'activation de faible énergie (comme le CID). Les ions de séquence c, z, x ainsi que les ions d, v et w issus de la fragmentation des chaines latérales des résidus du peptide dissocié sont générés suite à une activation à haute énergie (comme l'ETD).

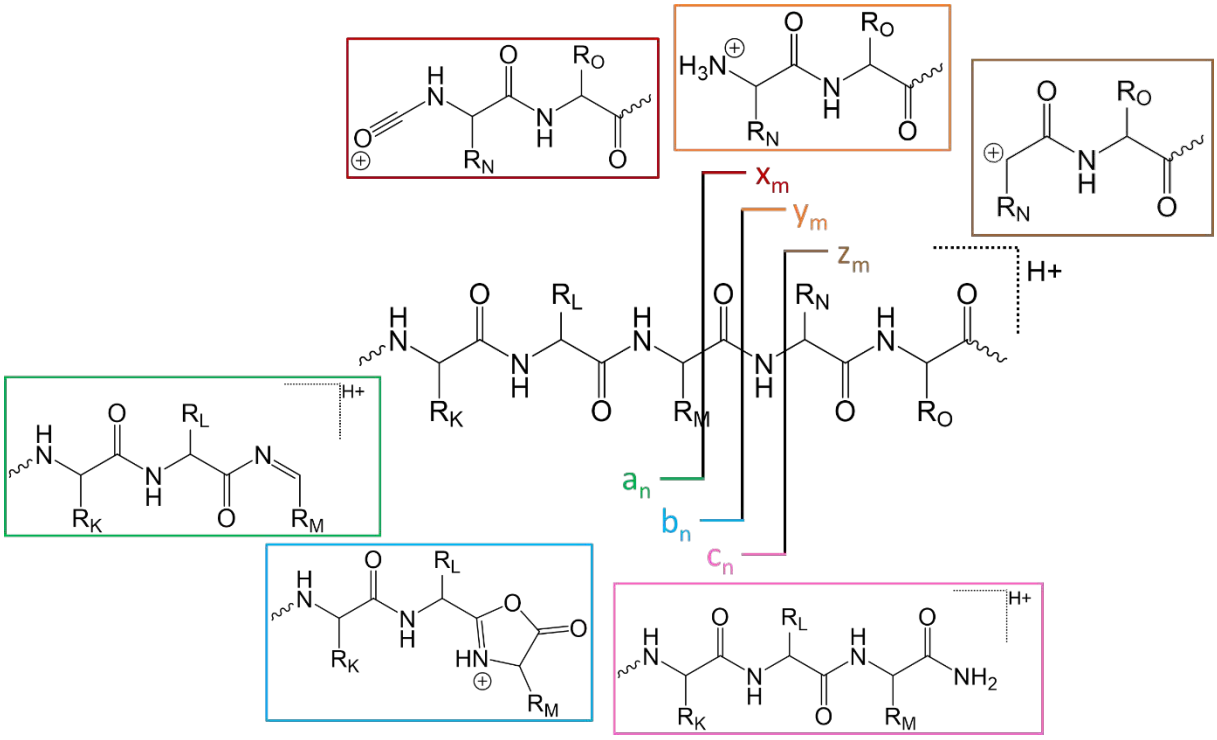


Figure 16 : Nomenclature et structure d'ions fragments issus d'une fragmentation peptidique

A partir des ions moléculaires ou des ions fragments, il est possible d'observer différentes pertes de neutres. Celles-ci sont répertoriées dans le Tableau 3, avec les symboles correspondants utilisés pour annoter les spectres MS/MS, quel que soit le type d'activation utilisé.

Tableau 3 : Pertes de neutre observées issues d'ions moléculaires ou d'ions fragments

Perte	Formule brute	Masse	Spécificique à un résidu	Symbole
Eau	H_2O	18	-	°
Ammoniac	NH_3	17	-	*
Formamide	$HCONH_2$	45	-	#
Sulfure d'hydrogène	SH_2	34	Cys	£
Carbodiimide	HN=C=NH	42	Arg	^
Guanidinium	$H_2N\text{-}C(NH)\text{-}NH_2$	59	Arg	¨
Formaldehyde	CH_2O	30	Ser	~
Acetaldehyde	CH_3CHO	44	Thr	§

Seules les fragmentations issues d'activation vibrationnelle CID basse énergie et électronique ETD seront utilisées pour les expériences menées, et seront donc décrites.

i. CID

Un modèle de fragmentation appelé « Modèle du Proton Mobile » introduit par Dongré et al. [58] a été développé afin d'expliquer les fragmentations de peptides activés par collision (CID) à basse énergie (relation entre les emplacements de la charge et les liaisons amides clivées pour les peptides protonés [59]). Ce modèle peut être divisé en trois étapes pour décrire les évènements successifs : la pré-dissociation, la dissociation et la post-dissociation.

Pré-dissociation

La première étape de pré-dissociation correspond à la protonation des peptides permettant d'enclencher les mécanismes de fragmentation (fragmentations dirigées par la charge). Le modèle du proton mobile stipule que lors de l'excitation, le ou les protons migrent vers des sites de protonation avant la fragmentation, à condition qu'ils ne soient pas séquestrés par une chaine latérale d'un résidu [58]. Les peptides peuvent être protonés sur différents sites le long de leurs séquences. Généralement, les sites les plus favorisés sont les plus basiques en phase gazeuse, avec par ordre décroissant les résidus Arginine, Lysine puis Histidine, mais également la fonction amine N-terminale. A ce stade, plusieurs éventualités sont possibles. Dans le premier cas, le proton est fixé sur le site de protonation qui est plus favorable que les autres. Il devient alors nécessaire de travailler sur des peptides multichargés afin de protoner des sites moins basiques et déclencher de multiples fragmentations. Dans le second cas, il existe de nombreux sites de protonation qui sont tous accessibles, permettant de générer une grande diversité de dissociations. Avec l'augmentation de l'énergie interne des ions et la mobilité du proton d'ionisation, les liaisons amides qui sont des sites de protonation initialement défavorisés, peuvent alors être protonées conduisant à la dissociation du squelette peptidique.

Dissociation

La seconde étape correspond à la dissociation du peptide. Le proton mobile se déplace le long du squelette peptidique. D'un point de vue énergétique, le transfert du proton sur l'oxygène d'une liaison amide est favorisé avec pour effet de renforcer cette dernière. Par contre, la protonation de l'azote de l'amide permet, quant à elle, d'affaiblir cette liaison amide rendant le carbone du carbonyle plus électrophile et devenant donc une cible d'attaque nucléophile intramoléculaire, même si thermodynamiquement cela est moins favorable [60]. Ce modèle du proton mobile a été vérifié par des expériences d'échange H/D [61–63]. L'affaiblissement de cette liaison amide peptidique permet son clivage afin de générer des ions de séquence (b, a ou y) comme le montre la Figure 17.

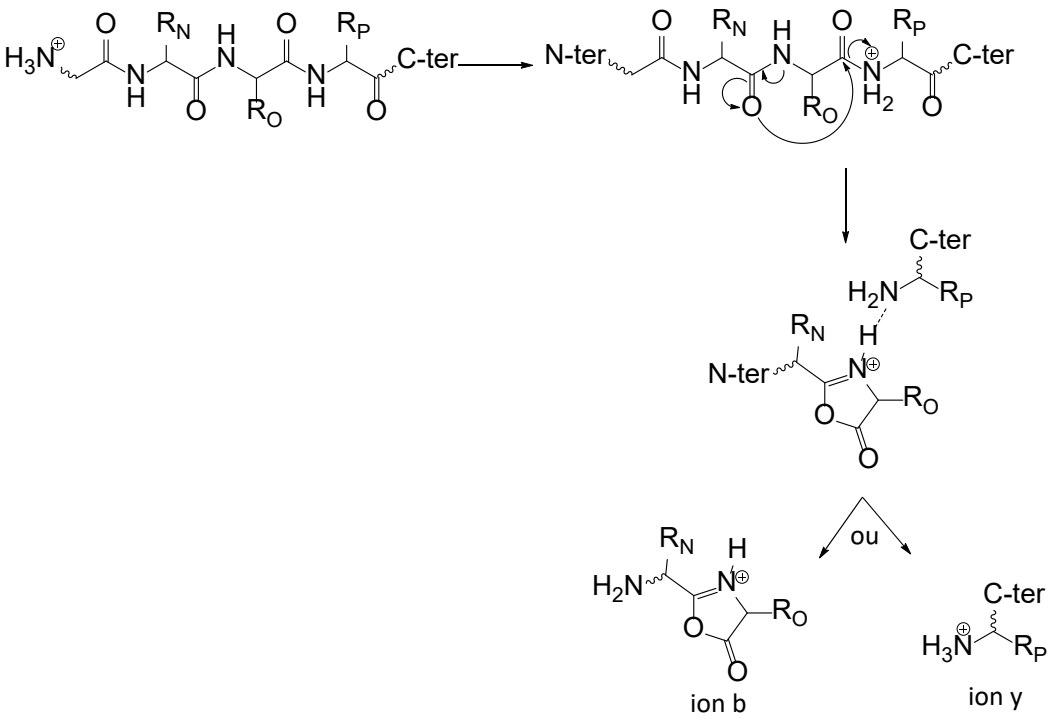


Figure 17 : Mécanisme de fragmentation d'ions b et y selon le modèle du proton mobile

Effets de certains résidus sur la fragmentation

Lors de cette étape de dissociation, certains mécanismes parallèles à la rupture de la liaison amide entrent en compétition. En effet, certains résidus sont également connus pour influencer les voies de fragmentations issues du modèle du proton mobile. On peut par exemple citer le résidu Lysine qui peut se cycliser sur lui-même en C-terminal par l'intermédiaire de sa chaine latérale, et engendre ainsi le clivage de la liaison amide correspondante (voir Figure 18).

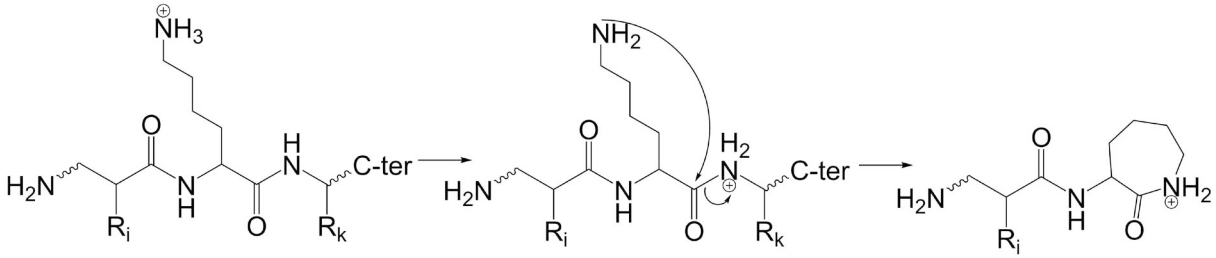


Figure 18 : Effet du résidu Lysine sur la fragmentation peptidique

Le résidu Histidine peut également avoir un effet sur la fragmentation peptidique par l'intermédiaire du noyau imidazole protoné présent sur sa chaine latérale. Le transfert de proton peut se faire sur la liaison amide du squelette peptidique en C-terminal ou en N-terminal du résidu grâce à la possible rotation de la chaine latérale (voir Figure 19). Les ions obtenus sont des ions isomères aux ions b.

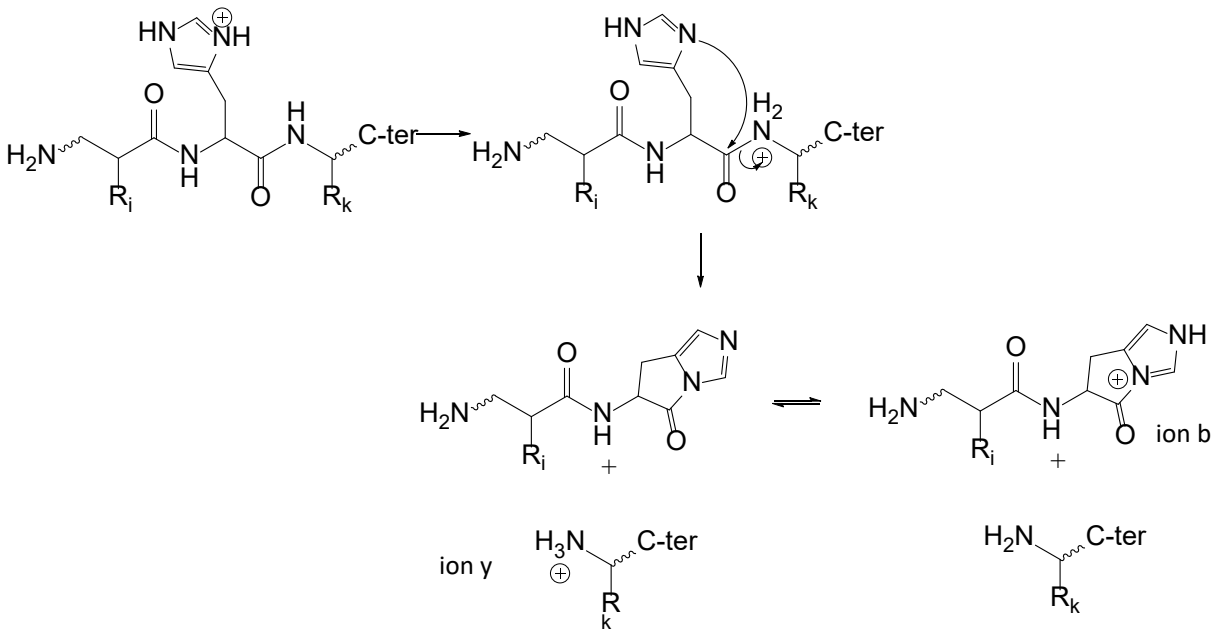


Figure 19 : Effet du résidu Histidine sur la fragmentation peptidique

La présence de proline qui est un imino acide (amine secondaire plus basique que les amines primaires des acides aminés) peut également influencer les voies de fragmentation si les protons sont mobiles, en favorisant la voie de clivage de la liaison en N-terminal de ce résidu [64].

Post-dissociation

Il est également possible d'observer des évènements post-dissociation. La production d'ions a en fait partie, puisqu'ils sont générés à partir des ions b formés en amont par la perte d'un carbonyle (C=O). De plus, sur les spectres MS/MS, des ions sont retrouvés dans la région des faibles masses : les ions immoniums. Ces ions sont spécifiques aux résidus, peu importe leurs positions dans la séquence du peptide, et sont donc considérés comme des ions diagnostiques. Cependant, certains phénomènes de réarrangements de séquence peuvent venir compliquer l'interprétation des spectres MS/MS, comme celui du 'scrambling'. Celui-ci peut conduire à une perte complète de l'information de portions de la séquence originelle en produisant des ions non directement issus de cette dernière (ions de non-séquence). Ces ions sont issus d'une attaque nucléophile intramoléculaire de la fonction amine N-terminale d'ions b sur l'oxazolone C-terminale, générant ainsi un peptide cyclique. La réouverture de ce cycle pouvant se réaliser à n'importe quel endroit au niveau des liaisons amides, on perd ainsi les informations sur les résidus C- ou N-terminaux. Toute fragmentation secondaire de cette nouvelle séquence donnera un ion fragment où l'ordre des résidus a été modifié (ions dit de scrambling). Un autre type de fragmentation secondaire peut venir compliquer l'interprétation de spectres MS/MS : les ions internes. Ceux-ci sont issus de clivages de deux liaisons peptidiques par fragmentation secondaire d'ions de séquence, et peuvent donc être générés n'importe où dans la séquence, perturbant ainsi l'assignation d'ions de séquence en raison d'erreur possible sur l'extrémité du peptide.

En résumé, plusieurs facteurs influencent le processus de fragmentation des peptides : la mobilité du (ou des) proton(s) d'ionisation, sa (leurs) position(s) ainsi que la basicité des résidus et la présence de proline [64]. Si le proton ionisant est piégé par une fonction basique, le clivage en C-terminal

de résidus acides est favorisé. Au contraire, s'il y a des protons mobiles, le clivage en N-terminal de la proline domine.

Fragmentation éloignée de la charge

Le modèle du proton mobile est un modèle qualitatif permettant de prouver l'implication directe du proton d'ionisation dans les fragmentations dites dirigées par la charge. Cependant, il ne s'agit pas d'un modèle exhaustif qui pourrait permettre de prédire des spectres complets de fragmentations de peptides protonés [59,60,65] car il faut considérer l'ensemble des voies de fragmentation en compétition qui n'ont pas été toutes décrites ou expliquées à ce jour.

Un autre mécanisme impliquant des fragmentations éloignées de la charge (CRF) a été établi suite à la fixation d'une charge sur la séquence peptidique. Cette charge peut être piégée sur un résidu basique (comme avec l'Arginine) ou fixée par introduction d'un groupement chargé ajouté synthétiquement sur des peptides d'intérêt. Diverses stratégies de marquage ont été proposées en ce sens [66–69]. Il est à souligner que les modifications post-traductionnelles connues n'engendrent pas une fixation de charge. Ce mode de fragmentation CRF ne dépend pas du proton mobile mais résulte d'un déplacement intramoléculaire d'hydrogène au sein de l'ion précurseur. Les résultats issus d'expérience d'échange proton/deuterium suggèrent qu'il s'agit de l'hydrogène amide du résidu où se produit le clivage qui se déplace sur le squelette peptidique [67,70].

Concernant les peptides contenant un nombre de proton égal ou inférieur au nombre de résidus Arginine dans leurs séquences (séquestration du proton mobile par le groupement guanidine de la chaine latérale du résidu), le squelette peptidique se fragmente moins facilement : un apport énergétique supplémentaire est nécessaire. Si la localisation de la charge est forte, les voies de fragmentation éloignées de la charge permettent de générer des dissociations plus sélectives. En effet, si un résidu acide comme l'acide aspartique (Asp) ou l'acide glutamique (Glu) est présent dans la séquence peptidique, la liaison amide C-terminale de ce résidu sera spécifiquement clivée par un mécanisme éloigné de la charge dérivé de la création intramoléculaire d'un pont salin (voir Figure 20) [60,71,72].

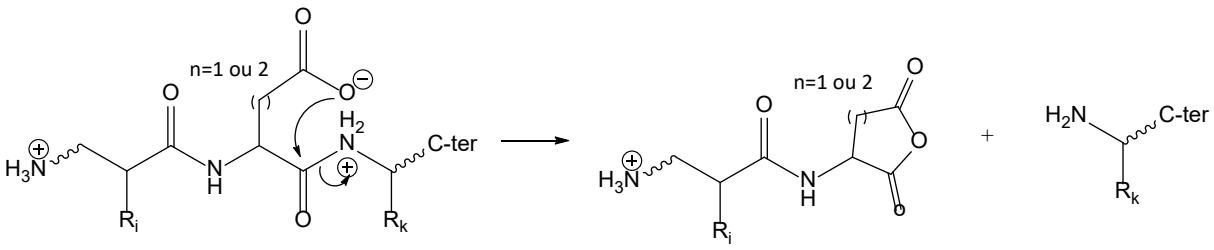


Figure 20 : Mécanisme du clivage sélectif des résidus Asp et Glu par l'intermédiaire d'un pont salin par Yu et al. [73]

Cas des modifications post-traductionnelles

Concernant les modifications post-traductionnelles, l'énergie élevée appliquée en CID mène au clivage de ces modifications labiles, comme les phosphorylations qui sont les plus représentées. En effet, en phase gazeuse la protonation de la liaison amide entre en compétition avec celle du groupement phosphate qui est favorisée entrainant une perte de neutre importante (perte de H_3PO_4), jusqu'à représenter 85% de l'intensité observée [74]. De ce fait, la fragmentation du squelette peptidique est diminuée et empêche l'obtention de bons recouvrements de séquence. Or il y a certains intérêts à pouvoir identifier les modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation qui intervient dans de nombreux processus cellulaires [75]. D'autres méthodes d'activation, comme l'ETD, peuvent être envisagées dans l'objectif de caractériser ces modifications post-traductionnelles.

ii. ExD

Deux grandes méthodes d'activation à base d'électrons sont regroupées sous l'acronyme ExD : l'ECD (Electron Capture Dissociation) et l'ETD (Electron Transfer Dissociation). Les résultats de fragmentation des deux méthodes sont comparables, même si quelques différences ont été décrites [76,77]. Entre autre, l'utilisation d'un anion radicalaire en ETD génère une voie de réaction supplémentaire qui n'est pas disponible en ECD : le transfert d'un proton du peptide vers le réactif anionique qui entraine la formation d'un analyte à charge réduite [78–80]. Cependant, l'ECD fonctionne uniquement avec un analyseur FT-ICR qui est peu répandu notamment dû à son coût. De plus, des spectres ECD de bonne qualité nécessitent l'acquisition de nombreux balayages sur une période donnée, ce qui empêche l'analyse de mélanges complexes en couplant le spectromètre de masse à une HPLC. Pour éviter ces limitations, l'ETD est utilisé : seulement quelques millisecondes sont nécessaires pour obtenir des fragmentations efficaces, en utilisant très peu de quantité d'échantillon [81].

Mécanisme de Cornell

Le premier mécanisme de fragmentation peptidique à partir d'une capture d'électron générant des ions c et $z^{\bullet}$ a été proposé par McLafferty et son équipe [35,76,82,83], et implique la capture d'électron par un groupe amide protoné du squelette peptidique, suivi par un clivage homolytique de la liaison N-Cα du côté C-terminal du radical formé. L'énolimine formée du côté N-terminal se tautomérise ensuite en fonction amide qui est plus stable. Cependant, cette protonation sur une fonction amide du squelette peptidique est défavorable. Il est plus probable que des protons soient captés par des groupes de chaines latérales comme ceux de la lysine, l'arginine ou encore l'histidine qui sont beaucoup plus basiques [76,83]. Ce mécanisme a ensuite été affiné pour s'appeler le mécanisme de Cornell (université dans laquelle McLafferty et ses collègues ont travaillé pour établir ce mécanisme) (voir Figure 21) [84].

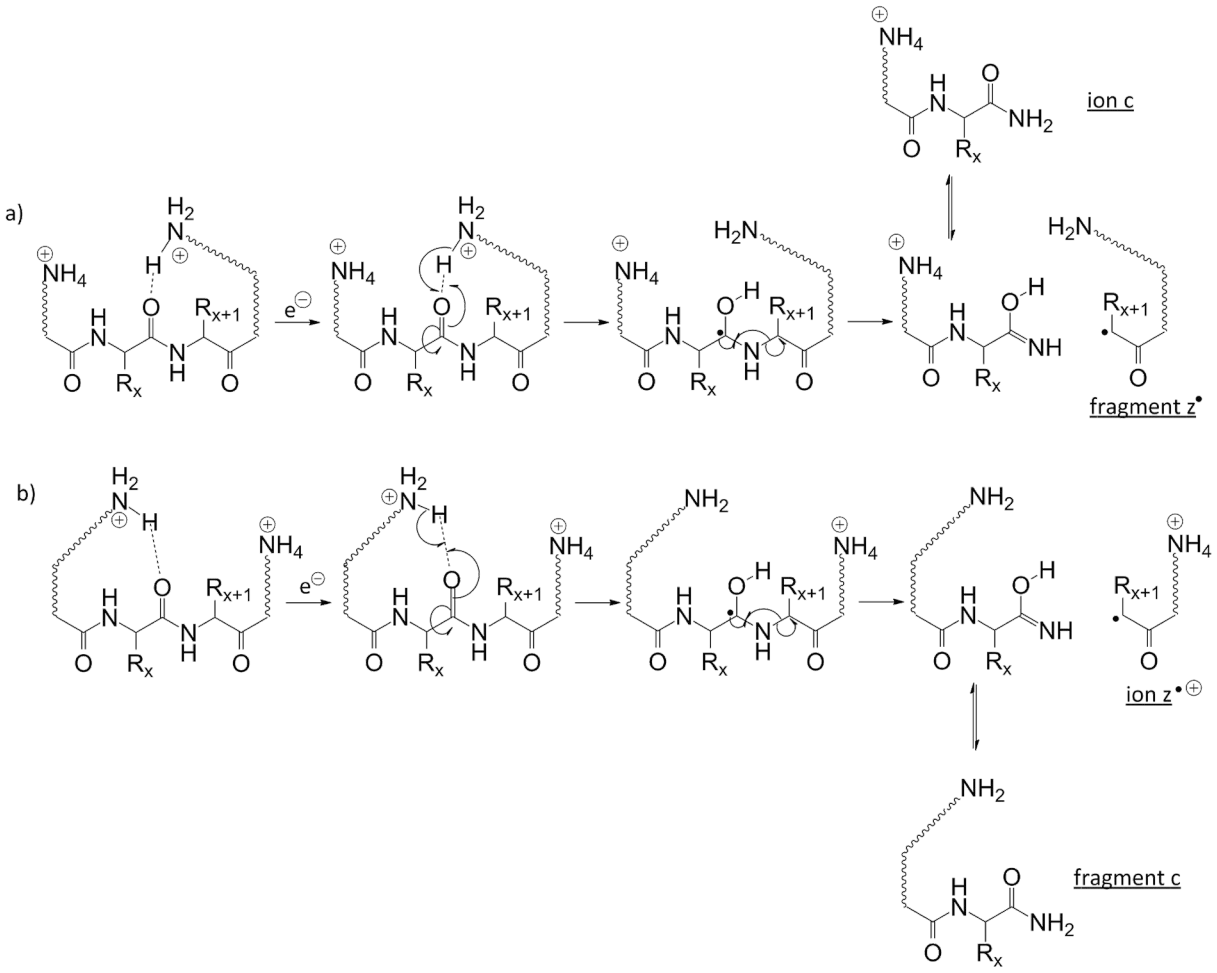


Figure 21 : Mécanisme de fragmentation de Cornell

Dans ce mécanisme, l'électron est capturé par des groupements protonés généralement situés sur les groupements des chaines latérales des sites basiques (R, K, H) ou sur l'amine N-terminale [76,83,85]. L'ammonium radical hypervalent instable est lié par une liaison hydrogène intramoléculaire à un oxygène de groupe carbonyle de l'amide du squelette peptidique. L'électron capturé atteint ensuite un état fondamental par des processus de relaxation, provoquant le transfert d'un atome d'hydrogène vers l'oxygène par lequel il était lié, et entraîne la formation d'un intermédiaire radical sur le carbone du carbonyle correspondant (voir Figure 21). Puis, la liaison N-Cα est clivée comme précédemment décrit. La charge résultante sur les fragments N-terminaux (les ions c) ou C-terminaux (ions z) dépend de l'emplacement de la charge sur la séquence peptidique du précurseur. L'avantage de ce mécanisme est sa capacité à expliquer la formation mineure d'ions a• et y, ces derniers étant normalement observés suite à une activation CID. En effet, si le radical se retrouve sur un atome d'azote du squelette peptidique (peu probable pour des raisons énergétiques), la liaison CO-Cα du côté N-terminal de l'azote peut être rompue conduisant à la formation d'ions a• et x, ce dernier perdant du monoxyde de carbone génère un ion y [76] (voir Figure 22).

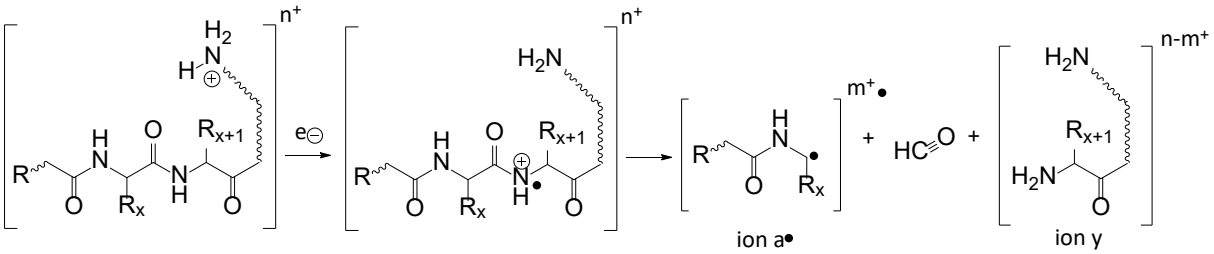


Figure 22 : Formations d'ions a• et y à partir du mécanisme de Cornell

Cependant, des études expérimentales ont été réalisées questionnant la validité de ce mécanisme. Parmi elles, Hudgins, Marshall et leurs collègues ont travaillé sur la dissociation d'un peptide dichargé modifié $(Ac\text{-}Kbt\text{-}Gly_5\text{-}Kbt\text{-}NH_2)^{2+}$: les charges ont été localisées sur des ammoniums quaternaires de deux résidus lysine, tandis que l'amine N-terminale a été acétylée et la fonction acide carboxylique C-terminale amidée. Malgré l'absence d'un groupement ammonium, des clivages de la liaison N-Cα ont été observés sur des spectres MS/MS [86]. De plus, d'autres études ont démontré que les résidus radicalaires Arginine et Histidine protonés forment des intermédiaires radicaux (respectivement guanidinium et imidazolium) qui sont de bons accepteurs de protons ou d'atomes d'hydrogène, mais de mauvais donneurs d'hydrogène [87–90]. Il est donc peu probable que ces résidus soient impliqués dans un mécanisme comme celui de la Figure 21.

Mécanisme de Washington-Utah

Les universités de l'Utah et de Washington ont indépendamment travaillé sur des mécanismes très similaires. Comme dans le mécanisme de Cornell, le carbonyle d'une liaison amide est impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire avec un groupement chargé positivement (voir Figure 23). La principale fonction de cette liaison hydrogène est d'abaisser l'énergie de l'orbitale π* via la stabilisation de Coulomb. C'est cette orbitale qui capte un électron afin de former un anion amide hautement basique [76]. A partir de cette étape, les deux mécanismes se différencient par l'ordre des étapes. Dans la variante de Washington, l'anion amide est tout d'abord neutralisé par le transfert d'un proton pour former un radical, puis la liaison N-Cα est clivée. Tandis que la variante de l'Utah se base en premier lieu sur la nature radicalaire de l'anion qui entraine la rupture de la liaison N-Cα, qui forme ainsi un ion z• ainsi qu'un fragment c complémentaire. Ce dernier, qui est encore sous la forme d'un anion, nécessite le transfert d'un proton pour former un ion c. La distinction entre ces deux mécanismes est difficile à établir car elle nécessite des calculs théoriques ainsi que des expériences pointues [76,83]. D'autres mécanismes ont été développés pour tenter d'expliquer ces fragmentations [91–93] mais ne seront pas développés ici.

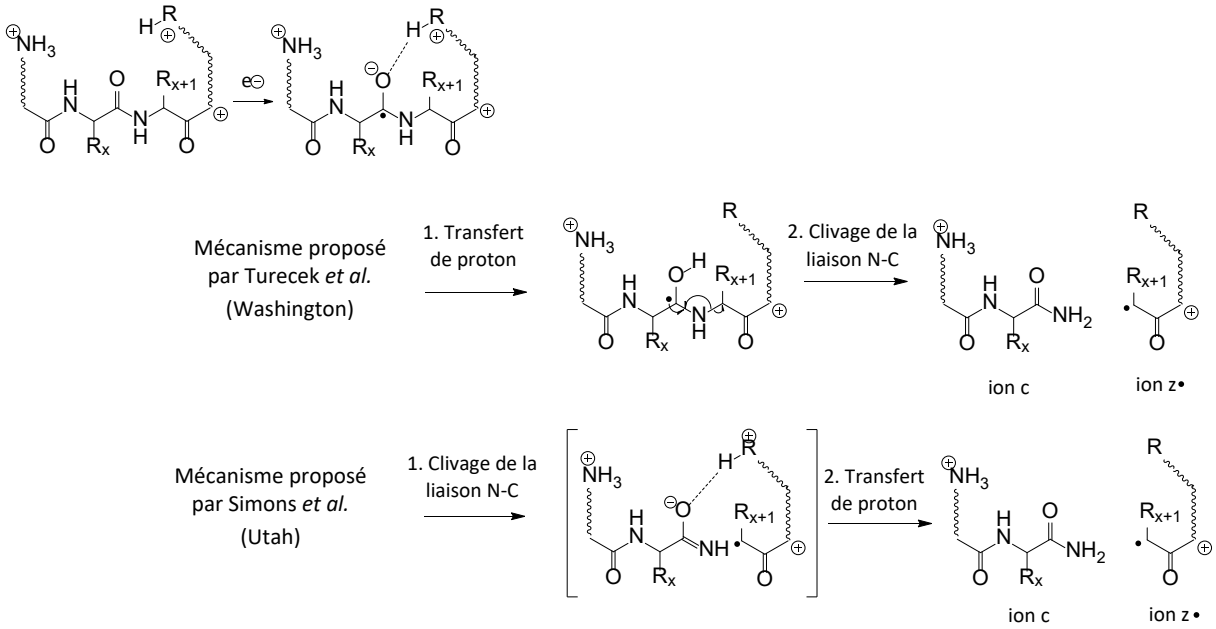


Figure 23 : Mécanismes Washington-Utah de formation des ions c et z•

Fragmentations spécifiques

La fragmentation peptidique suite à une activation électronique permet également de générer des ions issus de la perte partielle des chaines latérales des résidus (ions d, w) [94]. Il a été observé que l'augmentation de la charge entraîne une augmentation du clivage de ces chaines latérales, ce qui permet d'obtenir des ions diagnostiques spécifiques à certains résidus (Arg, His, Asn/Gln) dans le cadre d'un séquençage De Novo [95]. Le clivage de ces chaines latérales permet entre autre de distinguer les résidus Isoleucine et Leucine qui possèdent la même masse monoisotopique, mais des chaines latérales distinctes générant ainsi des ions spécifiques au résidu [96,97]. Il existe cependant une particularité avec la proline, puisque le clivage de la liaison N-Cα ne permet pas de générer deux fragments distincts comme avec les autres résidus puisque cette liaison est impliquée dans l'hétérocycle du résidu (voir Figure 24) [81,98]. En plus de ne pas générer d'ion c et z• en N-terminal de sa position, la proline ne produit pas de fragments spécifiques et ne peut ainsi être déduit qu'à partir des masses des autres fragments.

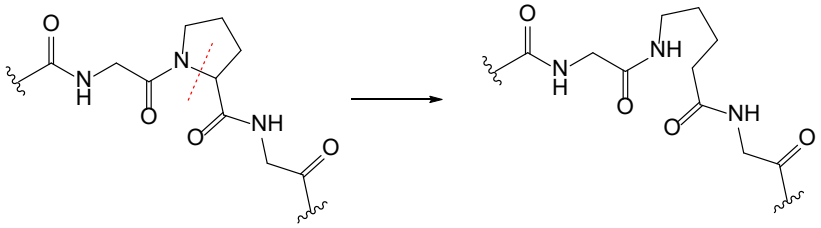


Figure 24 : Clivage en N-terminal de la proline sous activation ETD

Cas des modifications post-traductionnelles

Un avantage de l'utilisation de l'ETD par rapport au CID est la conservation des modifications post-traductionnelles ainsi que le maintien des liaisons non covalentes intramoléculaires qui déterminent la structure tridimensionnelle du peptide/de la protéine [37,81,99,100]. Contrairement au CID, l'ETD produit des séries d'ions c et z$^{\bullet}$ permettant de retrouver la séquence du peptide tout en gardant le groupement phosphate [81]. La complémentarité des deux types d'activation devient intéressante lorsque qu'une modification post-traductionnelle se trouve près d'une proline. Tandis que l'ETD ne permet pas de fragmenter en N-terminal de ce résidu mais permet de garder la modification, le CID en est capable mais clive la modification à proximité. Ainsi, grâce à l'utilisation de l'ETD, des phosphoprotéomes peuvent être réalisés [101].

Contrairement aux modifications post-traductionnelles, les ponts disulfures intramoléculaires entre deux cystéines d'une séquence peptidique ne sont pas rompus en CID. Cependant, l'activation par électron le permet. Encore une fois, cette fragmentation peut s'expliquer par plusieurs mécanismes. Le premier se basant sur celui de Cornell : l'électron est capté par un groupement chargé positivement puis transféré vers une orbitale S-S σ*, après quoi le clivage du pont disulfure peut se faire. Une autre possibilité se basant sur le mécanisme Utah-Washington, dans lequel l'électron est directement capturé par une orbitale S-S σ*, résultant par un clivage du pont disulfure avant ou après transfert d'un proton [77,102].

Tous ces mécanismes proposés sont supposés être non ergodiques, signifiant que la fragmentation se déroule avant que l'énergie soit libérée, lorsque l'électron est capturé (6 eV), soit redistribuée parmi les 3N-6 degrés de liberté vibrationnels de l'ion [37,76,84,103]. De plus, les méthodes d'activation ExD fragmentent le squelette peptidique de manière non sélective, peu importe la séquence et la taille du peptide [81,103]. Pour expliquer cela par rapport aux méthodes d'activation vibrationnelles, un modèle a été proposé dans lequel le radical H$^{\bullet}$ libéré lors de la capture d'électrons devient mobile avant la fragmentation du peptide [104,105]. Le H$^{\bullet}$ libéré peut ainsi réagir avec plusieurs fonctions carbonyles de liaisons amides réparties dans la séquence du peptide, et engendre la fragmentation de la liaison N-Cα. Cette hypothèse permet d'expliquer la rupture de cette liaison plutôt que la liaison amide qui est thermodynamiquement plus labile [35,84]. Cependant, des calculs de mécanique quantique ont démontré que la liaison N-Cα est également thermodynamiquement très labile : la barrière énergétique pour réaliser le clivage étant très faible l'hypothèse non-ergodique n'a pas besoin d'être évoquée [106,107]. Pepin et Turecek ont également réussi à démontrer que la distribution de l'énergie est proportionnelle au nombre de degrés de liberté vibrationnels des fragments c ou z$^{\bullet}$ [108]. On peut alors se demander pourquoi les modifications post-traductionnelles ainsi que des ligands liés de manière non covalente sont souvent conservés, contrairement au CID. Cela pourrait s'expliquer par la quantité d'énergie transférée aux ions selon les deux méthodes (quelques eV pour l'ETD comparés à des dizaines voire centaines d'eV pour le CID).

c) Séquençage De Novo

A partir des spectres de masse MS/MS obtenus grâce aux différentes méthodes d'ionisation, d'activation ou encore aux différents analyseurs de masse précédemment décrits, il est possible de retrouver la séquence de peptides inconnus, ce qui est essentiel pour étudier leurs fonctions biologiques. Il existe globalement deux approches afin de résoudre le séquençage de ces peptides : la recherche dans les bases de données et le séquençage *de novo*.

La première consiste simplement à comparer les données du spectre MS/MS expérimental obtenu à des bases de données qui répertorient les séquences de peptides hypothétiques générées à partir d'une protéine ou d'une base de données génomique qui a été traduite [109]. Il existe deux moteurs de recherches largement utilisés pour la recherche dans les bases de données : SEQUEST [110] et MASCOT [111]. Les deux ont la même fonctionnalité mais utilisent des systèmes de notation différents pour classer les correspondances spectrales. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients selon les caractéristiques des spectres à interpréter. Il existe également d'autres moteurs de recherches dont les particularités ont été comparées [112,113]. Malgré l'avantage de cette première approche qui permet d'interpréter un grand nombre de spectres à haut débit de manière efficace, elle présente plusieurs inconvénients. La limite principale de cette approche est sa dépendance même à des bases de données. En effet, si l'organisme étudié n'est pas répertorié dans une base de donné, que son génome n'a pas été séquencé, il n'est pas possible de remonter à la séquence des peptides [109]. De plus, des séquences erronées peuvent être proposées par assignation incorrecte de signaux faussement détectés comme ions fragments dû à un bruit de fond trop élevé, ou à l'inverse, des spectres MS/MS peuvent ne pas aboutir à une identification dû à la présence de modifications post-traductionnelles ou de résidus non référencés.

Pour surmonter ces limites, le séquençage *de novo* consiste à déterminer une séquence à partir des spectres MS/MS sans avoir recourt à une base de données. Cette approche permet ainsi de déterminer des séquences peptidiques pouvant contenir des modifications post-traductionnelles, ou des résidus non protéinogéniques encore inconnus, ainsi qu'identifier de nouveaux variants. Les spectres MS/MS *de novo* peuvent être interprétés manuellement ou par différents algorithmes informatiques. Ces outils d'aide à l'interprétation ont pour objectif d'attribuer un type d'ion aux signaux abondants (b, a ou y sous activation CID par exemple) et d'établir ainsi les ions consécutifs d'une même série différant par la masse d'un résidu [112] (voir Tableau 1). Les spectromètres de masse à haute, voire ultra haute résolution sont utiles pour l'identification des résidus présentant des écarts de masse inférieurs à l'unité comme les couples Asp et Asn (0.984 Da), Glu et Gln (0.984 Da) ou encore Lys et Gln (0.036 Da). A cette difficulté peut s'ajouter celle de la probabilité de similarité de valeurs de m/z pour des ions fragments de natures différentes compliquant l'interprétation du spectre MS/MS [109].

Parmi les différents algorithmes développés pour le séquençage *de novo*, on retrouve différentes approches : l'approche naïve, les graphiques de spectre, ou encore la programmation dynamique [112–114]. La limite de ces algorithmes est illustrée par l'absence de validation statistique automatisée, qui implique de vérifier les attributions réalisées pour accepter ou non une séquence. De ce fait, malgré le gain de temps offert par ces logiciels, il est nécessaire de fournir un travail supplémentaire pour évaluer les résultats manuellement [114]. Enfin, la difficulté majeure du séquençage *de novo* par rapport aux recherches dans les bases de données réside dans l'incertitude d'obtention de la séquence peptidique complète. En effet, à partir des bases de données, il est possible de

remonter à la séquence complète d'un peptide répertorié malgré un spectre MS/MS peu fourni. En réalisant un séquençage *de novo,* il n'est pas possible de déterminer une séquence entière à partir des fragments de séquence qui, par définition du modèle du proton mobile, débutent pour la série des ions b au niveau du dipeptide N-terminal (ion b_1 non obtenu en CID basse énergie) [60,114]. Par ailleurs, des morceaux de séquences peuvent ne pas être accessibles à la dissociation aboutissant à des séries d'ions tronqués sur le spectre MS/MS. Il devient alors nécessaire de travailler sur différents paramètres comme la méthode d'activation ou l'agent d'ionisation par exemple afin d'étendre les recouvrements de séquence pour obtenir des séquences peptidiques les plus complètes possibles. Il est très souvent nécessaire de vérifier l'assignation obtenue en spectrométrie de masse par la synthèse du peptide supposé.

3) Techniques séparatives

L'analyse de mélanges complexes par spectrométrie de masse est généralement précédée d'une méthode séparative comme la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire. Ces deux techniques sont complémentaires pour l'analyse de peptides [115] et seront décrites ci-dessous.

a) Chromatographie Liquide

La chromatographie liquide est une méthode analytique qui permet de séparer les composés d'un mélange, en le diluant dans une phase mobile passant par une phase stationnaire. Les molécules qui interagissent fortement avec la phase stationnaire migreront plus lentement que celles qui ne le sont pas. Un détecteur UV est placé à la suite de la phase stationnaire pour visualiser la séparation et générer les chromatogrammes (voir Figure 25).

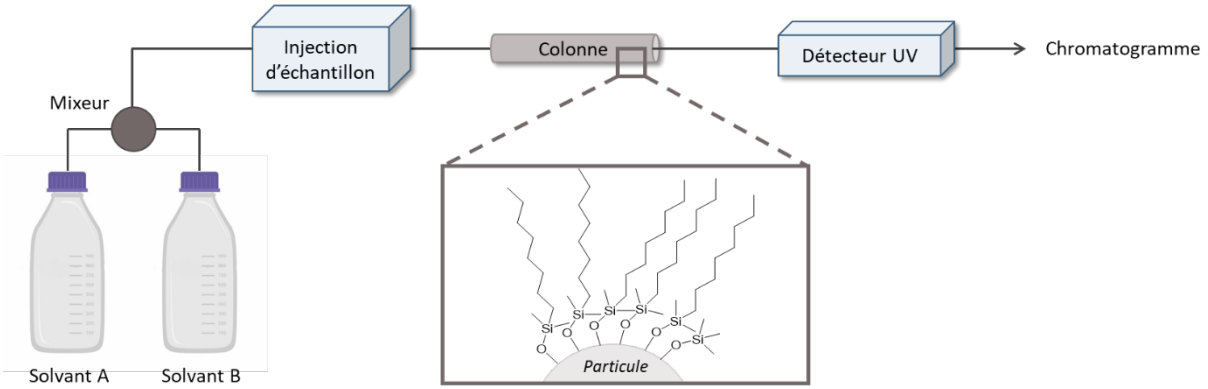


Figure 25 : Principe de la chromatographie liquide

Le choix des phases mobiles et de la phase stationnaire dépend des caractéristiques des composés à séparer. Il existe ainsi différents modes de chromatographie liquide : par échange d'ions (IEC), par exclusion de taille (SEC), par affinité ou encore par interaction hydrophobe, et plus particulièrement la chromatographie en phase inverse (RPLC). Cette dernière est la méthode la plus utilisée pour la séparation de peptides [116–118]. La RPLC est largement utilisée car elle convient à l'analyse de composés d'une large gamme de polarité (polaires, non polaires et ioniques) et de structure. Un avantage considérable de cette technique est la diversité de colonnes commerciales (plus de 600

colonnes RPLC disponibles à l'achat [119]), qui permettent d'optimiser la séparation des molécules analysées.

Le choix de la colonne est une étape importante dans le développement d'une méthode HPLC, mais peut s'avérer être compliqué. Il existe actuellement de nombreuses colonnes RPLC qui diffèrent selon la taille et le type de particule (poreuses, core-shell, monolithes et polymères), ou encore le type de ligands liés [119]. Les types de phase stationnaire les plus courantes sont les chaines alkyles pouvant aller de 1 à 30 carbones, la plus utilisée étant la C18. Plus la chaine aliphatique est longue, plus la phase stationnaire sera hydrophobe. En plus de la nature du ligand, le nombre de ces ligands sur le support silice est important : plus ce nombre est élevé, plus la colonne sera hydrophobe [119]. Pour compléter et affiner la séparation de composés, certains fabricants ont modifié la nature de la surface de la particule, notamment Phenomenex sur la colonne Luna Polar C18 [120]. Pour cette colonne, le ligand est une chaine alkyle de 18 carbones (C18) qui fournit des interactions hydrophobes, tandis que la surface des particules est chargée positivement et permet ainsi une meilleure rétention polaire ainsi qu'une stabilité aqueuse.

Dans l'objectif d'optimiser la séparation de composés, il est également possible de modifier plusieurs paramètres expérimentaux tels que le gradient d'élution, le débit, le pH des phases mobiles, la longueur de la colonne ou encore la taille des particules qui composent la phase stationnaire.

b) Electrophorèse capillaire

Tout comme pour la chromatographie liquide, l'électrophorèse capillaire est une technique analytique qui permet de séparer des composés d'un échantillon. Cependant, ces deux techniques doivent être considérées comme complémentaires, chacune ayant ses avantages pour certaines applications. Dans ce sens, l'électrophorèse capillaire est plus adaptée à la séparation d'espèces ioniques ou ionisables [121].

Le principe de l'électrophorèse capillaire est décrit sur la Figure 26 : sous l'effet d'un champ électrique, les composés du mélange injectés dans un capillaire sont séparés à l'aide d'un électrolyte de fond (BGE, BackGround Electrolyte), qui est généralement un tampon et sert à assurer la conductivité, grâce à leurs différences de mobilités (les ions sont accélérés dans la même direction que la force appliquée). Un détecteur, communément un détecteur UV, permet de visualiser cette séparation et de retranscrire les résultats sur un électrophérogramme. Chacun de ces constituants sera décrit ci-dessous.

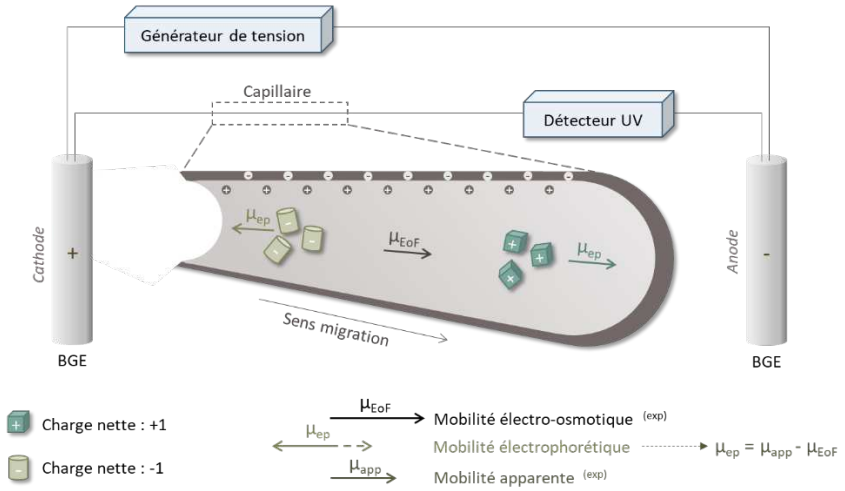


Figure 26 : Principe de l'électrophorèse capillaire

Il existe divers modes de séparation en électrophorèse capillaire, à partir d'un même instrument. Parmi eux, l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) est le mode de séparation le plus utilisé [121]. En CZE, le capillaire est rempli d'un BGE qui fournit le pouvoir tampon et permet de conduire le courant électrique nécessaire à la séparation des molécules chargées. La vitesse de migration ainsi que la direction de chaque composé sont déterminées par la somme du flux électro-osmotique (EoF, induit par l'application du champ électrique) et de la mobilité électrophorétique (μ_{ep}), qui est lié à sa charge, sa taille ainsi que la vitesse de l'EoF à un pH donné. De ce fait, une solution de BGE appropriée à l'analyse des molécules doit être développée pour chaque application, en veillant à maintenir l'ionisation des molécules en fonction de leur pKa. Pour chaque BGE développé, la composition, le pH ainsi que la force ionique sont étudiés. Il est possible de calculer pour chaque composé détecté sa mobilité électrophorétique qui résulte de la soustraction de la mobilité électro-osmotique à partir de la mobilité apparente, qui sont obtenues expérimentalement (voir Figure 26).

Pour effectuer une séparation électrophorétique, il est communément employé un capillaire de silice fondue nue [122] : il s'agit d'un matériau pratique en raison de son inertie chimique ainsi que de sa transparence optique. En fonction du pH du BGE employé, les groupements silanol à la surface de la silice peuvent être sous forme protonée ou non. En découle ainsi une autre caractéristique de l'électrophorèse capillaire : l'EoF. Les groupements silanols déprotonés génèrent une charge négative à la surface du capillaire. Les cations du BGE s'y adsorbent et forment la couche de Stern en surface du capillaire. C'est cette couche qui migre et qui donne ainsi l'EoF. Cela peut être un avantage ou un inconvénient pour la séparation des molécules, en fonction de l'application [122]. En effet, à pH 7, l'EoF contribue au mouvement des ions à travers le capillaire : les espèces cationiques migrent ainsi à une vitesse supérieure à celle que l'on pourrait prédire, tandis que pour les espèces anioniques le phénomène inverse se produit. Pour les molécules neutres, elles sont transportées vers l'anode comme pour les espèces cationiques. Cependant, si un capillaire d'un autre matériau est utilisé, il faudra tenir compte de la chimie de la surface interne, et de son impact sur l'EoF [121].

La CZE peut être utilisée dans le cadre d'analyse de biomolécules comme les peptides. Selon leur composition en acide aminé et leur séquence, les peptides diffèrent par leur charge électrique, leur masse moléculaire, ainsi que leur conformation entre autres. Ces différences permettent de les séparer en CZE. La mobilité électrophorétique de cette classe de biomolécule dépend du peptide en lui-même, des propriétés du BGE mais également des interactions des peptides avec le milieu. On

détermine alors la mobilité électrophorétique caractéristique d'un peptide selon des conditions expérimentales données. En effet, la mobilité est dépendante du BGE. Il est donc important de mentionner les conditions pour chaque analyse réalisée.

Les peptides et les protéines ont tendance à s'adsorber sur la surface interne des capillaires en silice, résultant en une séparation de ces biomolécules moins efficaces. Il existe plusieurs stratégies pour contrer cela et améliorer les séparations. La méthode la plus simple consiste à travailler à pH faible pour conserver les fonctions silanols protonées, empêchant ainsi les interactions électrostatiques des peptides chargés positivement. Le recouvrement des parois du capillaire peuvent également réduire l'adsorption des biomolécules, mais également de modifier l'EoF afin de pouvoir améliorer les différences de mobilités électrophorétiques des peptides et améliorer la sélectivité [122].

On peut différencier deux types de recouvrement : permanents ou dynamiques (respectivement greffage covalent ou non covalent à la surface interne du capillaire). Dans le premier cas, le matériau utilisé est lié de manière covalente aux groupements silanol du capillaire. Les recouvrements dynamiques s'adsorbent au contraire de manière réversible sur les parois du capillaire, ce qui permet de les retirer pour les régénérer si besoin. Les procédures engagées sont faciles à réaliser dans des conditions de laboratoire et constituent un moyen efficace de modifier l'EoF et diminuer l'adsorption des peptides. Un ajout de polymère neutre, tel que le PEO (polyethylene oxide), recouvre les fonctions silanols du capillaire et délivre une surface électriquement neutre, un capillaire inerte, empêchant l'adsorption des analytes [123]. Il existe cependant un inconvénient qui est leur possible interférence avec les systèmes de séparation et/ou de détection, notamment la spectrométrie de masse : si le matériau pénètre dans la source de l'appareil, la source peut être contaminée et le signal de l'analyte peut se retrouver supprimé [122].

4) Références

1. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc*. 1963;85(14):2149-2154. doi:10.1021/ja00897a025

2. Hansen PR, Oddo A. Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. In: Houen G, ed. *Peptide Antibodies*. Vol 1348. Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2015:33-50. doi:10.1007/978-1-4939-2999-3_5

3. Atherton E, Sheppard RC. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press; 1989. https://books.google.fr/books?id=5gDwAAAAMAAJ

4. Amblard M, Fehrentz JA, Martinez J, Subra G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *MB*. 2006;33(3):239-254. doi:10.1385/MB:33:3:239

5. Thomas SN. Mass spectrometry - Chapter 10. In: *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. Elsevier; 2019:171-185. doi:10.1016/B978-0-12-815499-1.00010-7

6. Greaves J, Roboz J. *Mass Spectrometry for the Novice*. CRC Press; 2014.

7. Mellon FA. Mass Spectrometry | Principles and Instrumentation. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier; 2003:3739-3749. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00746-X

8. Hocart CH. Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification and Quantification. In: *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier; 2010:327-388. doi:10.1016/B978-008045382-8.00187-8

9. Kebarle P, Verkerk UH. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(6):898-917. doi:10.1002/mas.20247

10. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics*. 1968;49(5):2240-2249. doi:10.1063/1.1670391

11. Iribarne JV. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys*. 1976;64(6):2287. doi:10.1063/1.432536

12. Bowie JH, Brinkworth CS, Dua S. Collision-induced fragmentations of the (M-H)? parent anions of underivatized peptides: An aid to structure determination and some unusual negative ion cleavages. *Mass Spectrom Rev*. 2002;21(2):87-107. doi:10.1002/mas.10022

13. Harrison AG. Sequence-specific fragmentation of deprotonated peptides containing H or alkyl side chains. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2001;12(1):1-13. doi:10.1016/S1044-0305(00)00199-9

14. Harrison AG, Young AB. Fragmentation reactions of deprotonated peptides containing proline. The proline effect. *J Mass Spectrom*. 2005;40(9):1173-1186. doi:10.1002/jms.891

15. Harrison AG, Young AB. Fragmentation reactions of deprotonated peptides containing aspartic acid. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2006;255-256:111-122. doi:10.1016/j.ijms.2005.12.037

16. Nadler WM, Waidelich D, Kerner A, et al. MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification. *J Proteome Res*. 2017;16(3):1207-1215. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00805

17. Zenobi R, Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 1998;17(5):337-366. doi:10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:5<337::AID-MAS2>3.0.CO;2-S

18. Knochenmuss R, Zenobi R. MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes. *Chem Rev*. 2003;103(2):441-452. doi:10.1021/cr0103773

19. Hillenkamp F, Jaskolla TW, Karas M. The MALDI Process and Method. In: Hillenkamp F, Peter-Katalinic J, eds. *MALDI MS*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2013:1-40. doi:10.1002/9783527335961.ch1

20. Zhigilei LV, Leveugle E, Garrison BJ, Yingling YG, Zeifman MI. Computer Simulations of Laser Ablation of Molecular Substrates. *Chem Rev*. 2003;103(2):321-348. doi:10.1021/cr010459r

21. Kaufmann R, Kirsch D, Spengler B. Sequencing of peptides in a time-of-flight mass spectrometer: evaluation of postsource decay following matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI). *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1994;131:355-385. doi:10.1016/0168-1176(93)03876-N

22. Cooks RG. Special feature: Historical. Collision-induced dissociation: Readings and commentary. *J Mass Spectrom*. 1995;30(9):1215-1221. doi:10.1002/jms.1190300902

23. Mayer PM, Poon C. The mechanisms of collisional activation of ions in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(4):608-639. doi:10.1002/mas.20225

24. Shukla AK, Futrell JH. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *J Mass Spectrom*. 2000;35(9):1069-1090. doi:10.1002/1096-9888(200009)35:9<1069::AID-JMS54>3.0.CO;2-C

25. McLafferty FW, Bockhoff FM. Separation/identification system for complex mixtures using mass separation and mass spectral characterization. *Anal Chem*. 1978;50(1):69-76. doi:10.1021/ac50023a021

26. Kondrat RW, Cooks RG. Direct Analysis of Mixtures by Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 1978;50(1):81A-92A. doi:10.1021/ac50023a781

27. McLafferty FW, Bente PF, Kornfeld R, Tsai S, Howe I. Collisional activation spectra of organic ions. *J Mass Spectrom*. 1995;30(6):797-806. doi:10.1002/jms.1190300604

28. Håkansson K, Klassen JS. Ion Activation Methods for Tandem Mass Spectrometry. In: Cole RB, ed. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc.; 2012:571-630. doi:10.1002/9780470588901.ch16

29. de Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Wiley; 2007. https://books.google.fr/books?id=pqhr5XQZDtUC

30. Jennings KR. The changing impact of the collision-induced decomposition of ions on mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2000;200(1-3):479-493. doi:10.1016/S1387-3806(00)00325-0

31. Yagüe J, Paradela A, Ramos M, et al. Peptide Rearrangement during Quadrupole Ion Trap Fragmentation: Added Complexity to MS/MS Spectra. *Anal Chem*. 2003;75(6):1524-1535. doi:10.1021/ac026280d

32. Chawner R, Holman SW, Gaskell SJ, Eyers CE. Peptide Scrambling During Collision-Induced Dissociation is Influenced by ***N*** -terminal Residue Basicity. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2014;25(11):1927-1938. doi:10.1007/s13361-014-0968-y

33. Vachet RW, Bishop BM, Erickson BW, Glish GL. Novel Peptide Dissociation: Gas-Phase Intramolecular Rearrangement of Internal Amino Acid Residues. *J Am Chem Soc*. 1997;119(24):5481-5488. doi:10.1021/ja9640758

34. Sleno L, Volmer DA. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2004;39(10):1091-1112. doi:10.1002/jms.703

35. Zubarev RA, Kelleher NL, McLafferty FW. Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J Am Chem Soc*. 1998;120(13):3265-3266. doi:10.1021/ja973478k

36. Hunt DF, Coon JJ, Syka JEP, Marto JW. Electron Transfer Dissociation for Biopolymer Sequence Analysis. *Proteomics*. 2012 February ; 12(0): 530–542. doi:10.1002/pmic.201100517

37. Syka JEP, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(26):9528-9533. doi:10.1073/pnas.0402700101

38. Hart-Smith G. A review of electron-capture and electron-transfer dissociation tandem mass spectrometry in polymer chemistry. *Analytica Chimica Acta*. 2014;808:44-55. doi:10.1016/j.aca.2013.09.033

39. Bayat P, Lesage D, Cole RB. Tutorial : Ion Activation in Tandem Mass Spectrometry using Ultra-High Resolution Instrumentation. *Mass Spec Rev*. 2020;39(5-6):680-702. doi:10.1002/mas.21623

40. Lermyte F, Konijnenberg A, Williams JP, Brown JM, Valkenborg D, Sobott F. ETD Allows for Native Surface Mapping of a 150 kDa Noncovalent Complex on a Commercial Q-TWIMS-TOF Instrument. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2014;25(3):343-350. doi:10.1007/s13361-013-0798-3

41. Konenkov NV, Sudakov M, Douglas DJ. Matrix methods for the calculation of stability diagrams in quadrupole mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2002;13(6):597-613. doi:10.1016/S1044-0305(02)00365-3

42. March RE. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom*. 1997;32(4):351-369. doi:10.1002/(SICI)1096-9888(199704)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y

43. Li C, Chu S, Tan S, et al. Towards Higher Sensitivity of Mass Spectrometry: A Perspective From the Mass Analyzers. *Front Chem*. 2021;9:813359. doi:10.3389/fchem.2021.813359

44. Radionova A, Filippov I, Derrick PJ. In pursuit of resolution in time-of-flight mass spectrometry: A historical perspective: In Pursuit of Resolution in Tof Mass Spectrometry. *Mass Spec Rev*. 2016;35(6):738-757. doi:10.1002/mas.21470

45. Cotter RJ, Griffith W, Jelinek C. Tandem time-of-flight (TOF/TOF) mass spectrometry and the curved-field reflectron. *Journal of Chromatography B*. 2007;855(1):2-13. doi:10.1016/j.jchromb.2007.01.009

46. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003;376(7):952-965. doi:10.1007/s00216-003-2057-0

47. Nikolaev EN, Kostyukevich YI, Vladimirov GN. Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) mass spectrometry: Theory and simulations: FT ICR MS. *Mass Spec Rev*. 2016;35(2):219-258. doi:10.1002/mas.21422

48. Schermann JP. Experimental Methods. In: *Spectroscopy and Modeling of Biomolecular Building Blocks*. Elsevier; 2008:129-207. doi:10.1016/B978-044452708-0.50004-6

49. Niessen WMA. MS–MS and MSn. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier; 2017:936-941. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.05219-7

50. Campuzano IDG, Giles K. Historical, current and future developments of travelling wave ion mobility mass spectrometry: A personal perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019;120:115620. doi:10.1016/j.trac.2019.115620

51. Viehland LA. *Gaseous Ion Mobility, Diffusion, and Reaction*. Vol 105. Springer International Publishing; 2018. doi:10.1007/978-3-030-04494-7

52. Gabelica V, Marklund E. Fundamentals of ion mobility spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2018;42:51-59. doi:10.1016/j.cbpa.2017.10.022

53. Kanu AB, Dwivedi P, Tam M, Matz L, Hill HH. Ion mobility-mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2008;43(1):1-22. doi:10.1002/jms.1383

54. Flick TG, Campuzano IDG, Bartberger MD. Structural Resolution of 4-Substituted Proline Diastereomers with Ion Mobility Spectrometry via Alkali Metal Ion Cationization. *Anal Chem*. 2015;87(6):3300-3307. doi:10.1021/ac5043285

55. Giles K, Pringle SD, Worthington KR, Little D, Wildgoose JL, Bateman RH. Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18(20):2401-2414. doi:10.1002/rcm.1641

56. Roepstorff P, Fohlman J. Letter to the editors. *Biol Mass Spectrom*. 1984;11(11):601-601. doi:10.1002/bms.1200111109

57. Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biol Mass Spectrom*. 1988;16(1-12):99-111. doi:10.1002/bms.1200160119

58. Dongré AR, Jones JL, Somogyi Á, Wysocki VH. Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model. *J Am Chem Soc*. 1996;118(35):8365-8374. doi:10.1021/ja9542193

59. Wysocki VH, Resing KA, Zhang Q, Cheng G. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods*. 2005;35(3):211-222. doi:10.1016/j.ymeth.2004.08.013

60. Paizs B, Suhai S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom Rev*. 2005;24(4):508-548. doi:10.1002/mas.20024

61. Mueller DR, Eckersley M, Richter WJ. Hydrogen transfer reactions in the formation of “Y + 2” sequence ions from protonated peptides. *Org Mass Spectrom*. 1988;23(3):217-222. doi:10.1002/oms.1210230312

62. Johnson RS, Krylov D, Walsh KA. Proton mobility within electrosprayed peptide ions. *J Mass Spectrom*. 1995;30(2):386-387. doi:10.1002/jms.1190300224

63. Harrison AG, Yalcin T. Proton mobility in protonated amino acids and peptides. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1997;165-166:339-347. doi:10.1016/S0168-1176(97)00173-0

64. Huang Y, Triscari JM, Tseng GC, et al. Statistical Characterization of the Charge State and Residue Dependence of Low-Energy CID Peptide Dissociation Patterns. *Anal Chem*. 2005;77(18):5800-5813. doi:10.1021/ac0480949

65. Boyd R, Somogyi Á. The mobile proton hypothesis in fragmentation of protonated peptides: A perspective. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2010;21(8):1275-1278. doi:10.1016/j.jasms.2010.04.017

66. Lindh I, Griffiths WJ, Bergman T, Sjövall J. Charge-remote fragmentation of peptides derivatized with 4-aminonaphthalenesulphonic acid. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1994;8(10):797-803. doi:10.1002/rcm.1290081002

67. Liao PC, Huang ZH, Allison J. Charge remote fragmentation of peptides following attachment of a fixed positive charge: A matrix-assisted laser desorption/ionization postsource decay study. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1997;8(5):501-509. doi:10.1016/S1044-0305(97)81513-9

68. DeGraan-Weber N, Ward SA, Reilly JP. A Novel Triethylphosphonium Charge Tag on Peptides: Synthesis, Derivatization, and Fragmentation. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017;28(9):1889-1900. doi:10.1007/s13361-017-1694-z

69. Sonsmann G, Römer A, Schomburg D. Investigation of the influence of charge derivatization on the fragmentation of multiply protonated peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2002;13(1):47-58. doi:10.1016/S1044-0305(01)00328-2

70. Sadagopan N, Watson JT. Mass spectrometric evidence for mechanisms of fragmentation of charge-derivatized peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2001;12(4):399-409. doi:10.1016/S1044-0305(01)00211-2

71. Gu C, Tsaprailis G, Breci L, Wysocki VH. Selective Gas-Phase Cleavage at the Peptide Bond C-Terminal to Aspartic Acid in Fixed-Charge Derivatives of Asp-Containing Peptides. *Anal Chem*. 2000;72(23):5804-5813. doi:10.1021/ac000555c

72. Bythell BJ, Suhai S, Somogyi Á, Paizs B. Proton-Driven Amide Bond-Cleavage Pathways of Gas-Phase Peptide Ions Lacking Mobile Protons. *J Am Chem Soc*. 2009;131(39):14057-14065. doi:10.1021/ja903883z

73. Yu Wen, Vath JE, Huberty MC, Martin SA. Identification of the facile gas-phase cleavage of the Asp-Pro and Asp-Xxx peptide bonds in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 1993;65(21):3015-3023. doi:10.1021/ac00069a014

74. Chi A, Huttenhower C, Geer LY, et al. Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(7):2193-2198. doi:10.1073/pnas.0607084104

75. Reinders J, Sickmann A. State-of-the-art in phosphoproteomics. *Proteomics*. 2005;5(16):4052-4061. doi:10.1002/pmic.200401289

76. Lermyte F, Valkenborg D, Loo JA, Sobott F. Radical solutions: Principles and application of electron-based dissociation in mass spectrometry-based analysis of protein structure. *Mass Spec Rev*. 2018;37(6):750-771. doi:10.1002/mas.21560

77. Simons J. Chapter 8 Electron Transfer in Gaseous Positively Charged Peptides — Relation to Mass Spectrometry. In: *Annual Reports in Computational Chemistry*. Vol 5. Elsevier; 2009:163-183. doi:10.1016/S1574-1400(09)00508-8

78. Gunawardena HP, He M, Chrisman PA, et al. Electron Transfer versus Proton Transfer in Gas-Phase Ion/Ion Reactions of Polyprotonated Peptides. *J Am Chem Soc*. 2005;127(36):12627-12639. doi:10.1021/ja0526057

79. McLuckey SA, Stephenson JL. Ion/ion chemistry of high-mass multiply charged ions. *Mass Spectrom Rev*. 1998;17(6):369-407. doi:10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:6<369::AID-MAS1>3.0.CO;2-J

80. Pitteri SJ, McLuckey SA. Recent developments in the ion/ion chemistry of high-mass multiply charged ions. *Mass Spectrom Rev*. 2005;24(6):931-958. doi:10.1002/mas.20048

81. Wiesner J, Premsler T, Sickmann A. Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics*. 2008;8(21):4466-4483. doi:10.1002/pmic.200800329

82. Simons J. Mechanisms for S–S and N–Cα bond cleavage in peptide ECD and ETD mass spectrometry. *Chemical Physics Letters*. 2010;484(4-6):81-95. doi:10.1016/j.cplett.2009.10.062

83. Tureček F, Julian RR. Peptide Radicals and Cation Radicals in the Gas Phase. *Chem Rev*. 2013;113(8):6691-6733. doi:10.1021/cr400043s

84. Breuker K, Oh H, Lin C, Carpenter BK, McLafferty FW. Nonergodic and conformational control of the electron capture dissociation of protein cations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(39):14011-14016. doi:10.1073/pnas.0406095101

85. Zhurov KO, Fornelli L, Wodrich MD, Laskay ÜA, Tsybin YO. Principles of electron capture and transfer dissociation mass spectrometry applied to peptide and protein structure analysis. *Chem Soc Rev*. 2013;42(12):5014. doi:10.1039/c3cs35477f

86. Hudgins RR, Hakansson K, Quinn JP, Hendrickson C, Marshall AG. Fundamentals: Peptide M+ and MH+ Fragmentation Mechanisms. Presented at: 2002; 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL.

87. Chen X, Tureček F. The Arginine Anomaly: Arginine Radicals Are Poor Hydrogen Atom Donors in Electron Transfer Induced Dissociations. *J Am Chem Soc*. 2006;128(38):12520-12530. doi:10.1021/ja063676o

88. Panja S, Nielsen SB, Hvelplund P, Tureček F. Inverse hydrogen migration in arginine-containing peptide ions upon electron transfer. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2008;19(12):1726-1742. doi:10.1016/j.jasms.2008.08.001

89. Tureček F, Chung TW, Moss CL, et al. The Histidine Effect. Electron Transfer and Capture Cause Different Dissociations and Rearrangements of Histidine Peptide Cation-Radicals. *J Am Chem Soc*. 2010;132(31):10728-10740. doi:10.1021/ja907808h

90. Tureček F, Panja S, Wyer JA, et al. Carboxyl-Catalyzed Prototropic Rearrangements in Histidine Peptide Radicals upon Electron Transfer: Effects of Peptide Sequence and Conformation. *J Am Chem Soc*. 2009;131(45):16472-16487. doi:10.1021/ja9050229

91. Patriksson A, Adams C, Kjeldsen F, Raber J, van der Spoel D, Zubarev RA. Prediction of NCα bond cleavage frequencies in electron capture dissociation of Trp-cage dications by force-field molecular dynamics simulations. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2006;248(3):124-135. doi:10.1016/j.ijms.2005.11.018

92. Moore BN, Ly T, Julian RR. Radical Conversion and Migration in Electron Capture Dissociation. *J Am Chem Soc*. 2011;133(18):6997-7006. doi:10.1021/ja1096804

93. Wodrich MD, Zhurov KO, Vorobyev A, Ben Hamidane H, Corminboeuf C, Tsybin YO. Heterolytic N–C $_{\alpha}$ Bond Cleavage in Electron Capture and Transfer Dissociation of Peptide Cations. *J Phys Chem B*. 2012;116(35):10807-10815. doi:10.1021/jp306703f

94. Savitski MM, Nielsen ML, Zubarev RA. Side-Chain Losses in Electron Capture Dissociation To Improve Peptide Identification. *Anal Chem*. 2007;79(6):2296-2302. doi:10.1021/ac0619332

95. Cooper HJ, Hudgins RR, Håkansson K, Marshall AG. Characterization of amino acid side chain losses in electron capture dissociation. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2002;13(3):241-249. doi:10.1016/S1044-0305(01)00357-9

96. Kjeldsen F, Haselmann KF, Budnik BA, Jensen F, Zubarev RA. Dissociative capture of hot (3–13 eV) electrons by polypeptide polycations: an efficient process accompanied by secondary fragmentation. *Chemical Physics Letters*. 2002;356(3-4):201-206. doi:10.1016/S0009-2614(02)00149-5

97. Kjeldsen F, Haselmann KF, Sørensen ES, Zubarev RA. Distinguishing of Ile/Leu Amino Acid Residues in the PP3 Protein by (Hot) Electron Capture Dissociation in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2003;75(6):1267-1274. doi:10.1021/ac020422m

98. Eva Fung YM, Chan TWD. Experimental and theoretical investigations of the loss of amino acid side chains in electron capture dissociation of model peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2005;16(9):1523-1535. doi:10.1016/j.jasms.2005.05.001

99. Horn DM, Ge Y, McLafferty FW. Activated Ion Electron Capture Dissociation for Mass Spectral Sequencing of Larger (42 kDa) Proteins. *Anal Chem*. 2000;72(20):4778-4784. doi:10.1021/ac000494i

100. Breuker K, Oh H, Horn DM, Cerda BA, McLafferty FW. Detailed Unfolding and Folding of Gaseous Ubiquitin Ions Characterized by Electron Capture Dissociation. *J Am Chem Soc*. 2002;124(22):6407-6420. doi:10.1021/ja012267j

101. Swaney DL, Wenger CD, Thomson JA, Coon JJ. Human embryonic stem cell phosphoproteome revealed by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(4):995-1000. doi:10.1073/pnas.0811964106

102. Jensen CS, Wyer JA, Nielsen SB. Electron capture induced dissociation of dipeptide dications: where does the charge go? *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12(40):12961. doi:10.1039/c0cp00592d

103. Leymarie N, Costello CE, O'Connor PB. Electron Capture Dissociation Initiates a Free Radical Reaction Cascade. *J Am Chem Soc*. 2003;125(29):8949-8958. doi:10.1021/ja028831n

104. Zubarev RA, Kruger NA, Fridriksson EK, et al. Electron Capture Dissociation of Gaseous Multiply-Charged Proteins Is Favored at Disulfide Bonds and Other Sites of High Hydrogen Atom Affinity. *J Am Chem Soc*. 1999;121(12):2857-2862. doi:10.1021/ja981948k

105. Zubarev RA, Haselmann KF, Budnik B, Kjeldsen F, Jensen F. Towards An Understanding of the Mechanism of Electron-Capture Dissociation: A Historical Perspective and Modern Ideas. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*. 2002;8(5):337-349. doi:10.1255/ejms.517

106. Laskin J, Futrell JH, Chu IK. Is Dissociation of Peptide Radical Cations an Ergodic Process? *J Am Chem Soc*. 2007;129(31):9598-9599. doi:10.1021/ja073748r

107. Tureček F. NC $_{\alpha}$ Bond Dissociation Energies and Kinetics in Amide and Peptide Radicals. Is the Dissociation a Non-ergodic Process? *J Am Chem Soc*. 2003;125(19):5954-5963. doi:10.1021/ja021323t

108. Pepin R, Tureček F. Kinetic Ion Thermometers for Electron Transfer Dissociation. *J Phys Chem B*. 2015;119(7):2818-2826. doi:10.1021/jp510244d

109. Hughes C, Ma B, Lajoie GA. De Novo Sequencing Methods in Proteomics. In: Hubbard SJ, Jones AR, eds. *Proteome Bioinformatics*. Vol 604. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2010:105-121. doi:10.1007/978-1-60761-444-9_8

110. Eng JK, Fischer B, Grossmann J, MacCoss MJ. A Fast SEQUEST Cross Correlation Algorithm. *J Proteome Res*. 2008;7(10):4598-4602. doi:10.1021/pr800420s

111. Ma B, Zhang K, Hendrie C, et al. PEAKS: powerful software for peptidede novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(20):2337-2342. doi:10.1002/rcm.1196

112. Allmer J. Algorithms for the *de novo* sequencing of peptides from tandem mass spectra. *Expert Review of Proteomics*. 2011;8(5):645-657. doi:10.1586/epr.11.54

113. Lu B, Chen T. Algorithms for de novo peptide sequencing using tandem mass spectrometry. *Drug Discovery Today: BIOSILICO*. 2004;2(2):85-90. doi:10.1016/S1741-8364(04)02387-X

114. Ma B, Johnson R. De Novo Sequencing and Homology Searching. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(2):O111.014902. doi:10.1074/mcp.O111.014902

115. Klein J, Papadopoulos T, Mischak H, Mullen W. Comparison of CE-MS/MS and LC-MS/MS sequencing demonstrates significant complementarity in natural peptide identification in human urine: General. *ELECTROPHORESIS*. 2014;35(7):1060-1064. doi:10.1002/elps.201300327

116. Lian Z, Wang N, Tian Y, Huang L. Characterization of Synthetic Peptide Therapeutics Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: Challenges, Solutions, Pitfalls, and Future Perspectives. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2021;32(8):1852-1860. doi:10.1021/jasms.0c00479

117. Aguilar MI, Hearn MTW. [1] High-resolution reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. In: *Methods in Enzymology*. Vol 270. Elsevier; 1996:3-26. doi:10.1016/S0076-6879(96)70003-4

118. Sandra K, Moshir M, D'hondt F, Verleysen K, Kas K, Sandra P. Highly efficient peptide separations in proteomics. *Journal of Chromatography B*. 2008;866(1-2):48-63. doi:10.1016/j.jchromb.2007.10.034

119. Žuvela P, Skoczylas M, Jay Liu J, et al. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem Rev*. 2019;119(6):3674-3729. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00246

120.https://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Luna/Omega%20Polar%20C18?returnURL=/Products/Search/HPLC [Visité le 07/07/2022]. Presented at:

121. do Lago CL, Daniel D, Lopes FS, Cieslarová Z. Electrophoresis. In: *Chemical Analysis of Food*. Elsevier; 2020:499-523. doi:10.1016/B978-0-12-813266-1.00010-3

122. Hajba L. Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins. *Trends in Analytical Chemistry*. 2017;90:33-44. doi: 10.1016/j.trac.2017.02.013

123. Kašička V. Capillary electrophoresis of peptides. *Electrophoresis*. 1999;20(15-16):3084-3105. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991001)20:15/16<3084::AID-ELPS3084>3.0.CO;2-4

5) Liste Figures et Tableaux

Figure 1 : Principe de la synthèse d'un peptide amide sur support solide en stratégie Fmoc

Figure 2 : Représentation de l'amaZon speed, Bruker *(d'après la documentation de Bruker)*

Figure 3 : Représentation du Synapt G2-S, Waters *(d'après la documentation de Waters)*

Figure 4 : Représentation du rapifleX, Bruker (*d'après la documentation de chez Bruker)*

Figure 5 : Technique d'ionisation par électronébulisation (ESI)

Figure 6 : Technique d'ionisation MALDI

Figure 7 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem

Figure 8 : Principe de la dissociation suite à une activation ETD

Figure 9 : Utilisation de l'activation ETD sur le Synapt G2-S (Waters)

Figure 10 : Principe de l'activation ETD sur le Synapt G2-S (Waters)

Figure 11 : Représentation d'un piège à ions quadripolaire

Figure 12 : Représentation d'un l'analyseur QTof avec une géométrie en V ou W

Figure 13 : Représentation du mode Tof/Tof du rapifleX (Bruker)

Figure 14 : Représentation d'un analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier

Figure 15 : Principe de séparation en mobilité ionique selon la technologie TWIMS

Figure 16 : Nomenclature et structure d'ions fragments issus d'une fragmentation peptidique

Figure 17 : Mécanisme de fragmentation d'ions b et y selon le modèle du proton mobile

Figure 18 : Effet du résidu Lysine sur la fragmentation peptidique

Figure 19 : Effet du résidu Histidine sur la fragmentation peptidique

Figure 20 : Mécanisme du clivage sélectif des résidus Asp et Glu par l'intermédiaire d'un pont salin par Yu et al.

Figure 21 : Mécanisme de fragmentation de Cornell

Figure 22 : Formations d'ions $a^{\bullet}$ et y à partir du mécanisme de Cornell

Figure 23 : Mécanismes Washington-Utah de formation des ions c et $z^{\bullet}$

Figure 24 : Clivage en N-terminal de la proline sous activation ETD

Figure 25 : Principe de la chromatographie liquide

Figure 26 : Principe de l'électrophorèse capillaire

Tableau 1 : Masses et structures des résidus des 20 acides aminés protéinogéniques

Tableau 2 : Séquences synthétisées et rendements obtenus

Tableau 3 : Pertes de neutre observées issues d'ions moléculaires ou d'ions fragments

II. Chapitre 1

Dissociation de peptides amides et acides par différents agents d'ionisation

II. Dissociation de peptides amides et acides par différents agents d'ionisation

Afin de pouvoir travailler sur la détection de peptides amides dans des échantillons naturels par spectrométrie de masse, la dissociation de ces peptides a été étudiée en parallèle de celle des peptides acides, dans l'objectif de trouver des différences de fragmentation et ainsi repérer celles spécifiques aux peptides amides. Lorsque les deux séquences protonées sont engagées dans des expériences de spectrométrie de masse en tandem, la forme amide diffère uniquement de la forme acide par une perte d'ammoniac plus intense [1]. Nous nous sommes alors tournés vers des agents d'ionisation métalliques [2–5] afin d'induire des différences de dissociation du squelette peptidique selon la nature de l'extrémité C-terminale. Le sodium, métal alcalin déjà présent dans les solutions aqueuses, ainsi que le magnésium, métal alcalino-terreux facilement accessible, ont donc été testés comme agent d'ionisation introduisant respectivement une et deux charges. Les différences de fragmentation observées par cationisation au sodium sont décrites dans la publication ci-dessous alors que les résultats obtenus à partir d'ions adduits avec le magnésium sont explicités en fin de chapitre.

I) Dissociation de peptides amides sodés comme outil de séquençage *de novo*

a) Publication (JASMS, 2020, DOI : 10.1021/jasms.0c00269, JASMS, 2020)

Dissociation Pattern of Sodiated Amide Peptides as a Tool for De Novo Sequencing

Elodie Logerot, Christine Enjalbal*
IBMM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, 34095 Montpellier, France.

ABSTRACT: As part of De Novo sequencing issue, new approaches have to be found to sequence small natural peptides (<15-20 residues) which often present amino acid compositions inducing merely singly charged species that are thus quite difficult to thoroughly fragment under low energy activation conditions in MS/MS experiments. Cationization by alkali metals, like Na^+, followed by collision-induced dissociations (CID) or post-source metastable decay (PSD) of such cationized molecular ions were found to improve sequence coverage of native peptides through the formation of $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions issued from C-terminal residue exclusion. Concerned by the identification of peptides with a C-terminal amide, the fragmentation pattern of their sodiated molecular ions was investigated. In contrast to the peptides featuring unmodified C-termini, the C-terminal loss was not occurring, the amide function triggering different fragmentations pathways. Whereas several residue such as aspartic acid (D), glutamic acid (E), and arginine (R) influenced dissociation of fixed charge sodiated ions similarly to protonated peptides, more surprisingly, serine (S), threonine (T) and tyrosine (Y), which exhibit a hydroxyl function on their side chains, showed a very peculiar behavior that could help De Novo peptide sequencing.

Introduction

In proteomic research, numerous low energy MS/MS spectra of tryptic peptides are computationally assigned thanks to sequences deduced from protein databases. For peptides exhibiting some structural changes (such as post translational modifications, chemical substitutions due to reactivity

upon sample treatment or storage), or for unknown peptides issued from natural resources, the recorded MS/MS data are generally not sufficient to unambiguously propose a complete sequence.[1,2] To comprehensively interpret these spectra that cannot be compared to archived ones, new methods have to be found to obtain more information in a De Novo peptide sequencing approach.

To acquire complementary information to the ones deduced from the charge-driven low energy collision-induced dissociations (CID/HCD) of protonated peptides, many strategies can be implemented based on alternative ion activation methods such as photon-induced dissociations (IRMPD, UVPD), or electron-exchange dissociations (ECD, ETD, …). Nevertheless, despite the fact that these technologies were successfully applied to decipher peptide sequences,[3–6] they present two major drawbacks since they require, on one hand specific instruments not usually present in all laboratories and on the second hand sufficiently large peptides to produce multiply charged ions suitable for such fragmentations. Thus, a vast array of natural peptides displaying rather short sequences (< 15-20 amino acid long) or bearing very few basic residues producing exclusively singly charged species upon ionization are not amenable to these strategies.

To circumvent this situation, one can choose to keep on conventional CID/HCD MS/MS data acquisition, but recorded from activation of alkali-metal cationized peptides instead of the protonated forms. Indeed, if no desalting treatment is performed prior to MS analyses, the Na^+ adduct is very often detected with noticeable relative abundances. Compared with fragmentation pathways of monoprotonated peptides described by the well-known Mobile Proton Model (MPM),[7] the dissociation of sodiated peptides that was investigated many decades ago[8,9] needs a higher collisional activation and thus fragmentation routes are restricted. The case of neutral peptides with modified N- and C-termini were also successfully sequenced from the sodiated adducts.[10] In order to improve sequence coverage, other cationizing agents have been studied (Li^+, K^+, Ag^+)[9, 11–14] providing similar charge-remote fragmentations (CRF) and thus producing few but very informative sequence ions. As a matter of fact, fragmentation pathways of cationized peptides, whatever the metallic ionizing agent[13] are very similar to the ones obtained for peptide bond ruptures of monoprotonated peptides. However, one major difference is related to the production of a specific b-type sequence ion noted $[b_{n-1}+Na+OH]^+$, resulting from the exclusion of the C-terminal residue.[15] Such C-terminal residue exclusion can sometimes be also observed for monoprotonated peptides provided that they contain at least one basic residue such as arginine or histidine anywhere within their sequence to sequester the ionizing proton.[16] In contrast, this fragmentation path that is quite common for alkali-metal cationized peptides was found to ease sequencing of sodiated sequences.[17–19] Lin et al. still studied the influence of the C-terminal residue on the production of this ion,[20] gathering amino acids into several categories based on whether the $[b_{n-1}+Na+OH]+$ ion was the base peak of the MS/MS spectrum or not. In some cases, the fragment ions issued from the loss of two or three residues ($[b_{n-2}+Na+OH]^+$ and $[b_{n-3}+Na+OH]^+$ ions) can also be seen on the MS/MS spectra, but generally with a much lower relative intensity than the one resulting from the first exclusion. It is therefore not possible to find the entire sequence of the analyzed peptide deduced from these ions after a single MS/MS stage. Nevertheless, performing iterative dissociation experiments from the first $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ion can help to reconstruct the peptide. Indeed, it has been proven that MS^n experiences allowed sequencing alkali-metal cationized peptides by iterative dissociations of the released C-terminal truncated fragment ion.[20,21] Even if the main peak was not the $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ion of interest,

up to MS8 experiments were performed providing an informative sequence tag.[20,21] Moreover, sequencing thanks to this method also worked well for small cyclic peptides.[22]

Different mechanisms have been proposed to explain the production of these C-truncated ions. Although they involve different metal position onto the peptide sequence,[8,9,20,23] they are all reckoning on the nucleophilic attack of the C-terminal carboxylic acid group on the peptide bond linking the adjacent residue. Later on, such charge-remote fragmentation process was also depicted by Bythell and collaborators for the dissociation of the protonated and deprotonated molecular ion of the well-known model tripeptide arginine - aspartic acid - glycine (RDG), demonstrating the gas-phase formation of an anhydride transition state to produce the b_2+H_2O cation and anion.[24,25] Therefore, certainly due to the lower nucleophilicity of the amine compared to the hydroxyl group,[26] peptides presenting an amide function at the C-terminal end cannot generate upon CID MS/MS conditions C-truncated fragment ions issued from single or multiple residues exclusion as shown for protonated peptides[16] as well as for cationized ones.[17,27,28] Instead of retrieving these ions, losses of water and ammonia seem to be predominant solely from the cationized amide peptide precursor ion.[28] Similarly, the molecular ion of singly protonated amide peptide also exhibits an abundant fragment ion issued from the loss of ammonia allowing pinpointing such a modified sequence due to this feature dissociation path.[29] Despite the value of such information, De Novo sequencing of amide peptides, which has not been much studied so far to our knowledge, necessitates to fulfill more comprehensive peptide bond dissociations. Indeed, such amidation of the C-terminus inducing only a mass difference of one unit is difficult to unambiguously pinpoint because the same situation is encountered in the case of aspartic acid/asparagine or glutamic acid/glutamine substitution. We thus investigated the CID fragmentation behaviors of the sodiated ions of amide peptides only described under high energy conditions in FAB mass spectrometry.[18] We recorded multiple sets of MS/MS data from various mass spectrometers i.e. ESI-QTof (Synapt G2S, Waters), ESI-IT (Amazon speed, Bruker) under CID conditions and MALDI-Tof/Tof (Rapiflex, Bruker) with metastable decomposition, to obtain an optimum sequence coverage. As expected, although acidic and basic residues (D, E, R) altered the efficiency of the fragmentation output, extensive dissociations along the entire backbone were observed for such C-terminal modified peptides. In particular, the lack of C-terminal exclusion allowed comprehensive sequence coverage. Above all, a feature behavior was evidenced for hydroxyl-containing side-chains (serine, threonine and tyrosine residues) generally not involved in dissociation mechanisms.

Experimental

Peptides were prepared in the laboratory according to conventional solid-phase protocols and purified by preparative reversed-phase HPLC.[16,29] These peptides were dissolved in a mixture H_2O/CH_3CN (50/50, v/v) at 10^{-5} M and spiked with a NaCl solution (1:1 mole ratio). These samples were characterized on different mass spectrometers. ESI experiments were conducted on a Q-Tof mass spectrometer Synapt G2-S (Waters, Milford, CA, USA) and on an Ion Trap mass spectrometer AmaZon Speed (Bruker Daltonics, Wissembourg, France), both fitted with an electrospray ion source. On the other hand, MALDI mass spectra were recorded on a RapifleX TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) according to metastable dissociation (post-source decay (PSD)).

Synapt G2-S mass spectrometer

Data were acquired and processed by MassLynx software. Tof analyzer was calibrated at 1 acquisition/s from 50 to 2000 Da, with a resolution of 18000, in the positive ion mode using 0.1% formic acid in H_2O/CH_3CN (50/50, v/v). Ten acquisitions were summed to produce the final spectrum. Samples were infused into the ESI source at a flow rate of 5 µL/min. Voltages were set at +2 kV for the capillary and adjusted for the sampling cone. The source was heated at 80°C. Nitrogen constituted both nebulizing and desolvation gas. The latter was heated at 250°C. In MS/MS experiments, the second quadrupole analyzer was set in the r.f. mode using argon as collision gas. Collision energy varied depending on the samples to give optimal fragmentation (from 20 to 60 eV for monoprotonated peptides, from 40 to 70 eV for monosodiated peptides).

AmaZon Speed mass spectrometer

Data were acquired with TrapControl software and processed with DataAnalysis software. CID fragmentation was performed in positive Auto MS^n mode with Enhanced resolution mode. Analyzer was calibrated with a speed of 8.1 m/z /sec from 50 to 1200 Da, using 0.1% formic acid in H_2O/CH_3CN (50/50, v/v). From 10 to 50 acquisitions were summed to produce the final spectrum. Voltages were set at +2kV for the capillary and adjusted for the sampling cone. Nitrogen constituted both nebulizing and desolvation gas. For MS/MS experiments, samples were infused into the ESI source at a flow rate of 0.2 mL/min using FIA injections from liquid chromatographic system. Drying gas was heated at 200°C with a flow rate of 8.0 L/min. For MS^n experiments, syringe pump was used with a flow rate of 5 to 10 µL/min, with a desolvation gas heated at 200°C with a flow rate of 6 L/min. Pressure inside the ion trap was set at 5.6 10-6 mbar. MS/MS and MS^n experiments were conducted thanks to helium as collision gas. Resonance excitation varied depending on the samples.

Rapiflex mass spectrometer

Data were acquired with Flex Control software and processed with the Flex Analysis software. Matrix used to analyze all peptides was a solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) in H_2O/CH_3CN (70/30, v/v) at a concentration of 10 mg/mL. Samples were deposited with this matrix onto a stainless MALDI sample plate according to the dried droplet procedure (0.5 µL of each). After total evaporation of the solvent, the MADLI target was introduced into the mass spectrometer ion source. Reflectron mode was used for the TOF analyzer. A pulsed Nd:YAG laser at a wavelength of 355 nm was operated at a frequency of 100 Hz (MS data) or 200 Hz (MS/MS data) with a delayed extraction time of 30 ns. The laser fluence was adjusted for each studied peptide. Ions were detected over a mass range from m/z 100 to 2000. External calibration (disposed in the center of a 9-sample square on the MALDI plate) was performed with a commercial peptide mixture (calibration peptide standard 2, Bruker Daltonics, Wissembourg, France).

Results and Discussion

Several C-terminal amide peptides listed in Table 1 together with a few sequences with free C-termini used as references (See Table 1 in Supplemental Information), have been analyzed on various mass spectrometers fitted with different analyzer configurations (QqTof, IT, Tof/Tof) relevant to CID activation and metastable PSD decomposition. The aim of such studies is to reveal specific fragmentation behaviors of sodiated peptides related to the presence of a C-terminal amide function and their consequences on sequence coverage efficiency. Cationization was favored by adding NaCl solution (1:1 mole ratio) in the

studied peptide samples all referring to short or medium-size sequences, not necessarily C-terminated by arginine or lysine residues to cover all diversity of natural peptides that can be encountered in peptidomics rather than proteomics. The dissociation of both singly charged molecular ions, i.e. protonated ion $[M+H]^+$ (base peak) and cationized ion $[M+Na]^+$ (with relative intensities varying from 1% to 15% according to the sequences), were conducted to ascertain the complementarity of the two MS/MS data sets for the best sequence coverage but also to investigate the influence of some residues on dissociation behaviors and that can ease manual De Novo interpretation of CID MS/MS spectra.

The scarce dissociation paths in competition for sodiated peptides have the effect of simplifying the MS/MS spectra, as seen in Figure 1 recorded for a reference peptide terminated by an amide function (n°1 in Table 1). Except histidine at the C-terminus, the sequence is solely constituted by neutral residues that do not present any reactive function in their side chains (aliphatic residues). As discussed before, sodiated peptide dissociation produces similar ions as protonated peptides. The produced cationized fragment ions were

Table 1: Studied peptides categorized according to feature residues

N°	Sequence	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$
	Miscellaneous		
1	LAVGIAH	679,4250	701,3250
2	APIAGFV *	673,4032	695,3851
3	FPALVHI	795,4876	817,4695
4	GVLGHINAC *	882,4614	904,4414
5	GNGQIVFHAA	1012,5323	1034,4323
Aspartic acid / Glutamic acid			
6	FPC**D**AFA *	769,3338	791,2338
7	FPC**E**AFA *	783,3494	805,3294
8	FPA**D**LFA	779,4087	801,3905
9	FPA**E**LFA	793,4243	815,4061
10	**D**LAVGIA	657,3930	679,2930
11	LAVGIA**E**	671,4087	693,3087
12	*FPAFA**R**__D__*	*822,4257*	*844,4075*
13	FPA**D**HFA	803,3835	825,3654
14	*PFV**D**__R__VM*	*862,4604*	*884,4422*
15	AGV**D**NFG *	678,3206	700,3025
16	PYVACA**E**	751,3443	773,2443
17	FVAH**E**FA	819,4148	841,3148
18	VYAG**E**VAH *	844,4312	866,4130

N°	Sequence	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$
	Serine / Threonine		
19	LAVAIA**S** *	643,4137	665,3955
20	LAVAIA**T**	657,4294	679,3294
21	LAV**S**AIA	643,4137	665,3137
22	LAV**T**AIA *	657,4294	679,3294
23	**S**LAVAIA	643,4137	665,3137
24	**T**LAVAIA	657,4294	679,3294
25	GLAVF**S**G	649,3668	671,2668
26	*AFI**S**VGPLA__R__ *	*1029,6204*	*1051,6022*
	Tyrosine		
27	P**Y**AVAIA	703,4137	725,3137
28	P**Y**VACAM	753,3422	775,2422
29	**Y**FAVAIA	753,4294	775,3294
30	AQVNLP**Y**	803,4410	825,3410
31	P**Y**VACAW	808,3811	830,2811
	Arginine		
32	IWGLMA**R**	845,4818	867,3814
33	LAVAIA**R**	712,4828	734,3828
34	LMGVHCV**R**	913,4859	935,3859
35	FPALV**R**I	814,5298	836,4298
36	LAV**R**IAW	827,5250	849,4250
37	FPA**R**VGI *	758,4672	780,3672
38	*FPAFA**R**__D__*	*822,4257*	*844,4075*
39	*PFV__D__**R**VM*	*862,4604*	*884,4423*
40	*AFI__S__VGPLA**R** *	*1029,6204*	*1051,6022*

*Acid version available

Peptides in italics belong to two different categories

named according to the Roepstorff-Fohlmann nomenclature[30] completed by Biemann[31] used to describe sequence ions issued from the Mobile Proton Model.

As it is shown in Figure 1, the ionization agent which is a sodium cation ($[M+Na]^+$) replacing the usual proton ($[M+H]^+$) is clearly indicated in the fragment ion designation whereas the proton, that is implicitly included in the name of the fragment ion, was also noted as not present (+Na-H). For instance, b ions produced by the dissociation of a protonated molecular ion will give the corresponding $(b+Na-H)^+$ ions from the sodiated one. We found that peaks assignment was straightforward for sodiated peptide MS/MS spectra. Noteworthy, in addition to readable sequence ions, a non-sequence fragment ion issued by the

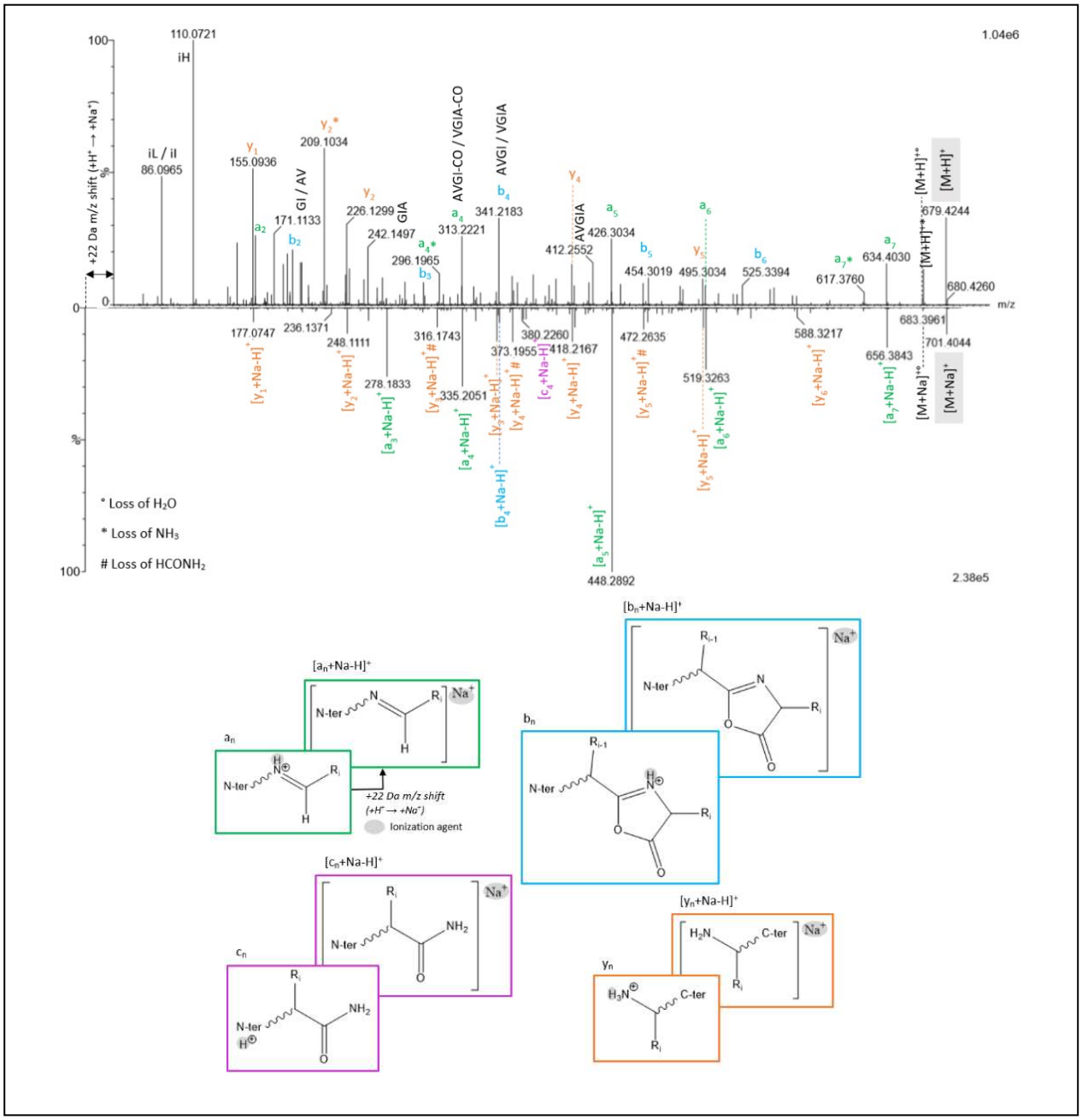


Figure 1 : MS/MS spectra from the Q-Tof instrument of monoprotonated (up) and monosodiated (down) LAVGIAH-NH_2 peptide and ion structures

loss of water was produced with a very low abundance, but still detectable, from both the protonated as well as the sodiated molecular ions. As displayed in Figure 1, the LAVGIAH-NH2 peptide that did not contain any residue possessing a carboxylic acid- or hydroxyl-containing lateral side-chain known to undergo such neutral loss underwent dehydration to produce the $[M+H-H_2O]^+$ fragment ion at m/z 661 (2.7 %, Fig 1-top spectrum) and the corresponding $[M+Na-H_2O]^+$ ion at m/z 683 (1.1%, bottom spectrum). It has been demonstrated in the literature that water loss can occur from an amide carbonyl of a protonated peptide backbone according to a retro-Ritter reaction.[32] Moreover, intramolecular nucleophilic attack from a reactive side-chain (such as histidine in the case LAVGIAH-NH_2 peptide of Figure 1), that can be favoured by a specific tautomeric form, has also been depicted.[33] Since the same relative abundances were observed for the dehydrated fragment ions issued from both protonated and sodiated molecular ions of some studied amide sequences, the same type of mechanisms can be hypothesized necessitating an additional intramolecular proton transfer, due to replacement of the ionizing proton by a metal ion.

Alternatively, another backbone-backbone cyclization to form a 5-membered ring intermediate, followed by proton transfer and 1,2 elimination of H_2O was also proposed and can be envisaged.[28] From the MS/MS data set recorded with the Q-Tof instrument, as shown in Figure 2 for the LAVGIAH-NH_2 peptide, almost 73% of the fragments were manually assigned for the sodiated sequence, contrary to 33% for the protonated one, based on the number of ions detected. Considering the total ion current (TIC), 70% of ion intensities were assigned, and all of these signals were sequence ions as it is shown in Figure 1, whereas only 47% of cumulated fragment ion abundances were recovered from the protonated molecular ion (29% of sequence ions and 18% of non-sequence ions). Signal to noise ratio (S/N) were higher when dissociating the sodiated peptide rendering the presence of ions with very low abundancies quite scarce compared to conventional MS/MS spectra of monoprotonated peptides. Noteworthy, a major difference was observed for the series of a ions, usually detected with low to moderate abundances, since they are mainly generated from N-terminal b sequence ions. In our case, the relative intensities of a-type sodiated ion signals were

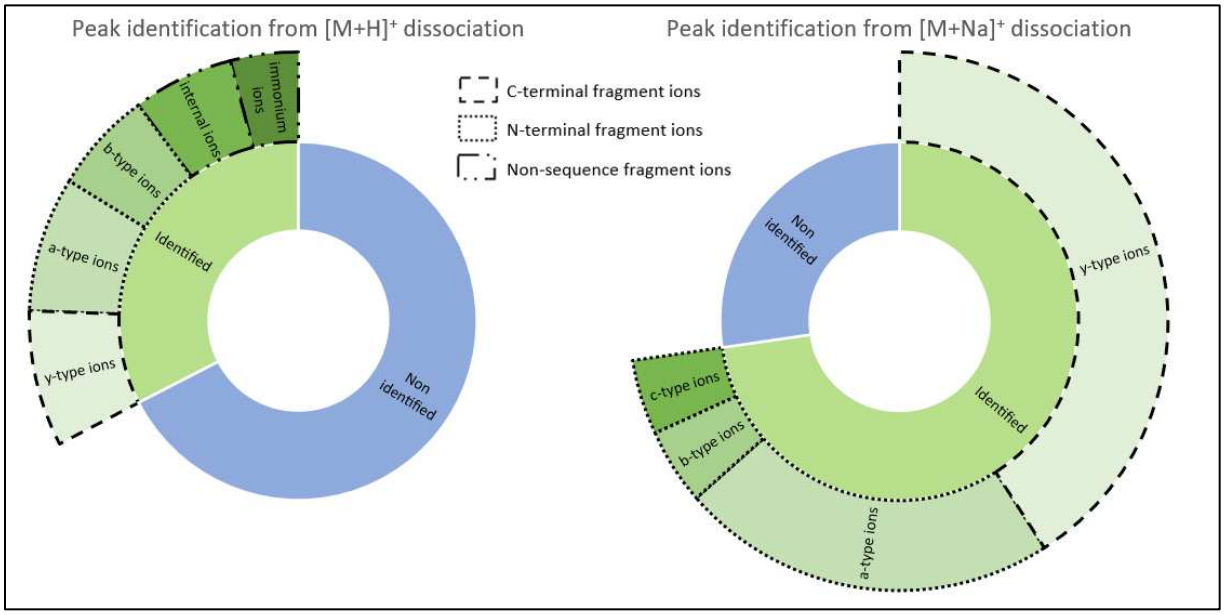


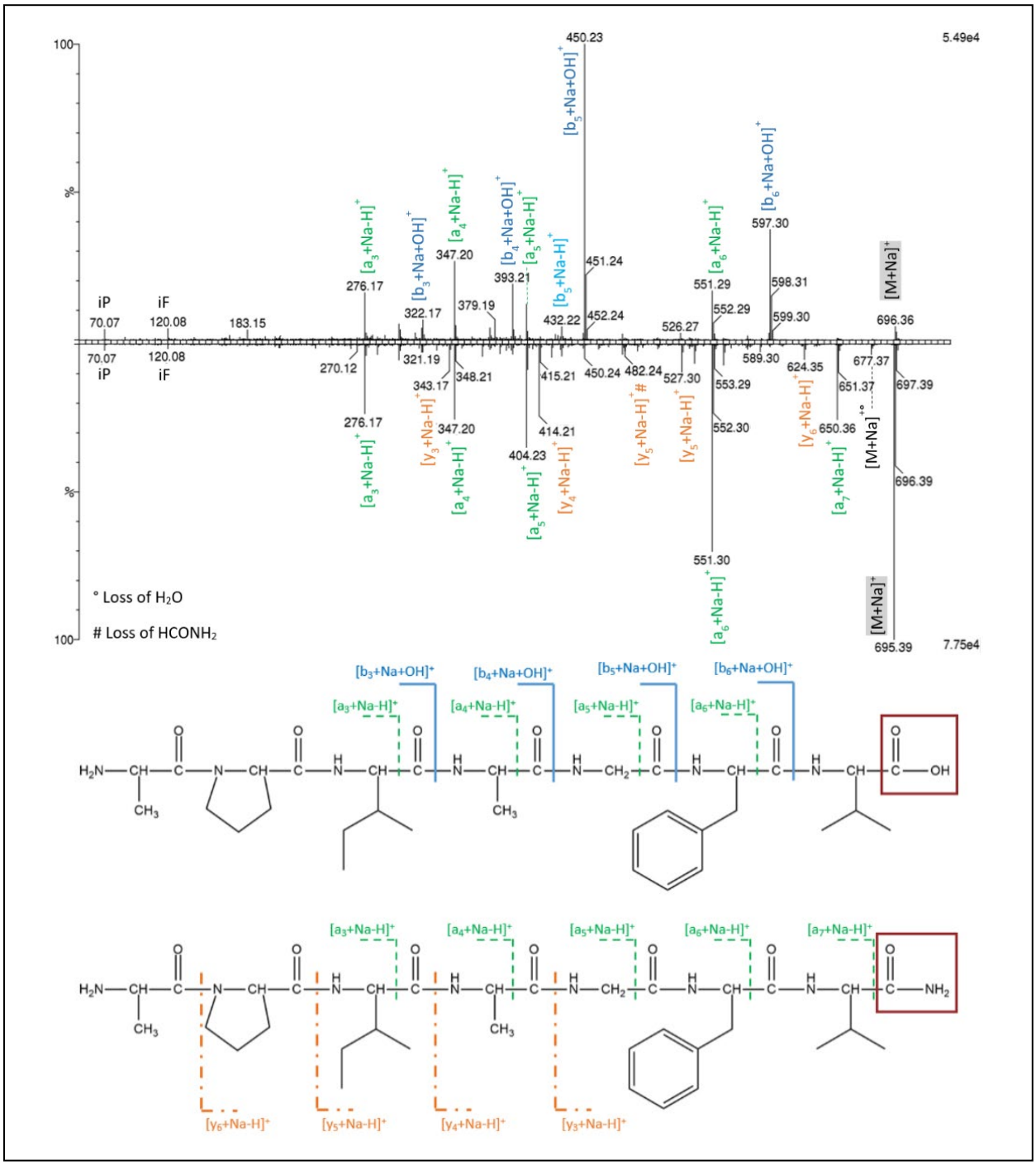
Figure 2 : Different ions produced by dissociation of monoprotonated and monosodiated LAVGIAH-NH2 peptide from data set recorded on the Q-Tof instrument

far increased indicating that these fragments may be directly formed from the cationized molecular ions.[10, 13] Similar results were obtained in MALDI Tof-Tof experiments. Actually, based on each data set, MS/MS experiments on the Q-Tof instrument provided 73.9% of peptide sequence coverage compared to 69.1% for the MALDI Tof-Tof equipment. This slight difference can come from the activation method (CID vs PSD) as already depicted.[34] Therefore, results from both mass spectrometers were gathered to obtain an optimal sequence coverage for each analyzed peptide. An illustration showing these complementary MS/MS data is provided in Supplemental Information (Figure S1) for the peptide LAVGIAE-NH_2 (n°11 in Table 1). Hence, moving from protonated to sodiated peptide dissociation greatly facilitated sequence reading but also notably increased sequence coverage. Due to restricted dissociation pathways, the observed fragmentations for the sodiated peptide concern mainly backbone ruptures producing sequence ions (expected y, a, b, but also c-type ions that are not usually produced in CID experiments). Whereas the dissociation of the protonated peptide triggers the formation of non-direct sequence ions as internal, scrambled and immonium ions, these competitive secondary fragmentation events were not accessible with such a low energy CID activation of a cationized precursor ion. Although internal ions that are constituted by adjacent residues can confirm sequence assignments, non-sequence ions may complicate data interpretation. As it is shown in Figure 2, dissociation of a sodiated amide peptide produce more y-type ions than N-terminal ions (represent 56% of produced ions, of which 33% result from neutral loss of y ions, based on number of produced ions).

As expected, no C-truncated ions were produced by fragmentation of the sodiated LAVGIAH-NH_2 peptide. Comparison of sodiated peptide dissociation from the C-terminal unmodified terminus and amide versions of the same sequence shows that despite the lack of $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ions in the case of amide peptides, sequence coverage can be achieved, as for example dissociation of APIAGFV peptide (n°2 in Table 1 - see Figure 3 and Figure S2 in Supplemental Information). Teesch et Adams[13] noticed that dissociation of amide peptides produced more y-type ions than unmodified ones. Indeed, fragmentation of the latter produced mainly N-terminal fragment ions (b-type and a-type ions), unlike the amide sequences which produced C-terminal fragment ions (y-type) in addition to N-terminal ions (a-type). These results showed that despite a C-terminal amide function, it was possible to obtain for few peptides a whole sequence coverage thanks to the combination of N-terminal and y-type ions.

However, since the output of dissociation efficiency is depending on the peptide amino acid composition and the specific influence of certain residues (proline, arginine, histidine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, …),[1,7] we scrutinized their potent effect in altering fragment ion production and subsequently affecting sequence coverage. As depicted in Table 1, the studied peptides were thus classified according to the residues that were found to interfere with the major peptide bond fragmentation pathway observed for amide sequences. When dissociating the 37 sodiated C-terminal amide sequences of Table 1, proline (P) and histidine (H) which usually produce respectively mainly y-type and internal ions from protonated peptides, did unexpectedly not have these effects from sodiated peptides and thus were considered as “neutral residues”. The corresponding sequences were gathered in the miscellaneous category serving as reference. In contrast, arginine (R), aspartic acid (D) and glutamic acid (E) influenced the dissociation output as anticipated, but also, much more surprisingly, the three amino acids that bear a hydroxyl function, i.e. on an aliphatic chain serine (S), threonine (T) or an aromatic ring tyrosine (Y), showed a very peculiar behavior. Three peptides (n° 38-40 in Table 1) consist of sequences presenting two of these residues (thus appearing twice in both categories) allowing to probe any

cumulative effect on fragmentation pattern. The major dissociation features related to the presence of these classes of residues are discussed below.



<u>Figure 3 :</u> Fragmentation of APIAGFV peptide in unmodified C-terminus (up) and amide (down) version with the Q-Tof instrument

Aspartic acid (D) and glutamic acid (E)

Aspartic acid and glutamic acid are already known to impact protonated peptide dissociation, by inducing a selective cleavage on their adjacent C-terminal peptide bond.[35,36] Indeed, this side-chain effect occurs in absence of a mobile proton through intramolecular rearrangement, equivalent to charge-remote fragmentations (CRF) attended with a fixed charge like Na^+. Aspartic acid was also the first residue found to have a fair impact on sodiated amide peptide dissociation. Tomer et al. showed it is possible to obtain $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions with a relative abundance below 25% from 3 amide peptides containing this residue at the C-terminal position.[18] Moreover, Lee et al. and Gu et al. showed that this residue within a unmodified C-terminus peptide sequence favors the cleavage of the adjacent peptide bond at its carbonyl position [36,37] thanks to the formation of a salt-bridge with the sodium ion between the acid function of the aspartic acid side chain and the peptide skeleton. $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ions were thus obtained as for protonated peptides.[7,38,39] From these observations, we wondered if it was possible to find $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions for amide peptides containing any residue with a carboxylic acid function like aspartic acid as well as glutamic acid residues, regardless of their position within the sequence.

Some amide peptides containing aspartic acid with a random localization within the sequence (not necessarily at the C-terminal position as studied by Tomer et al. [18]), with no other residue that could impact peptide dissociation, were thus investigated (n°6, 8, 10, 12-15 in Table 1). Among these 7 studied sequences (N°6, 8, 10, 12-15 in Table 1), two peptides (n°6 and 15) exhibited the C-truncated terminal ions (see Figure S3a/b in Supplemental Information).

Their relative abundances were under 20%, with signals fading from the first residue exclusion ($[b_{n-1}+Na+OH]^+$) up to larger sequence tag losses ($[b_{n-2}+Na+OH]^+$, $[b_{n-3}+Na+OH]^+$, $[b_{n-x}+Na+OH]^+$…). These results showed that the carboxylic acid function, whatever its position, at the C-terminal end for native peptide or in a pendant chain for amide sequences was able to trigger specific CRF mechanism. Although the intensities of C-truncated ions issued from aspartic acid-containing amide peptides were lower than the one obtained from a native sequence, but they can still be used for sequencing purposes performing iterative MS experiments if the first exclusion ion is abundant enough. The major peaks in MS/MS spectra of these peptides remained anyways $[y_n+Na-H]^+$ ions, as noticed by Lee and Gu.[36,37]

More surprisingly, obtaining $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ions from amide peptides containing a glutamic acid residue appeared to be easier than with aspartic acid, whatever its position in the sequence (5 peptides over 6 sequences displayed these ions: n°7, 11 and 16-18 in Table 1 - Figure S1 and S3c-f in Supplemental Information, only peptide N°9 was not providing the exclusion ion). Like PYVACAE-NH_2 or FVAHEFA-NH_2 (n°17 and 18 in Table 1), fragmentation of the sodiated molecular ion produced C-truncated ions from $[b_6+Na+OH]^+$ to $[b_3+Na+OH]^+$ ions, with decreasing relative abundances. Combination of those ions with recorded $[y_n+Na-H]^+$ ion series allowed complete sequence coverage solely from the MS/MS spectrum. Concerning the FPCEAFA-NH_2 peptide (entry n°7 in Table 1), an iterative MS^n experiment was achieved from $[b_6+Na+OH]^+$ to reach a MS^6 experiment (similar results as the unmodified C-terminus peptide, MS^3 to MS^6 data displayed for both sequences in Figure S4 in Supplemental information).

These experiments showed that it is possible to sequence amide peptide bearing an acidic residue anywhere in the sequence from the $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ion series, directly after a single fragmentation stage when they are extensively produced, otherwise after iterative dissociations. It seems that these ions are more frequently observed on MS/MS spectra when peptide contains a glutamic residue rather than an

aspartic acid maybe due to steric constraints induced by the shorter side-chain with one carbon atom (D) instead of two (E) joining the peptide backbone Cα position to the carboxylic acid group.

Serine (S), Threonine (T) and Tyrosine (Y)

Serine and threonine residues own a hydroxyl function on their aliphatic side chain, easily protonable, and which could interact with a sodium cation. The particularity of peptides containing one of these two residues is the abundant neutral loss from their side chains, especially water from protonated peptides.[40] Regarding sodiated peptides, a loss of formaldehyde (30 Da) or acetaldehyde (44 Da) issued from serine or threonine side chain, respectively, was observed on the MS/MS spectra occurring from the molecular ion as well as from fragment ions as described by Wang et al.[41] In the same manner, Neta et al. also noticed these losses of 30 or 44 Da when dissociating protonated peptides containing either a serine or threonine at the C-terminal position, respectively.[42] Amide peptides containing aliphatic residues with only one serine or threonine residue with different locations (C-terminal, N-terminal or anywhere within the sequence) were investigated to probe the fragmentation behaviors of their sodiated ions.

First of all, despite the observations made by Wang and Neta [41,42] regarding the very low relative abundances (under 1%) of the neutral losses (30/44 Da) from $[M+H]^+$ or $[M+Na]^+$, we saw very high signal intensities for these fragment ions that sometimes even corresponded to the main peak of MS/MS spectra. In that sense, the presence of a C-terminal amide function seems to promote these fragmentation pathways. Considering this, the neutral loss of 30 or 44 Da could be an indicator of the presence of serine or threonine in the amide peptide engaged in De Novo sequencing. Thanks to MS^n experiments, it could also be possible to determine the position of the residue since this neutral loss can occur from fragment ions and not only from the molecular ion.

Moreover, peptides n°19 to n°26 in Table 1 unexpectedly produced $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions despite the amide C-terminal function that was found to prevent such dissociation routes (see Figure S5 in Supplemental Information). These ions were found on the MS/MS spectra even if their relative intensities were generally under 20%, but abundant enough to be well detected above the background. Still, for some corresponding unmodified C-terminus peptides studied as a comparison, the $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions were detected with much higher relative abundances: for instance, $[b_6+Na+OH]^+$ ion of peptide LAVAIAS (entry n°19 in Table 1) reached a relative abundance of 70%. These results meant that the hydroxyl function could participate to intramolecular nucleophilic attack in the same manner as the carboxylic acid group produces C-terminal residue exclusion as previously discussed. The relative abundances of these $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ions of interest were seemingly influenced by the position of the S or T residue within the sequence. If S or T residue was at the C-terminus (n°19 and 20 in Table 1), at the N-terminus (n°23 and 24 in Table 1) or within the sequence (n°21 and 22 in Table 1), the C-terminal exclusion was always observed but with various efficiency as indicated by the variations of $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ion relative intensities (see Figure S6 in Supplemental Information). Moreover, just like peptides containing D or E residues, it was then possible to select the first C-terminal exclusion ion to realize iterative MS^n experiments. For example, $[b_6+Na+OH]^+$ ion of TLAVAIA-NH_2 peptide (entry n°24 in Table 1) with a relative abundance of 15% has been successively dissociated to reach MS^5 experiment providing $[b_3+Na+OH]^+$ ion leading to a sequence coverage of 67% deduced only from $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions. The entire sequence coverage was retrieved thanks to this set of MS^n data combined with $[y_n+Na-H]^+$ and $[a_n+Na-H]^+$ ions present on the MS/MS spectrum.

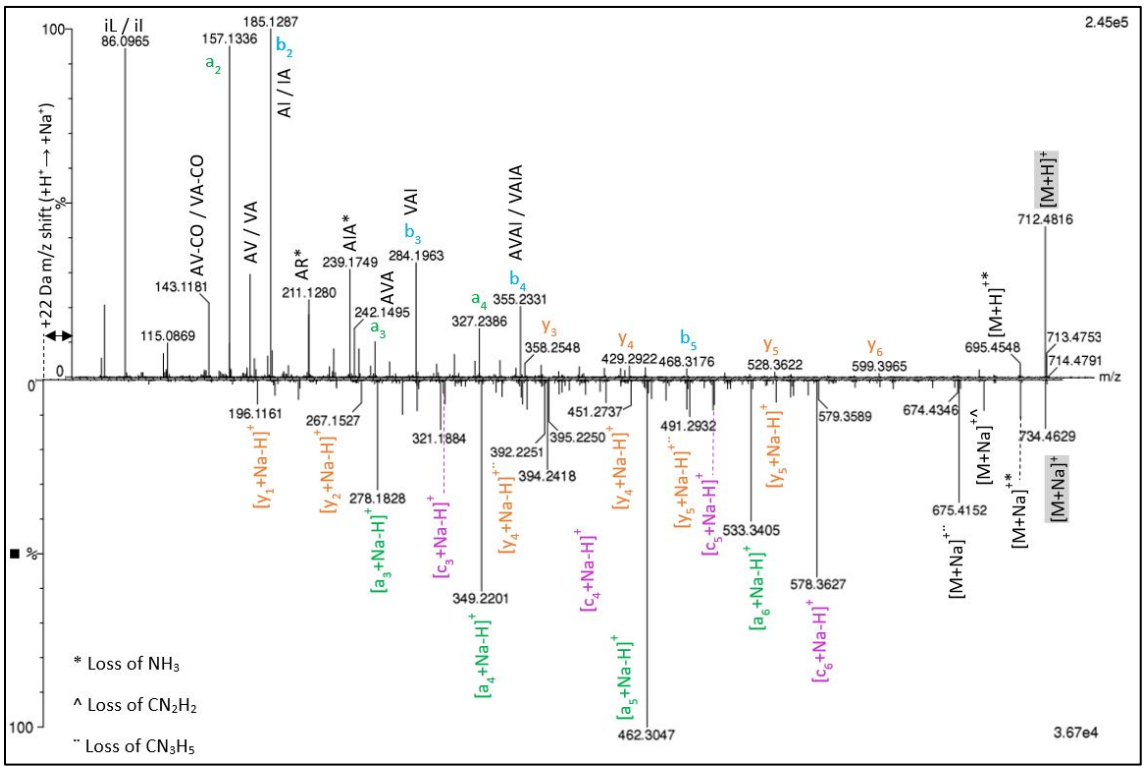
Because of the evidenced feature fragmentations due to serine and threonine, tyrosine-containing peptides were also studied since this residue exhibits a hydroxyl group on its side chain, but as a phenolic function. Thus, five peptides (n°27 to n°31 in Table 1) containing tyrosine, surrounded by residues not known to have a specific impact on fragmentation, were investigated (see Figure S5 in Supplemental Information). Curiously, $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ions were produced in MS/MS experiments and more especially for peptides n°28 and n°29 which dissociated to give nearly the entire series issued from the exclusion path (from $[b_6+Na+OH]^+$ to $[b_3+Na+OH]^+$ ions), again with low relative abundances (under 25%). For the studied peptides which presented a $[b_6+Na+OH]^+$ ion sufficiently abundant, MS^n experiments were carried out with the ion trap (peptides n°27 to n°29). These experiments didn't let the opportunity to recover the entire peptide sequences solely from $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ions since iterative fragmentations were achieved up to MS^4 experiment (allowing to reach at best $[b_4+Na+OH]^+$ ion - see Figure S7 in Supplemental Information). Nevertheless, these results attested that at least one hydroxyl function present on an aliphatic or aromatic side chain of an amide peptide sequence is sufficient to get ions derived from C-terminal residue exclusion.

Despite their low relative abundances (generally less than 30%), these exclusion ions deserve credit for being present on MS/MS spectra of serine-, threonine- or tyrosine-containing amide peptides. Though, the fragments issued from iterative dissociations of these valuable $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions together with $[y_n+Na-H]^+$ ions, which belong to a complementary series, ease peptide sequencing. Thus, this unexpected behavior, in competition with anticipated backbone cleavages of amide sequences, allows ascertaining the presence of serine, threonine or tyrosine if the sodiated molecular ion is engaged in CID or PSD experiments and helps for improving sequence coverage through iterative dissociations of feature exclusion ions.

Arginine (R)

The arginine residue is known to complicate dissociation of monoprotonated peptide because of its basicity, and thus its ability to sequester the mobile proton needed to fragment peptide.[43] Sodiation of peptide permits to avoid this pre-dissociation event. Grese et al.[17] noticed that C-terminal arginine residue inhibited the production of $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions for unmodified C-terminus peptides (or their relative abundances were very low), $[b_n+Na-H]^+$ ions being preferentially produced. When this residue was moved from the C-terminal position, more C-terminal exclusion ions were produced. As shown in Figure 4, we checked that dissociation of a sodiated peptide (n°33 in Table 1) provided much higher relative abundance of sequence ions than for the monoprotonated one. In particular, arginine is used to affect dissociation yield of the monoprotonated peptide by hampering the cleavage of few peptide bonds thus inducing a gap in the sequence as seen on Figure 4. Fragmentation of the sodiated peptide avoid the discrepancy in signal intensities along the sequence.

As we could expect from the results gathered with the other studied residues, dissociation of amide peptides containing only arginine residue didn't produce C-truncated ions. Surprisingly, these peptides gave c-type ions with noticeable relative abundances, whereas they are generally produced with EXD-type activations and more scarcely under CID activation like here. For instance, such ions were identified on CID spectra of protonated peptides containing glutamine (Q) or lysine (K) residues.[44, 45] Moreover, production of c-type ions under CID activation was also studied for protonated peptides presenting a N-terminal fixed charge. A Mc Lafferty type rearrangement was proposed to explain the formation of c-type



<u>Figure 4 :</u> Spectra of monoprotonated (up) and monosodiated (down) LAVAIAR-NH_2 peptide recorded with the Q-Tof instrument

ions from the precursor ion or from b-type ions.[46] A similar mechanism could explain the production of these c-type ions from the studied sodiated peptides, since the Na^+ ionizing agent is also a fixed charge. Furthermore, we questioned if the basicity of arginine had a direct impact on the production of these ions. Indeed, peptides containing other basic residues, in particular histidine (n°1, 3, 4, 5, 13, 17 and 18 in Table 1), which is following arginine in the gas-phase basicity scale, also produced c-type ions (see Figure S8 in Supplemental Information). Based on the total ion current, theses c-ions represented 2.71% and 0.55% for amide peptides containing arginine and histidine, respectively. The investigation were not pursued further histidine (<1%). Teesch et Adams[13] who have dissociated one sodiated peptide containing a C-terminal arginine residue (HLGLAR) didn't notice c-type ions with Fast Atom Bombardment (FAB) and collisional activations. Thus, we examined if the peptide C-terminal amide function can have an impact on production of these c-type ions for arginine-containing sequences. For FPARVGI peptide (n°37 in Table 1), for which the unmodified C-terminus version was also analyzed, c-type ions were produced for both forms, but $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ions were not produced, even with an acid C-terminal function which differs from literature data. For AFISVGPLAR peptide (n°41 in Table 1), c-type ions were only produced for the amide peptide, but $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ions were produced by both amide and unmodified C-terminus peptides (a contribution of the serine residue allowing also to produce these ions for the amide peptide as discussed before). Moreover, fragmentation of two peptides containing simultaneously aspartic acid and arginine (n°38 and 39 in Table 1) didn't produce C-truncated ions, contrary to the previous peptide containing a serine and an arginine residues suggesting that in all competitive fragmentation pathways, the serine effect was actually more pronounced than the one issued from aspartic acid.

Finally, we also observed more important neutral losses from arginine side chain of sodiated peptides (loss of carbodiimide (42 Da) and guanidinium (59 Da) than from the monoprotonated molecular ion, as found for amide peptides displaying serine and threonine residues. Pairing these neutral losses with the detection of c-type ions could help to state the presence of an arginine in a peptide sequence for De Novo sequencing.

Conclusion

First of all, the restricted charge remote fragmentation competitive paths recorded for singly charged cationized ions under low energy collision-induced dissociation considerably simplified data assignment, particularly valuable in the case of De Novo sequencing. Indeed, short peptides bearing a C-terminal amide function, a relatively common occurrence of biologically active peptides, delivered more sequence information from their sodium adducts than from the protonated species. Noteworthy, a-type ions were produced with far increased relative abundances. Second, sodiated backbone amide peptides were found to exhibit specific CID behaviors that rendered this MS/MS strategy particularly appreciated to identify such subtle modification. In average, a whole sequence coverage was obtained for 59% of sodiated amide peptides (against 16% for protonated ones) and 30% for unmodified C-terminus sodiated peptides (compared to 20% for protonated ones). Very interestingly, the extended production of C-terminal amide fragment ions compared to the corresponding unmodified C-terminus ones allowed rapidly decoding the sequence from one terminus. But, noteworthy, some residues like aspartic acid, glutamic acid, and unusually serine, threonine, as well as tyrosine triggered for amide peptides the formation of $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ions, which are generally only found on MS/MS spectra of unmodified C-terminus peptides. The presence of these N-terminal ions issued from C-terminal residue exclusion enabled to recover complementary sequence information thanks to iterative MS^n experiments. Similarly, the arginine residue that is well-known to hamper monoprotonated peptide fragmentation, also influenced sodiated peptide dissociation, but in an unexpected way by producing c-type ions, which generally required more energetic activations. Finally, the evidenced particular backbone dissociation pattern of sodiated amide peptides bearing D, E, S, T, Y and R residues, associated with their related side chain neutral losses, provided a very useful tool for efficient De Novo MS/MS spectra interpretation of such tricky modified peptides.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Unmodified C-terminus peptide sequences; MS/MS spectra of protonated and sodiated LAVGIAE-NH_2 peptide recorded on the three different mass spectrometers; MS/MS spectrum of protonated APIAGFV-NH_2 peptide; MS/MS spectra of sodiated Asp- or Glu- containing peptides; MS^n experiments from $[b_6+Na+OH]^+$ ion of FPCEAFA and FPCEAFA-NH_2 peptides; MS/MS spectra of Ser-, Thr- or Tyr- containing peptides; figures representing $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ion intensities from MS/MS experiments of Ser or Thr containing peptides; MS^n iterative experiments from $[b_6+Na+OH]^+$ ion of YFAVAIA-NH_2 peptide; MS/MS spectra of Arg- or His- ended and internal Arg- or His- containing peptides are available in Supplemental Information.

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author
* Tel: +33 (0)4 67 14 38 19.
E-mail: christine.enjalbal@umontpellier.fr
Author Contributions
The manuscript was written through contributions of all authors.
All authors have given approval to the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT
We thank Dr. L. Mouls and Dr. N. Shenar for peptide synthesis and purification.

REFERENCES

1. Medzihradszky, K.F., Chalkley, R.J.: Lessons in de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry: LESSONS IN DE NOVO PEPTIDE SEQUENCING. Mass Spectrom. Rev. 34, 43–63 (2015). https://doi.org/10.1002/mas.21406
2. Addona, T., Clauser, K.: De Novo Peptide Sequencing via Manual Interpretation of MS/MS Spectra. Curr. Protoc. Protein Sci. 27, (2002). https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1611s27
3. Robotham, S.A., Kluwe, C., Cannon, J.R., Ellington, A., Brodbelt, J.S.: De Novo Sequencing of Peptides Using Selective 351 nm Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry. Anal. Chem. 85, 9832–9838 (2013). https://doi.org/10.1021/ac402309h
4. Madsen, J.A., Brodbelt, J.S.: Comparison of infrared multiphoton dissociation and collision-induced dissociation of supercharged peptides in ion traps. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 20, 349–358 (2009). https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.10.018
5. Horton, A.P., Robotham, S.A., Cannon, J.R., Holden, D.D., Marcotte, E.M., Brodbelt, J.S.: Comprehensive de Novo Peptide Sequencing from MS/MS Pairs Generated through Complementary Collision Induced Dissociation and 351 nm Ultraviolet Photodissociation. Anal. Chem. 89, 3747–3753 (2017). https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00130
6. Riley, N.M., Coon, J.J.: The Role of Electron Transfer Dissociation in Modern Proteomics. Anal. Chem. 90, 40–64 (2018). https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04810
7. Paizs, B., Suhai, S.: Fragmentation pathways of protonated peptides. Mass Spectrom. Rev. 24, 508–548 (2005). https://doi.org/10.1002/mas.20024
8. Mallis, L.M., Russell, D.H.: Fast-atom-bombardment-tandem mass spectrometry studies of alkali-metal ions of small peptides. Anal. Chem. 58, 1076–1080 (1986). https://doi.org/10.1021/ac00297a021
9. Tang, Xuejun., Ens, Werner., Standing, K.G., Westmore, J.B.: Daughter ion mass spectra from cationized molecules of small oligopeptides in a reflecting time-of-flight mass spectrometer. Anal. Chem. 60, 1791–1799 (1988). https://doi.org/10.1021/ac00168a029
10. Sabareesh, V., Balaram, P.: Tandem electrospray mass spectrometric studies of proton and sodium ion adducts of neutral peptides with modified N- and C-termini: synthetic model peptides and microheterogeneous peptaibol antibiotics. Rapid Commun. Mass Spectrom. 20, 618–628 (2006). https://doi.org/10.1002/rcm.2349

11. Röllgen, F.W., Borchers, F., Giessmann, U., Levsen, K.: Collisional activation of ions formed by [Li]+ ion attachment. Org. Mass Spectrom. 12, 541–543 (1977). https://doi.org/10.1002/oms.1210120903
12. Cody, R.B., Amster, I.J., McLafferty, F.W.: Peptide mixture sequencing by tandem Fourier-transform mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 6367–6370 (1985). https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6367
13. Teesch, L.M., Adams, J.: Fragmentations of gas-phase complexes between alkali metal ions and peptides: metal ion binding to carbonyl oxygens and other neutral functional groups. J. Am. Chem. Soc. 113, 812–820 (1991). https://doi.org/10.1021/ja00003a013
14. Anbalagan, V., Perera, B.A., Silva, A.T.M., Gallardo, A.L., Barber, M., Barr, J.M., Terkarli, S.M., Talaty, E.R., Van Stipdonk, M.J.: Formation of [bn + 17 + Ag]+ product ions from Ag+ cationized native and acetylated peptides. J. Mass Spectrom. 37, 910–926 (2002). https://doi.org/10.1002/jms.350
15. Tang, X.-J., Thibault, P., Boyd, R.K.: Fragmentation reactions of singly and doubly charged alkali metal ion-peptide complexes: A reaction specific to C-terminal arginine residues. Org. Mass Spectrom. 28, 1047–1052 (1993). https://doi.org/10.1002/oms.1210281012
16. Dupré, M., Cantel, S., Martinez, J., Enjalbal, C.: Occurrence of C-Terminal Residue Exclusion in Peptide Fragmentation by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23, 330–346 (2012). https://doi.org/10.1007/s13361-011-0254-1
17. Grese, R.P., Cerny, R.L., Gross, M.L.: Metal ion-peptide interactions in the gas phase: a tandem mass spectrometry study of alkali metal cationized peptides. J. Am. Chem. Soc. 111, 2835–2842 (1989). https://doi.org/10.1021/ja00190a015
18. Tomer, K.B., Deterding, L.J., Guenat, C.: Collisionally activated dissociation spectra of sodiated peptides and peptide amides. Biol. Mass Spectrom. 20, 121–129 (1991). https://doi.org/10.1002/bms.1200200305
19. Newton, K.A., McLuckey, S.A.: Generation and manipulation of sodium cationized peptides in the gas phase. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15, 607–615 (2004). https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.12.014
20. Lin, T., Payne, A.H., Glish, G.L.: Dissociation pathways of alkali-cationized peptides: Opportunities for C-terminal peptide sequencing. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 12, 497–504 (2001). https://doi.org/10.1016/S1044-0305(01)00234-3
21. Lin, T., Glish, G.L.: C-Terminal Peptide Sequencing via Multistage Mass Spectrometry. Anal. Chem. 70, 5162–5165 (1998). https://doi.org/10.1021/ac980823v
22. Ngoka, L.C.M., Gross, M.L.: Location of alkali metal binding sites in endothelin A selective receptor antagonists, cyclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu) and cyclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Ile-Leu), from multistep collisionally activated decompositions. J Mass Spectrom. 35, 265–276 (2000). doi:10.1002/(SICI)1096-9888(200002)35:2<265::AID-JMS946
23. Renner, D., Spiteller, G.: Linked scan investigation of peptide degradation initiated by liquid secondary ion mass spectrometry. Biol. Mass Spectrom. 15, 75–77 (1988). https://doi.org/10.1002/bms.1200150204
24. Bythell, B.J., Csonka, I.P., Suhai, S., Barofsky, D.F., Paizs, B.: Gas-Phase Structure and Fragmentation Pathways of Singly Protonated Peptides with N-Terminal Arginine. J. Phys. Chem. B. 114, 15092–15105 (2010). https://doi.org/10.1021/jp108452y

25. Guan, S., Rabus, J.M., Maître, P., Bythell, B.J.: Gas-Phase Dissociation Chemistry of Deprotonated RGD. J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2020). https://doi.org/10.1021/jasms.0c00074
26. Harrison, A.G.: The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides. Mass Spectrometry Reviews, 16, 201–217 (1997). doi:10.1002/(SICI)1098-2787(1997)16:4<201::AID-MAS3
27. Teesch, L.M., Orlando, R.C., Adams, J.: Location of the alkali metal ion in gas-phase peptide complexes. J. Am. Chem. Soc. 113, 3668–3675 (1991). https://doi.org/10.1021/ja00010a006
28. Anbalagan, V., Patel, J.N., Niyakorn, G., Van Stipdonk, M.J.: McLafferty-type rearrangement in the collision-induced dissociation of Li+, Na+ and Ag+ cationized esters of N-acetylated peptides. Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 291–300 (2003). https://doi.org/10.1002/rcm.912
29. Mouls, L., Subra, G., Aubagnac, J.-L., Martinez, J., Enjalbal, C.: Tandem mass spectrometry of amidated peptides. J. Mass Spectrom. 41, 1470–1483 (2006). https://doi.org/10.1002/jms.1118
30. Roepstorff, P., Fohlman, J.: Letter to the editors. Biol. Mass Spectrom. 11, 601–601 (1984). https://doi.org/10.1002/bms.1200111109
31. Biemann, K.: Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. Biol. Mass Spectrom. 16, 99–111 (1988). https://doi.org/10.1002/bms.1200160119
32. Reid, G.E., Simpson, R.J., O'Hair, R.A.J.: A mass spectrometric and ab initio study of the pathways for dehydration of simple glycine and cysteine-containing peptide [M+H]+ ions. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 9, 945–956 (1998). https://doi.org/10.1016/S1044-0305(98)00068-3
33. Farrugia, J.M., O'Hair, R.A.J., Reid, G.E.: Do all b2 ions have oxazolone structures? Multistage mass spectrometry and ab initio studies on protonated N-acyl amino acid methyl ester model systems. Int. J. Mass Spectrom. 210–211, 71–87 (2001). https://doi.org/10.1016/S1387-3806(01)00421-3
34. Shenar, N., Sommerer, N., Martinez, J., Enjalbal, C.: Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides. J. Mass Spectrom. 44, 621–632 (2009). https://doi.org/10.1002/jms.1535
35. Rožman, M.: Aspartic acid side chain effect—Experimental and theoretical insight. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 18, 121–127 (2007). https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.09.009
36. Lee, S.-W., Kim, H.S., Beauchamp, J.L.: Salt Bridge Chemistry Applied to Gas-Phase Peptide Sequencing: Selective Fragmentation of Sodiated Gas-Phase Peptide Ions Adjacent to Aspartic Acid Residues. J. Am. Chem. Soc. 120, 3188–3195 (1998). https://doi.org/10.1021/ja973467r
37. Gu, C., Tsaprailis, G., Breci, L., Wysocki, V.H.: Selective Gas-Phase Cleavage at the Peptide Bond C-Terminal to Aspartic Acid in Fixed-Charge Derivatives of Asp-Containing Peptides. Anal. Chem. 72, 5804–5813 (2000). https://doi.org/10.1021/ac000555c
38. Summerfield, S.G., Whiting, A., Gaskell, S.J.: Intra-ionic interactions in electrosprayed peptide ions. Int. J. Mass Spectrom. Ion Process. 162, 149–161 (1997). https://doi.org/10.1016/S0168-1176(96)04512-0
39. Yu, Wen., Vath, J.E., Huberty, M.C., Martin, S.A.: Identification of the facile gas-phase cleavage of the Asp-Pro and Asp-Xxx peptide bonds in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. Anal. Chem. 65, 3015–3023 (1993). https://doi.org/10.1021/ac00069a014
40. Mouls, L., Aubagnac, J.-L., Martinez, J., Enjalbal, C.: Low Energy Peptide Fragmentations in an ESI-Q-Tof Type Mass Spectrometer. J. Proteome Res. 6, 1378–1391 (2007). https://doi.org/10.1021/pr060574o

41. Wang, H., Wang, B., Wei, Z., Cao, Y., Guan, X., Guo, X.: Characteristic neutral loss of CH3CHO from Thr-containing sodium-associated peptides: Neutral loss from sodium-associated peptides. J. Mass Spectrom. 50, 488–494 (2015). https://doi.org/10.1002/jms.3555
42. Neta, P., Pu, Q.-L., Yang, X., Stein, S.E.: Consecutive neutral losses of H2O and C2H4O from N-Terminal Thr–Thr and Thr–Ser in collision-induced dissociation of protonated peptides. Int. J. Mass Spectrom. 267, 295–301 (2007). https://doi.org/10.1016/j.ijms.2007.02.055
43. Tabb, D.L., Huang, Y., Wysocki, V.H., Yates, J.R.: Influence of Basic Residue Content on Fragment Ion Peak Intensities in Low-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides. Anal. Chem. 76, 1243–1248 (2004). https://doi.org/10.1021/ac0351163
44. Medzihradszky, K.F., Bohlen, C.J.: Partial De Novo Sequencing and Unusual CID Fragmentation of a 7 kDa, Disulfide-Bridged Toxin. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23, 923–934 (2012). https://doi.org/10.1007/s13361-012-0350-x
45. Lee, Y.J., Lee, Y.M.: Formation ofc1 fragment ions in collision-induced dissociation of glutamine-containing peptide ions: a tip forde novo sequencing. Rapid Commun. Mass Spectrom. 18, 2069–2076 (2004). https://doi.org/10.1002/rcm.1593
46. Wang, B., Liu, J., Cao, J., Wang, H., Guan, X., Wei, Z., Guo, X.: Investigation of c ions formed by N-terminally charged peptides upon collision-induced dissociation: c ions formed by charge-remote fragmentation. J. Mass Spectrom. 51, 989–997 (2016). https://doi.org/10.1002/jms.3841

b) Supplemental information

Table of Contents

Table S1: Unmodified C-terminus peptide sequences

Figure S1: MS/MS spectra of protonated and sodiated LAVGIAE-NH_2 peptide recorded on the three different mass spectrometers

Figure S2: MS/MS spectra of sodiated Asp- or Glu- containing peptides

Figure S3: MS^n iterative experiments from $[b_6+Na+OH]^+$ ion of FPCEAFA-NH_2 and FPCEAFA peptides recorded on AmaZon Speed mass spectrometer

Figure S4: MS/MS spectra of Ser-, Thr- or Tyr- containing peptides

Figure S5: $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ion intensities issued from MS/MS experiments of Ser/Thr containing peptides based on Synapt-G2S data

Figure S6: MS^n iterative experiments from $[b_6+Na+OH]^+$ ion of YFAVAIA-NH_2 peptide recorded on AmaZon Speed mass spectrometer

Figure S7: MS/MS spectra of Arg- or His- ended and internal Arg- or His- containing peptides

Table S1: Unmodified C-terminus peptide sequences

N°	Sequence	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$
2*	APIAGFV	674,3872	696,3691
6*	FPCDAFA	770,3178	792,2997
7*	FPCEAFA	784,3334	806,3153
15*	AGVDNFG	679,3046	701,2865
18*	VYAGEVAH	845,4152	867,3971
19*	LAVAIAS	644,3978	666,3797
22*	LAVTAIA	658,4134	680,3953
26*	AFISVGPLAR	1030,6044	680,3953
37*	FPARVGI	759,4512	781,4331

Figure S1: MS/MS spectra of protonated and sodiated LAVGIAE-NH_2 peptide recorded on different mass spectrometers

Figure S1a: MS/MS spectra recorded on Synapt G2-S mass spectrometer (Q-Tof)

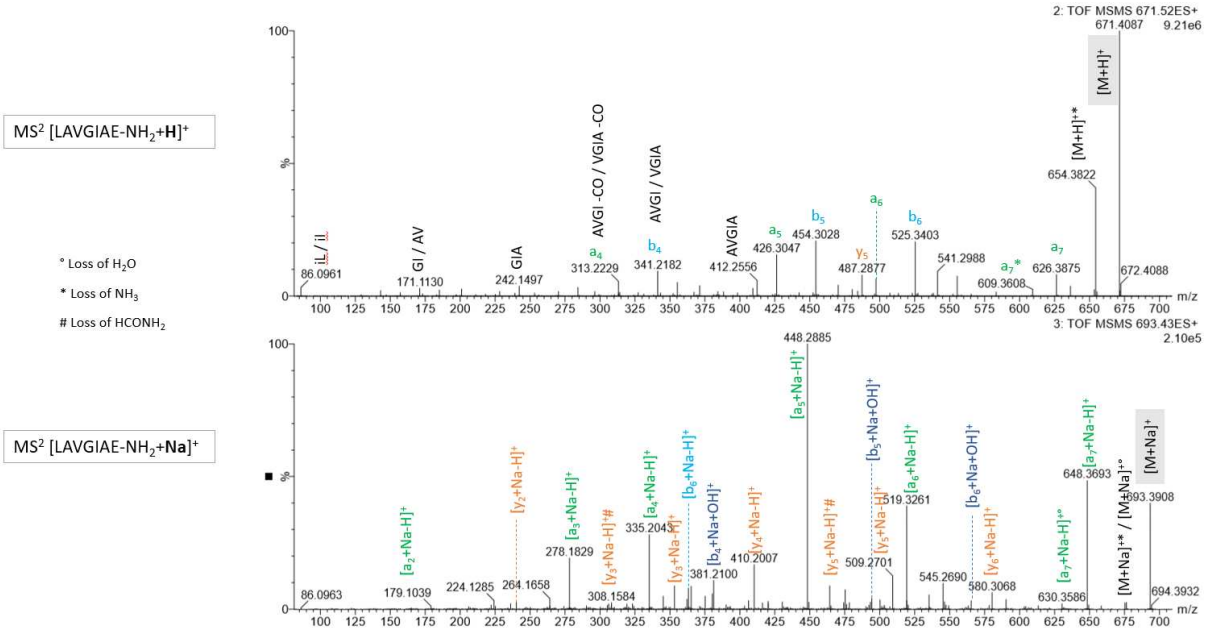


Figure S1b: MS/MS spectra recorded on AmaZon Speed mass spectrometer (Ion Trap)

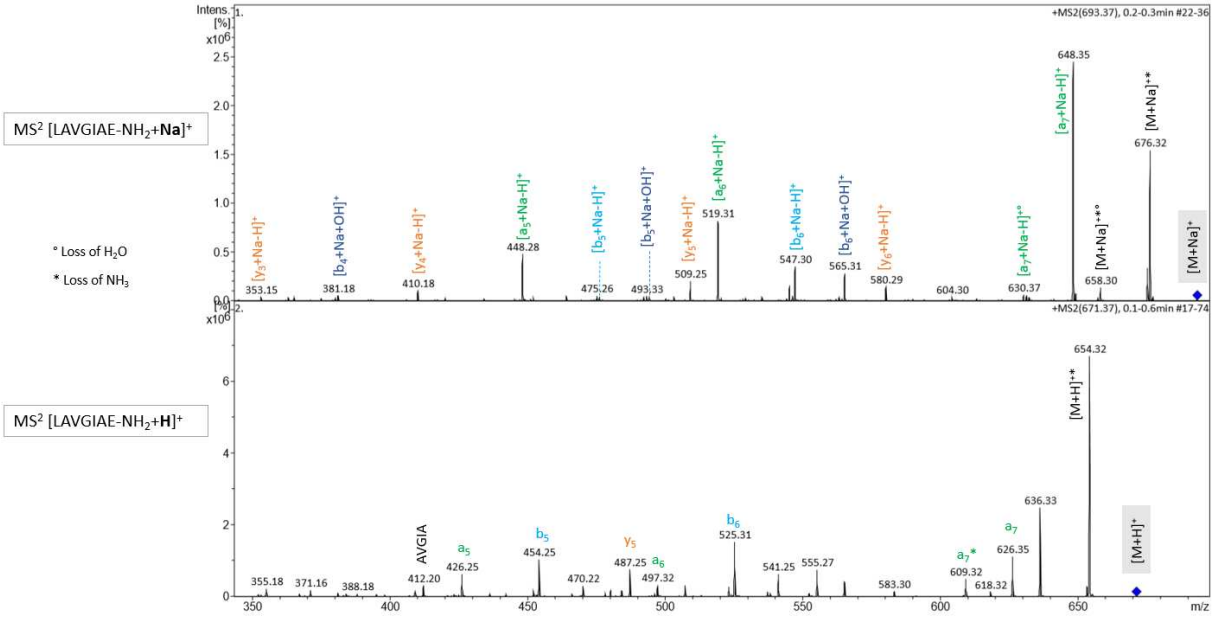


Figure S1c: MS/MS spectra recorded on Rapiflex mass spectrometer (Tof/Tof)

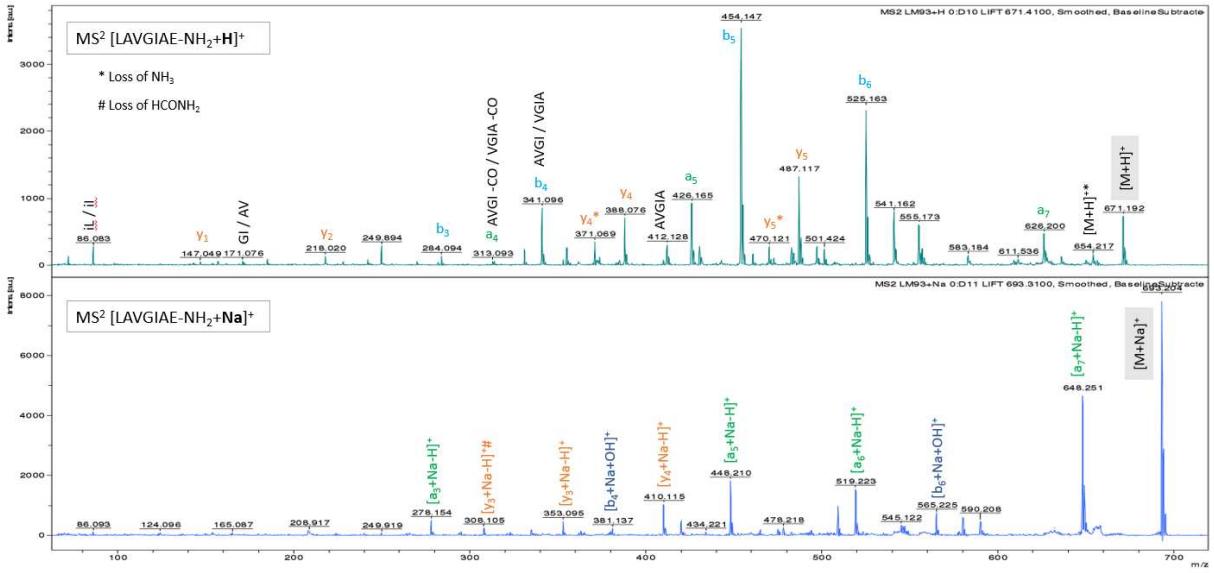


Figure S2: MS/MS spectra of Asp- or Glu- containing peptides

Figure S2a: MS/MS spectra of FPCDAFA-NH_2 and FPCDAFA peptides (N°6 in Table 1) recorded on Amazon Speed mass spectrometer (Ion Trap)

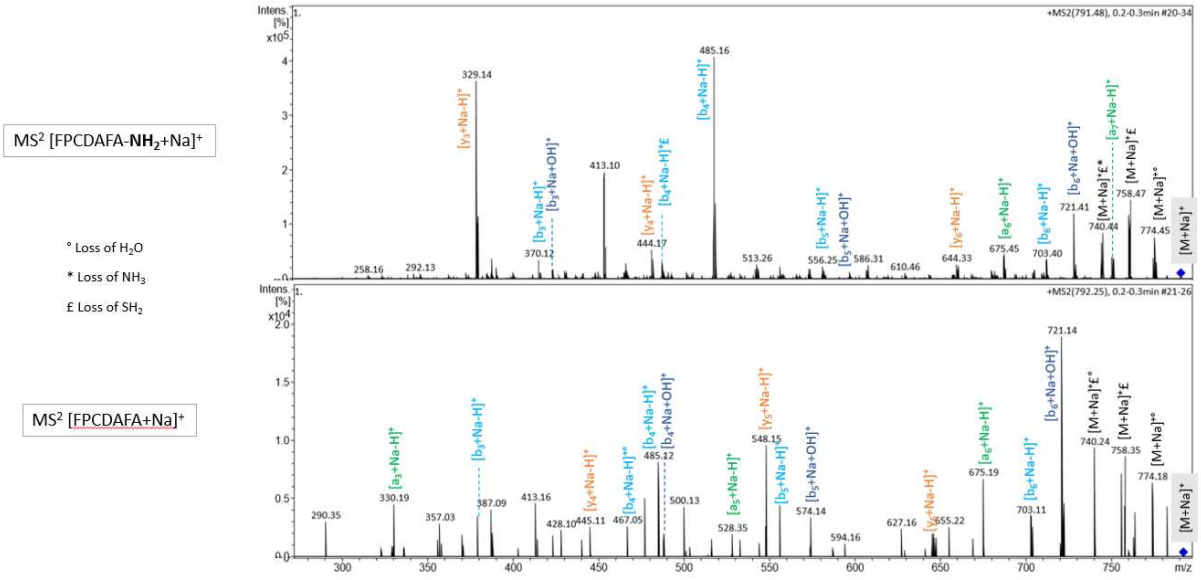


Figure S2b: MS/MS spectra of AGVDNF and AGVDNFG-NH_2 peptides (N°15 in Table 1) recorded on Synapt G2-S mass spectrometer (Q-Tof)

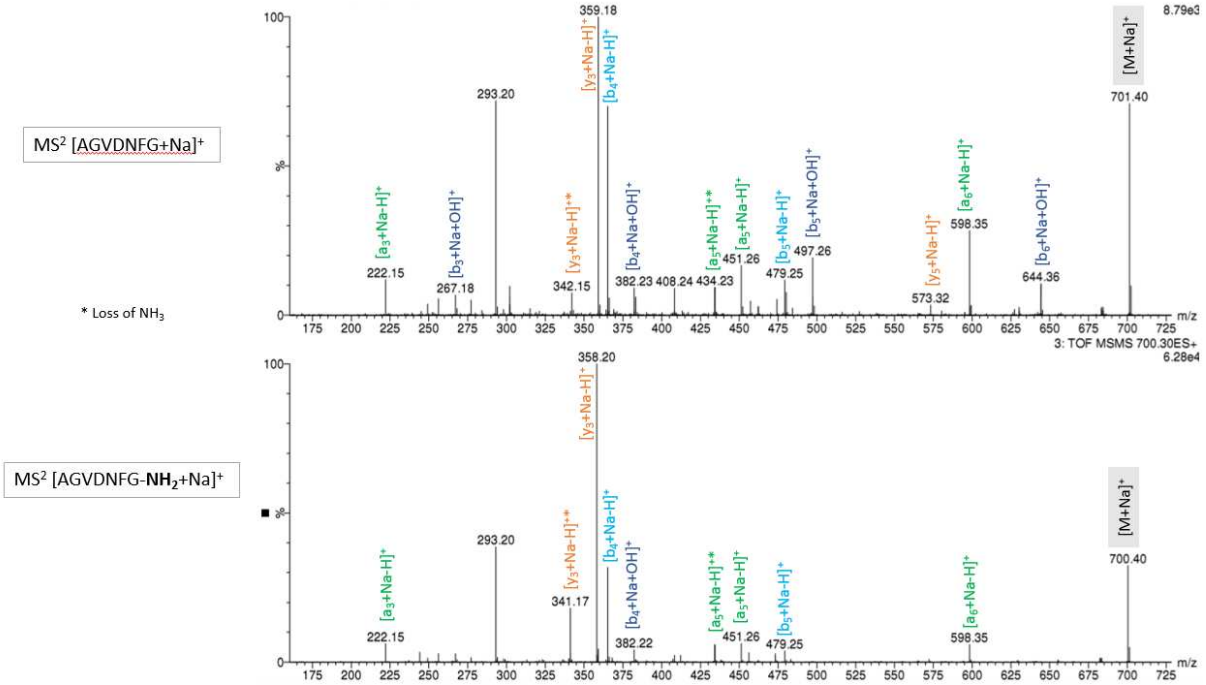


Figure S2c: MS/MS spectra of FPCEAFA-NH_2 and FPCEAFA peptides (N°7 in Table 1) recorded on Amazon Speed mass spectrometer (Ion Trap)

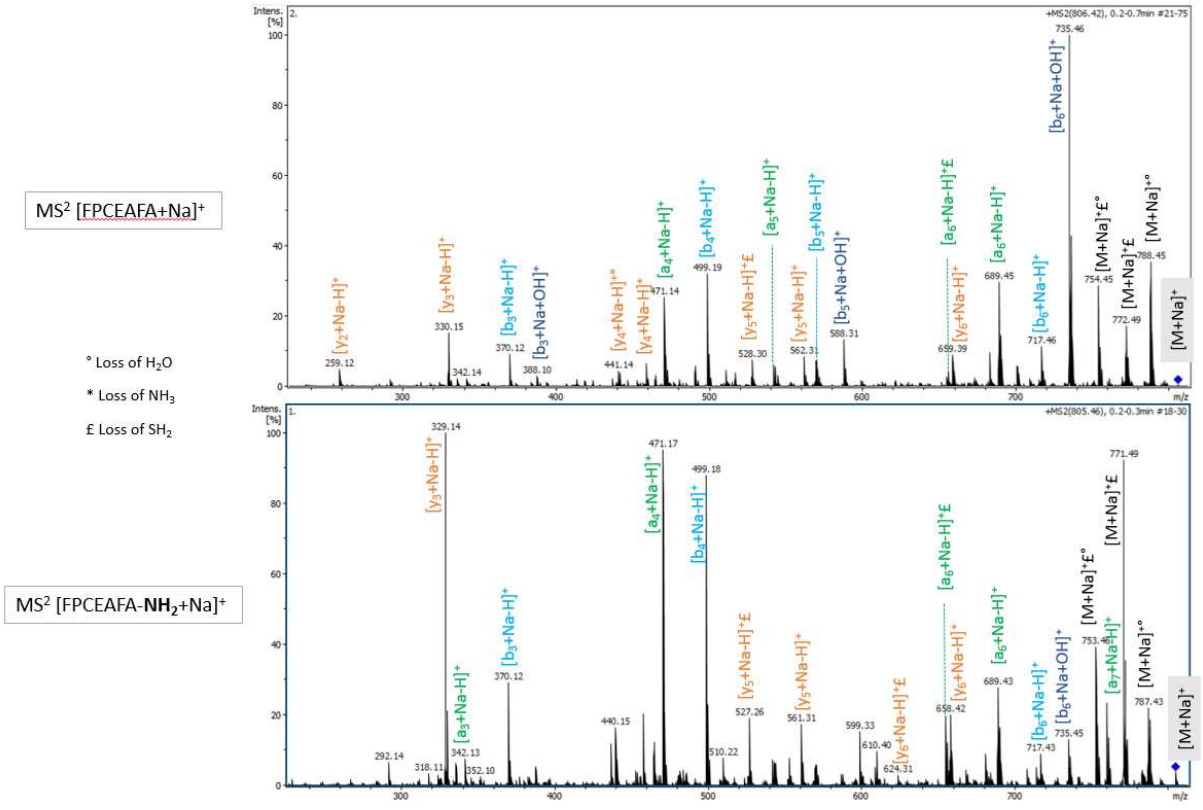


Figure S2d: MS/MS spectra PYVACAE-NH_2 peptide (N°16 in Table 1) recorded on Synapt G2-S mass spectrometer (Q-Tof)

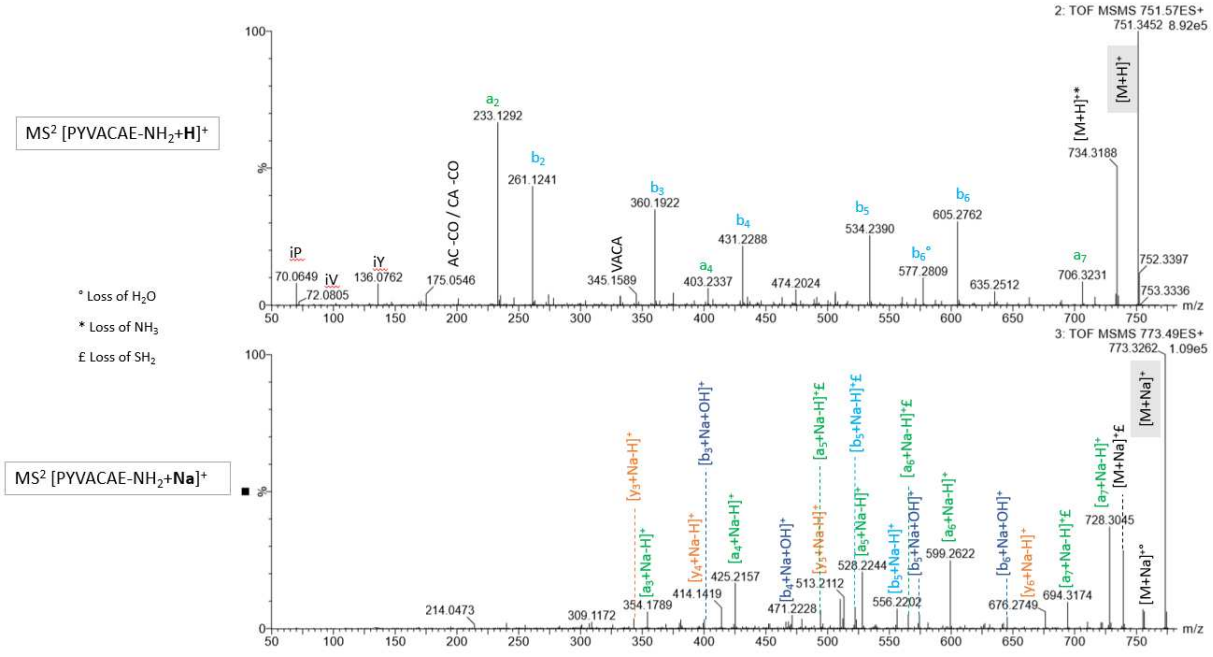


Figure S2e: MS/MS spectra of FVAHEFA-NH_2 peptide (N°17 in Table 1) recorded on Amazon Speed mass spectrometer (Ion Trap)

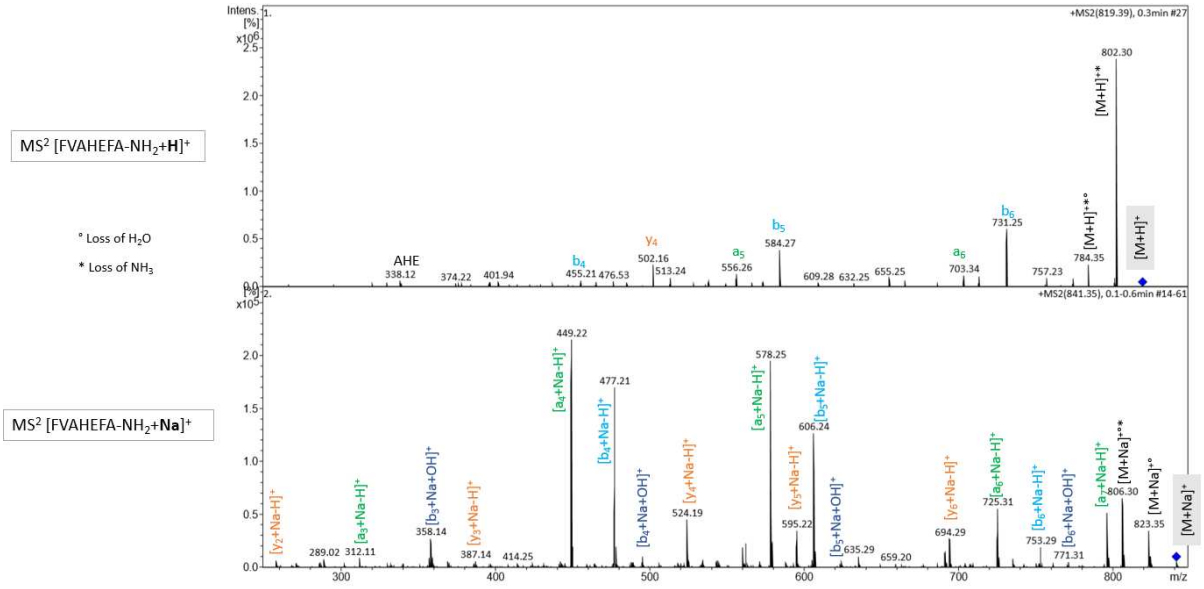


Figure S2f: MS/MS spectra of VYAGEVAH and VYAGEVAH-NH_2 peptides (N°18 in Table 1) recorded on Amazon Speed mass spectrometer (Ion Trap)

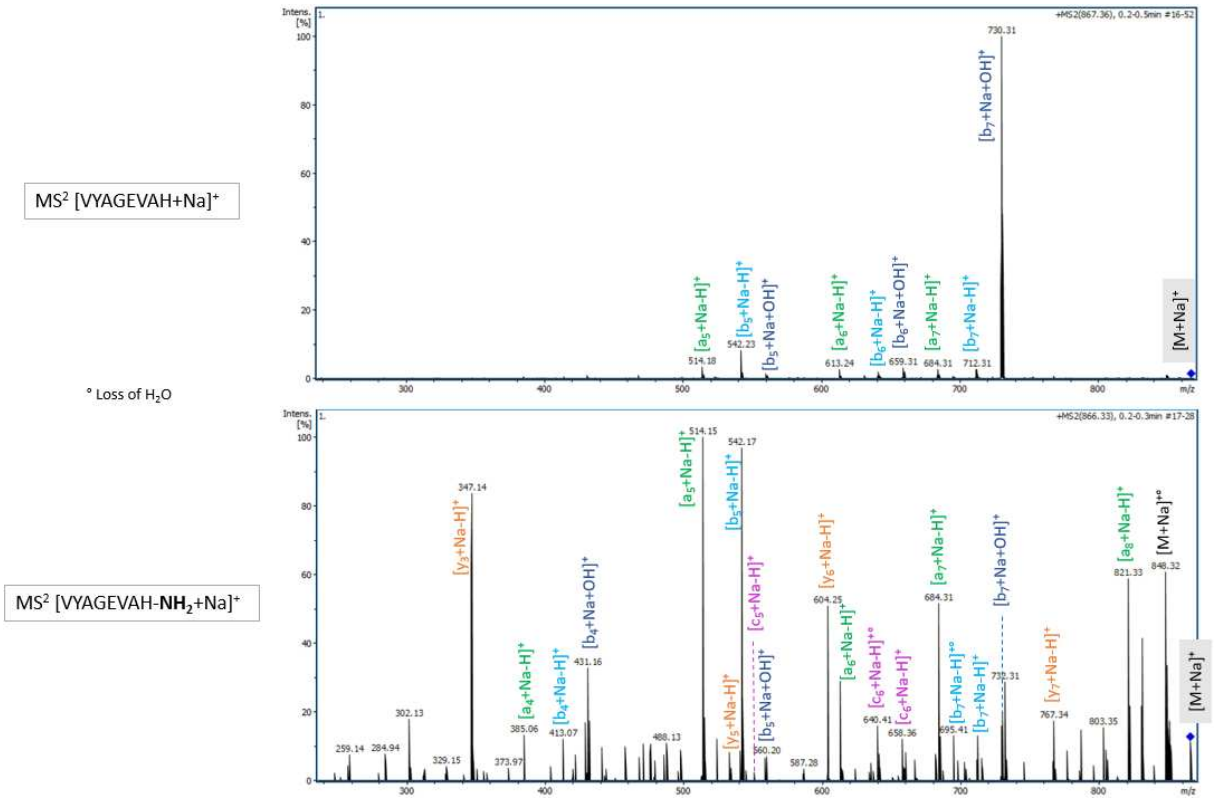


Figure S3: MS^n iterative experiments from $[b_6+Na+OH]^+$ ion of FPCEAFA-NH_2 and FPCEAFA peptides recorded on AmaZon Speed mass spectrometer

Figure S3a: MS^n experiment on FPECAFA-NH_2 peptide from $[b_6+Na+OH]^+$

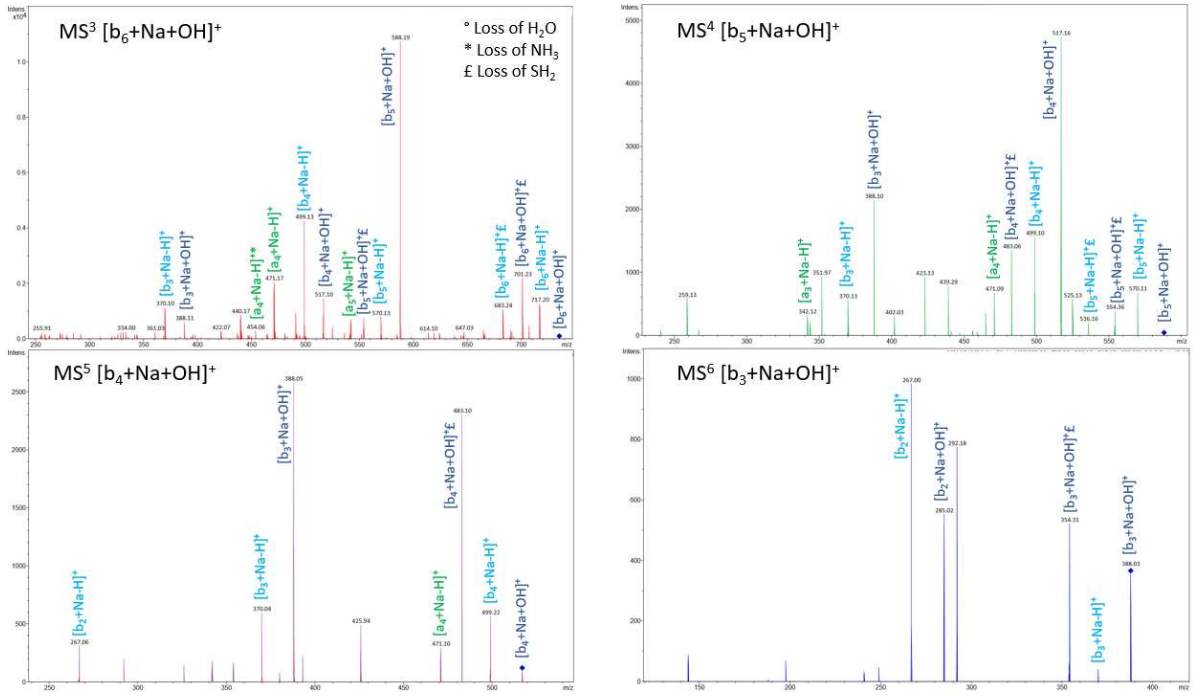


Figure S3b: MS^n experiment on FPECAFA peptide from $[b_6+Na+OH]^+$

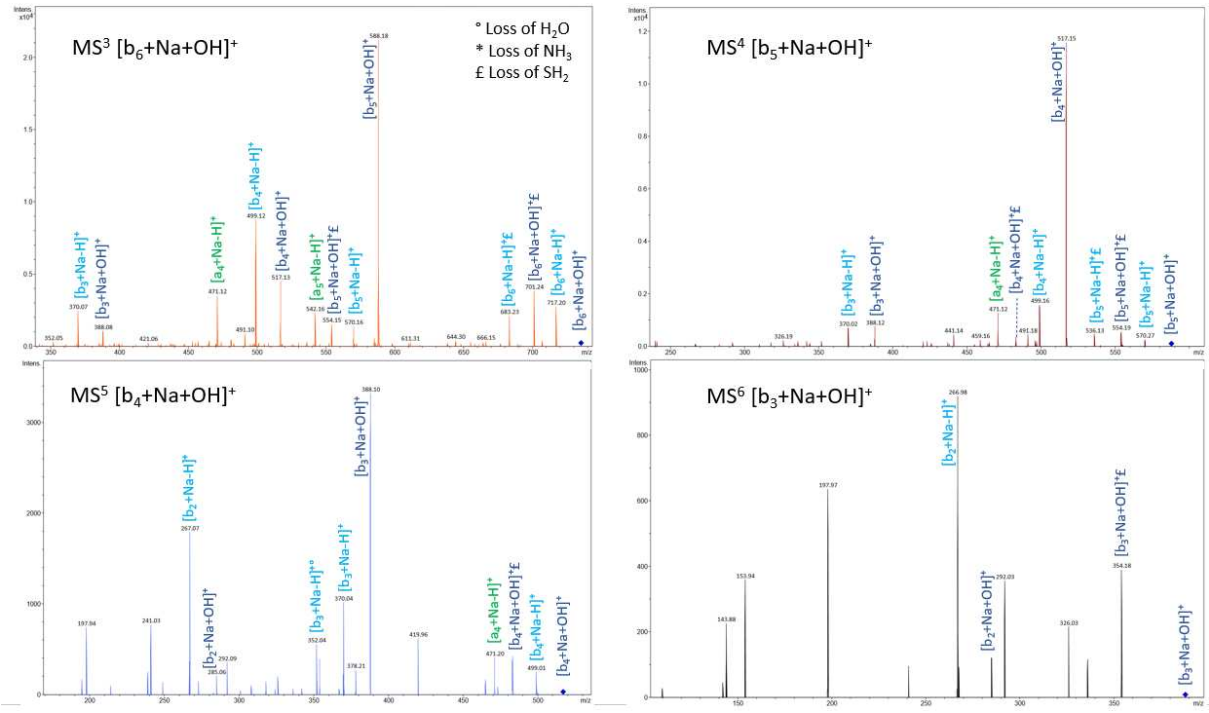


Figure S4: MS/MS spectra of sodiated Ser-, Thr- or Tyr- containing peptides

Figure S4a: MS/MS spectra of LAVAIAS and LAVAIAS-NH_2 peptides recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

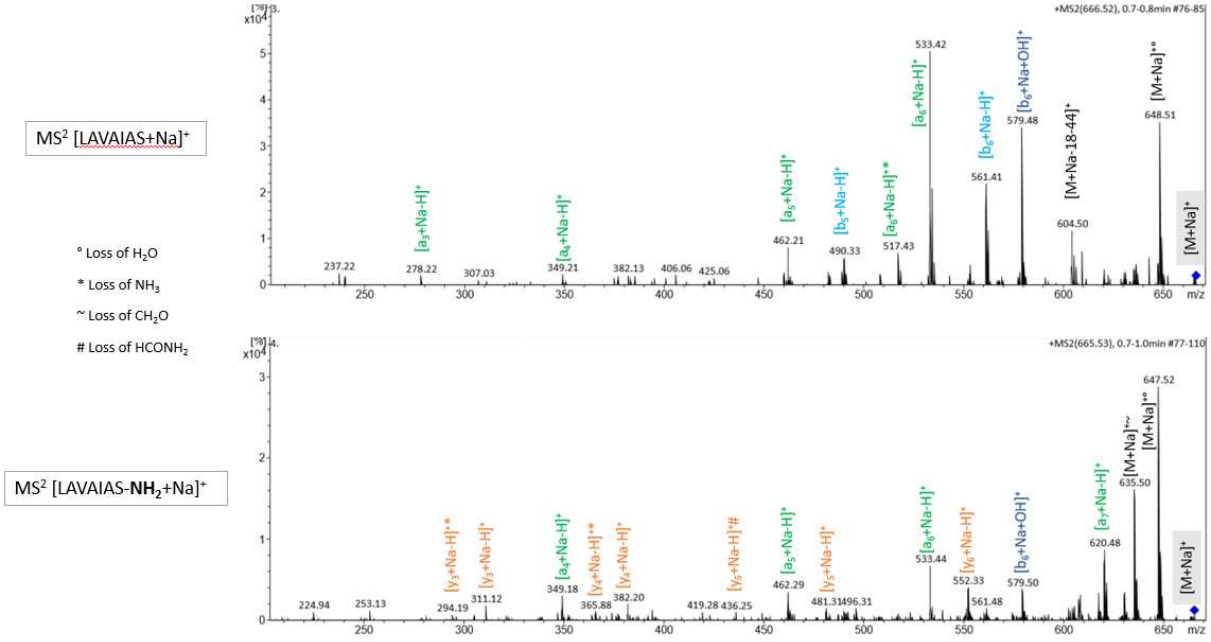


Figure S4b: MS/MS spectra of LAVAIAT-NH_2 peptide recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

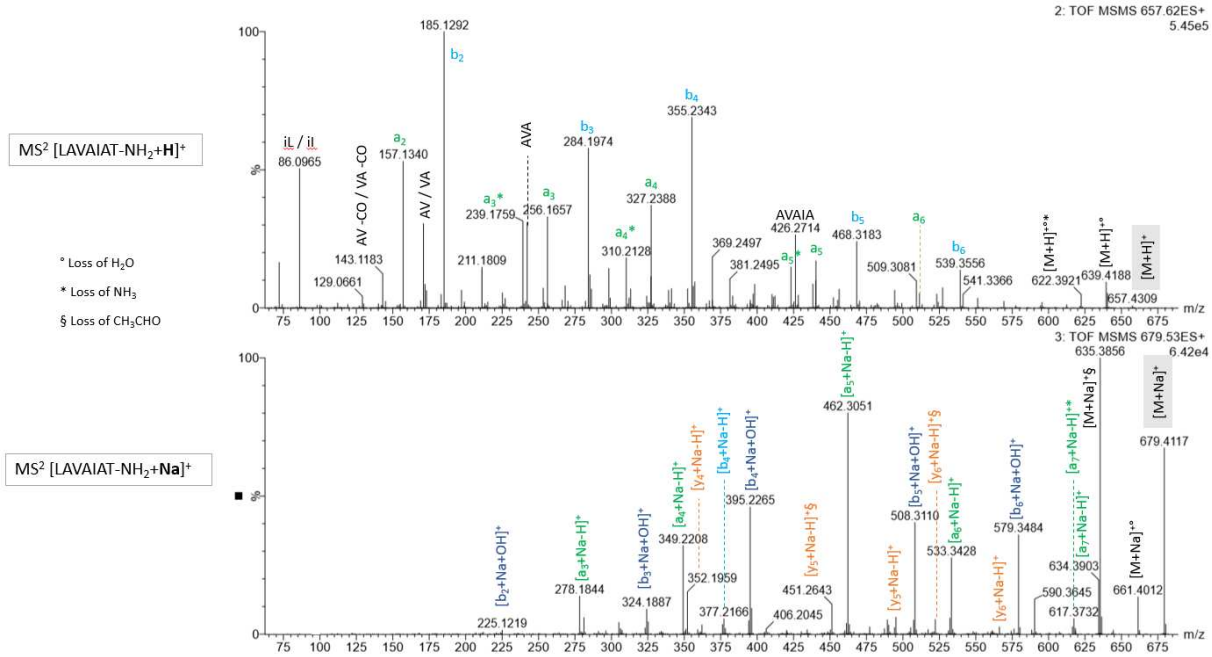


Figure S4c: MS/MS spectrum of LAVSAIA-NH_2 peptide recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

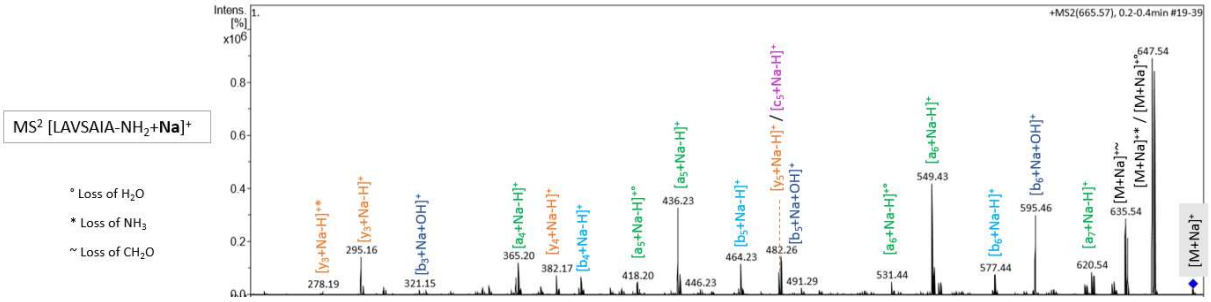


Figure S4d: MS/MS spectra of LAVTAIA and LAVTAIA-NH_2 peptides recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

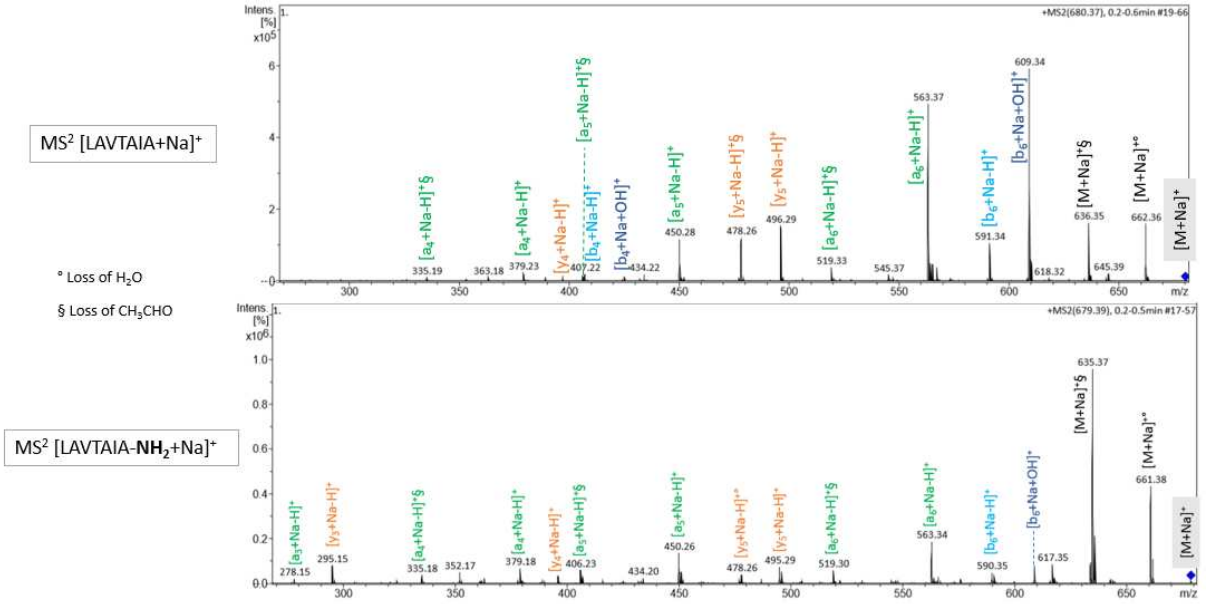


Figure S4e: MS/MS spectra of SLAVAIA-NH_2 peptide recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

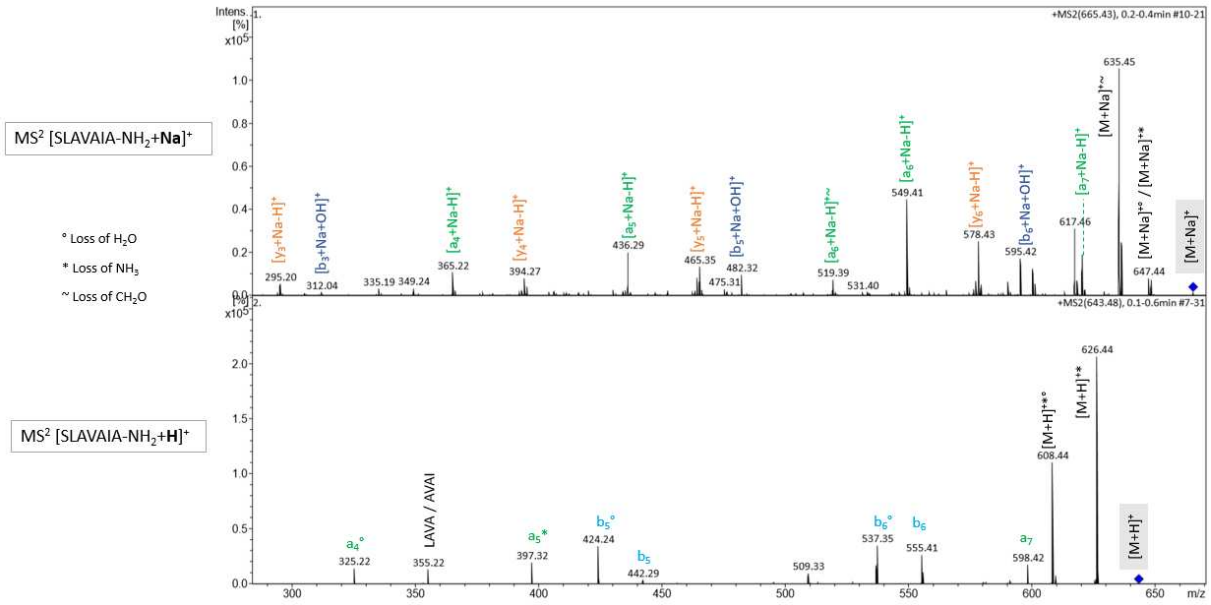


Figure S4e: MS/MS spectra of TLAVAIA-NH_2 peptide recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

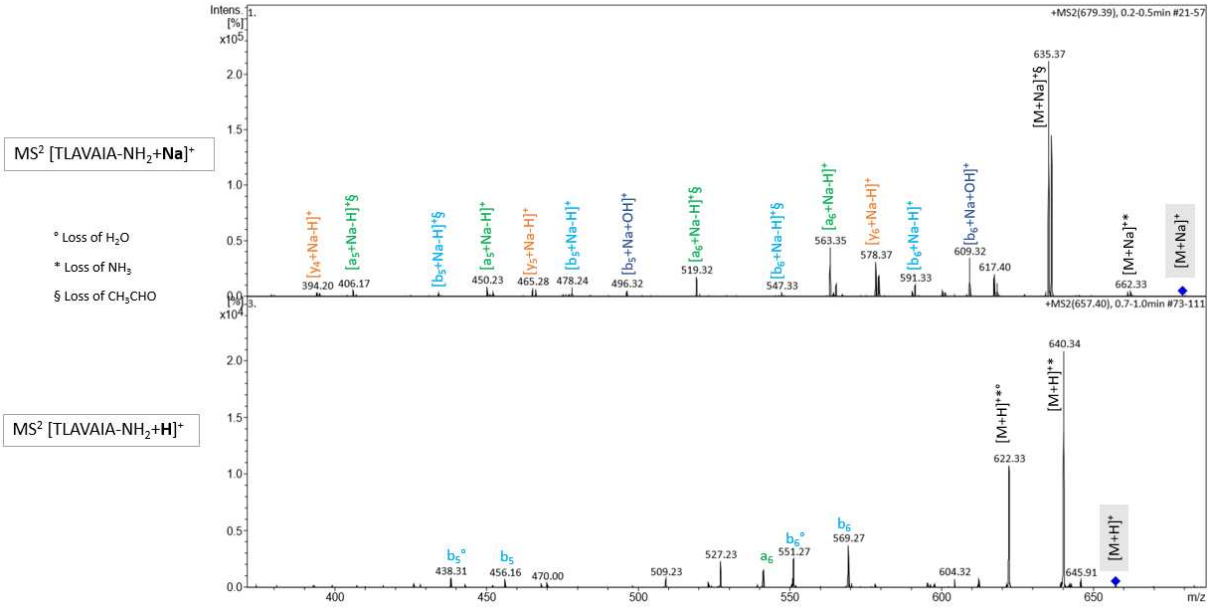


Figure S4f: MS/MS spectra GLAVFSG-NH_2 peptide recorded on Synapt G2-S mass spectrometer (Q-Tof)

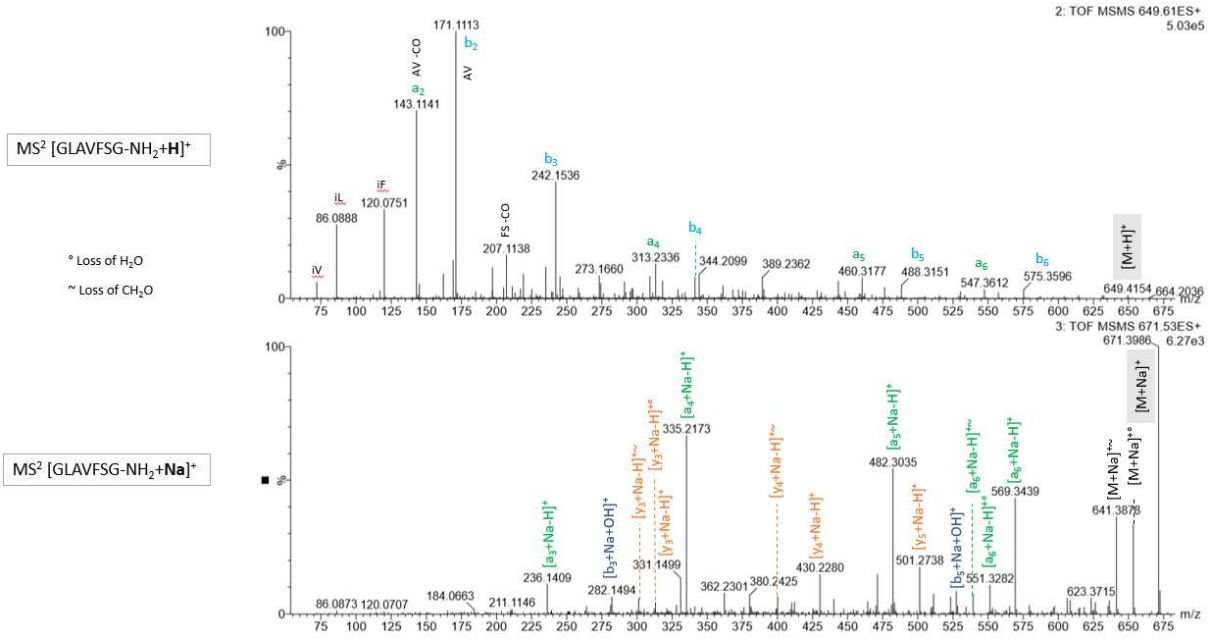


Figure S4g: MS/MS spectra AFISVFGPLAR and AFISVFGPLAR-NH_2 peptides recorded on Synapt G2-S mass spectrometer (Q-Tof)

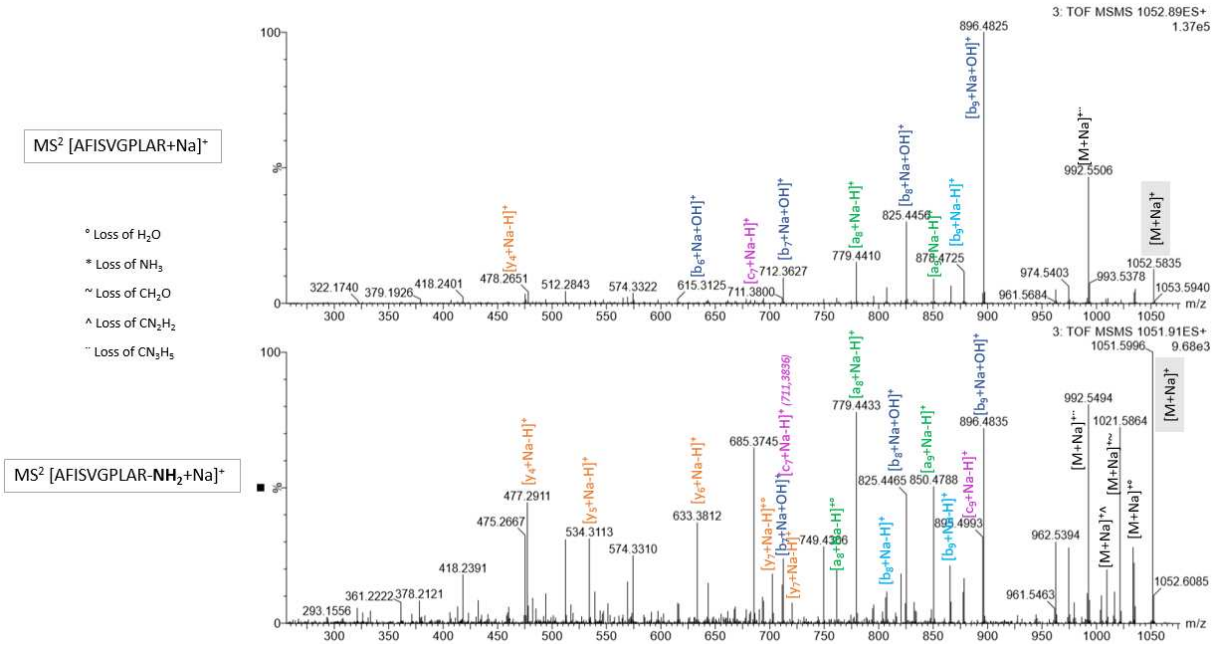


Figure S4g: MS/MS spectra PYVACAM-NH_2 peptide recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

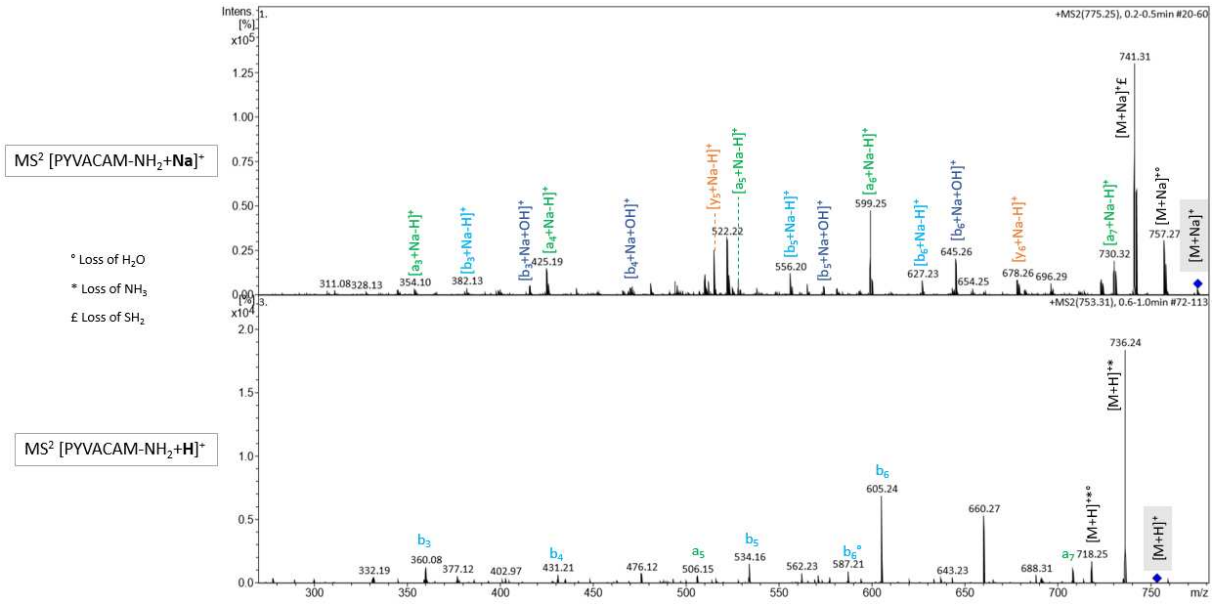


Figure S4h: MS/MS spectra YFAVAIA-NH_2 peptide recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

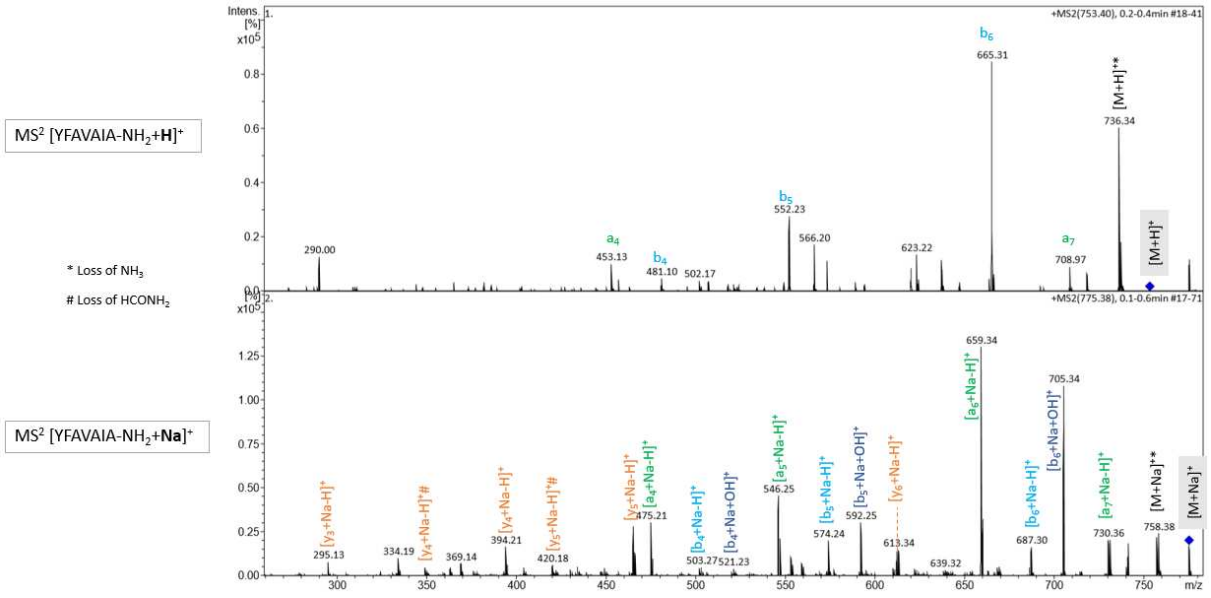


Figure S4i: MS/MS spectra PYAVAIA-NH_2 peptide recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

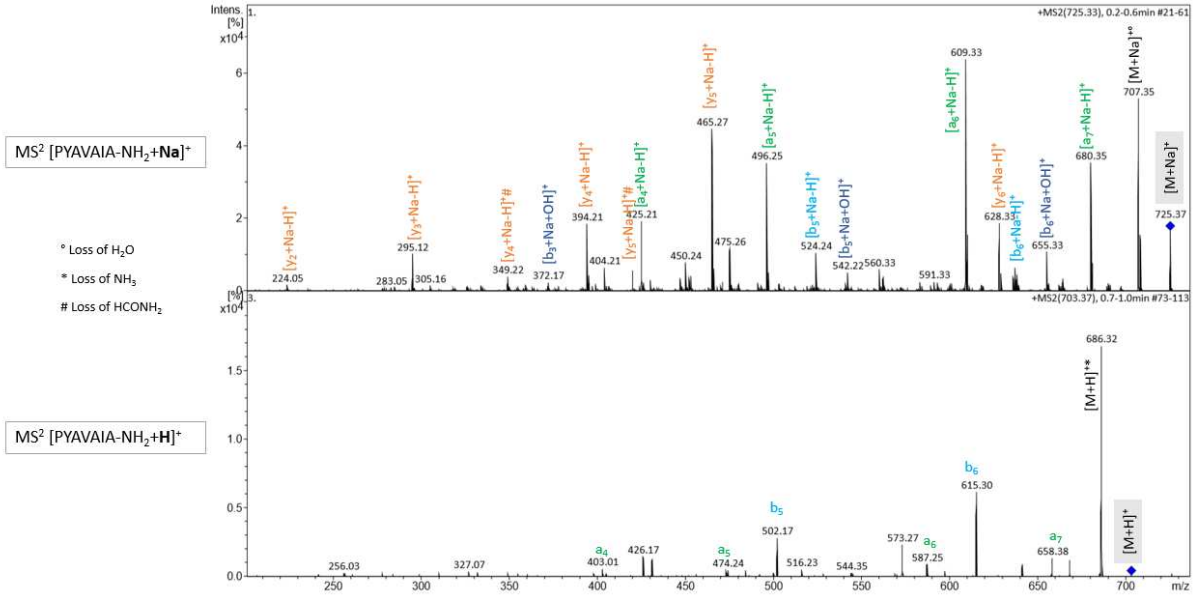


Figure S5: $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ion relative intensities issued from MS/MS experiments of Ser/Thr containing peptides based on Synapt-G2S data

$$\frac{I_{[bn-x+Na+OH]+}}{(I_{[bn-x+Na+OH]+} + \Sigma I_{ions})}$$

$I_{[bn-x+Na+OH]+}$: $[b_{n-x}+Na+OH]^+$ ion intensity
I_{ions} : all other ion intensities, including parent ion

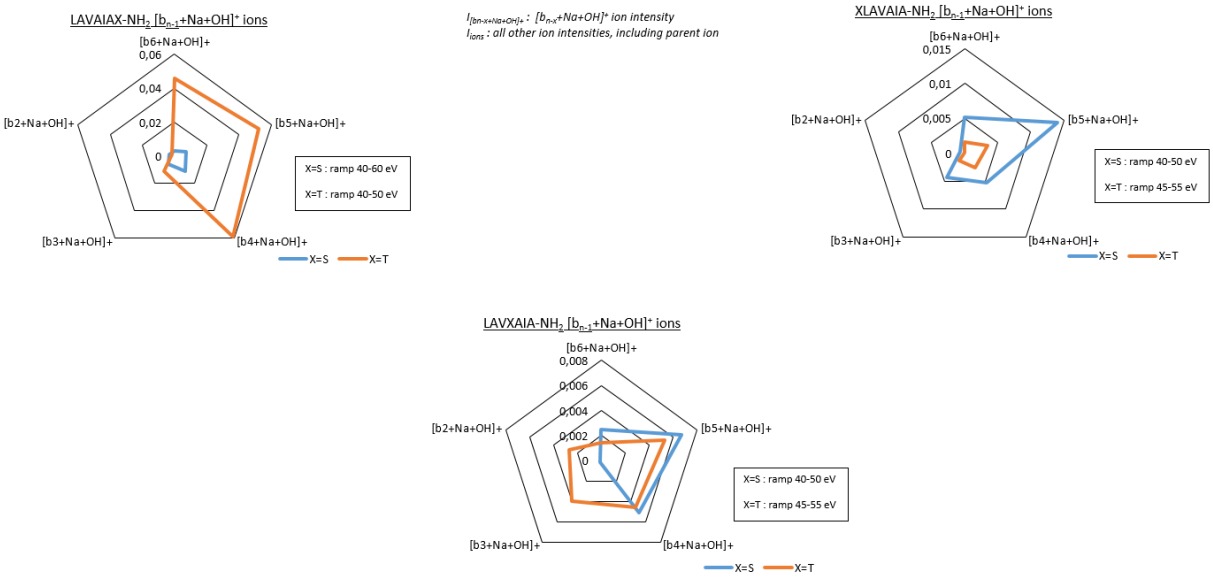


Figure S6: MS^n iterative experiments from $[b_6+Na+OH]^+$ ion of YFAVAIA-NH_2 peptide recorded on AmaZon Speed mass spectrometer

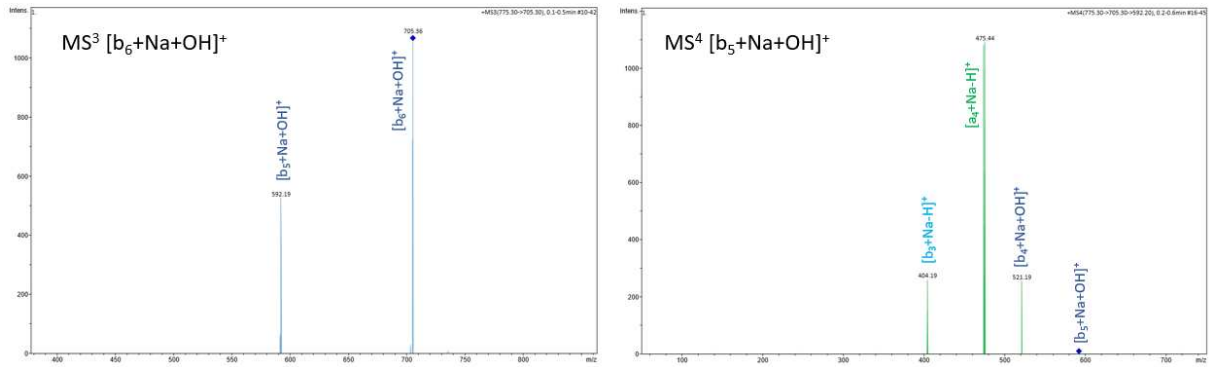


Figure S7: MS/MS spectra of Arg- or His- ended and internal Arg- or His- containing peptides

Figure S7a: MS/MS spectra LMGVHCVR-NH_2 peptide recorded on Synapt G2-S mass spectrometer (Q-Tof)

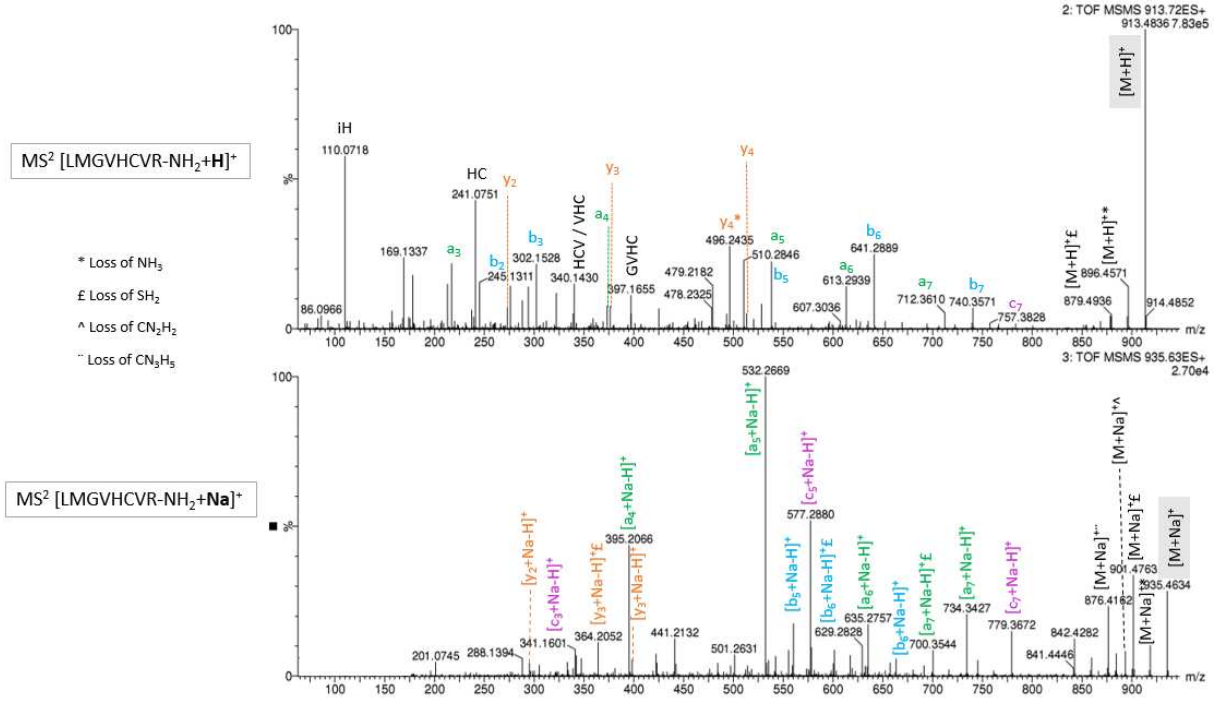


Figure S7b: MS/MS spectra LAVRIAW-NH_2 peptide recorded on Synapt G2-S mass spectrometer (Q-Tof)

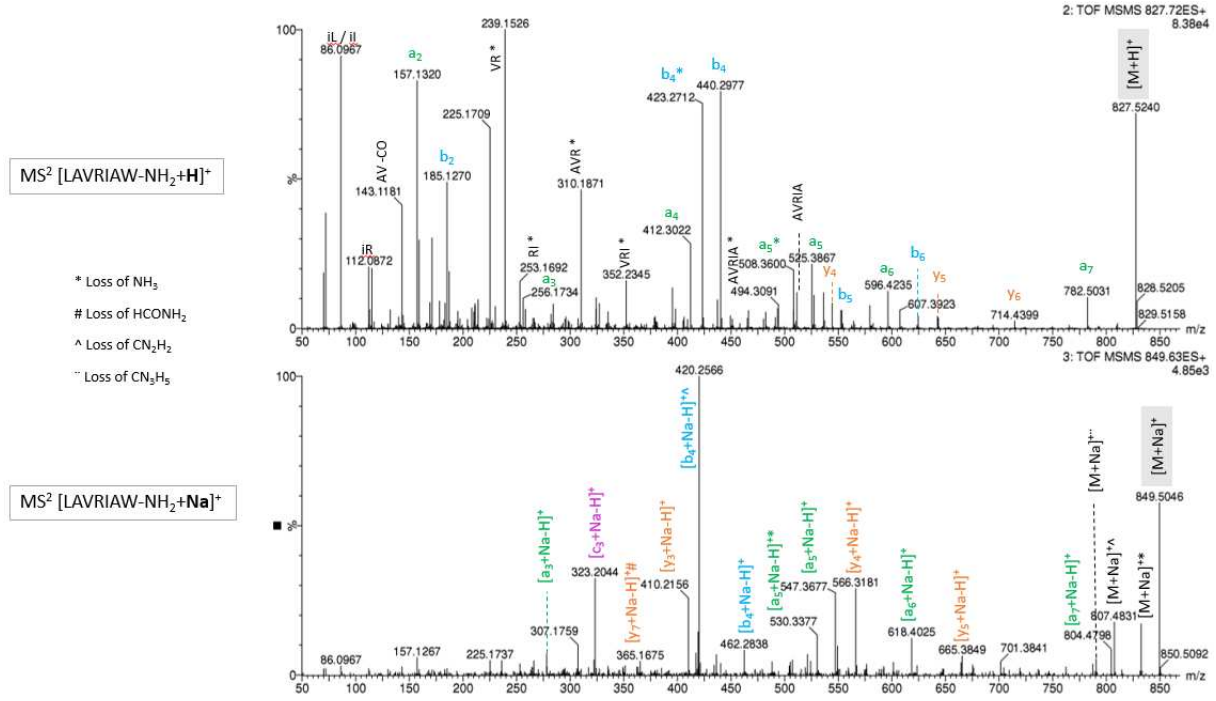


Figure S7c: MS/MS spectra FPAFARD-NH_2 peptide recorded on Synapt G2-S mass spectrometer (Q-Tof)

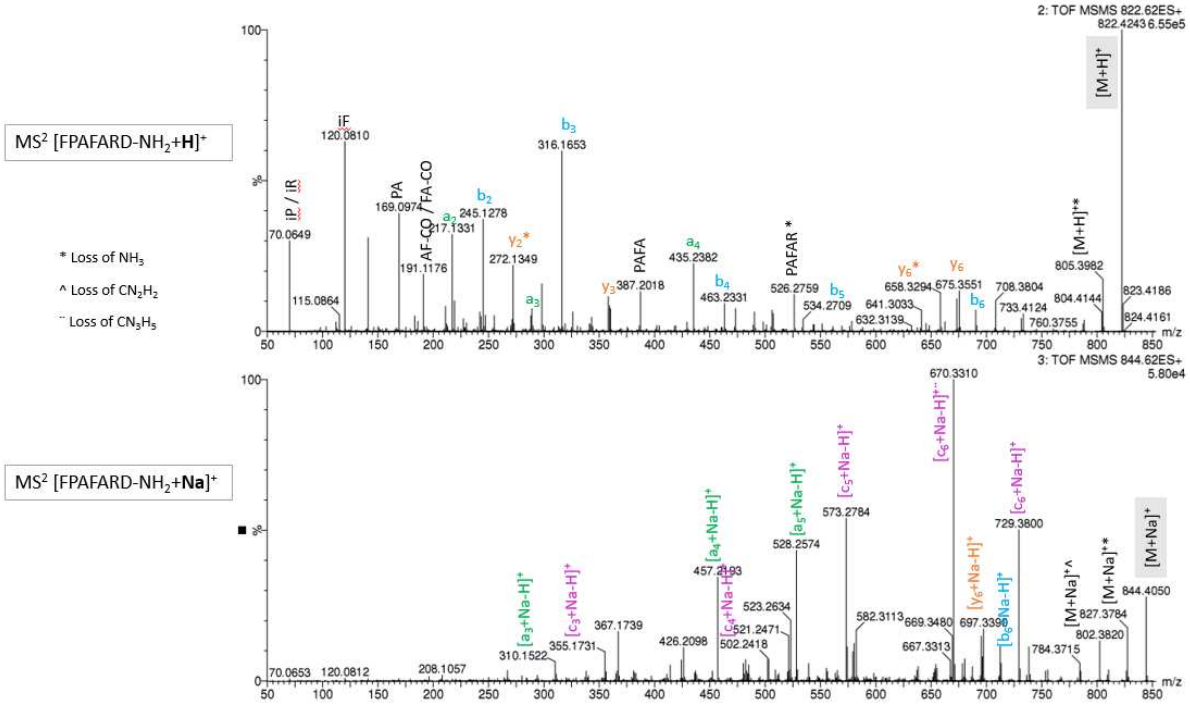


Figure S7d: MS/MS spectra of VYAGEVAH and VYAGEVAH-NH_2 peptides recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

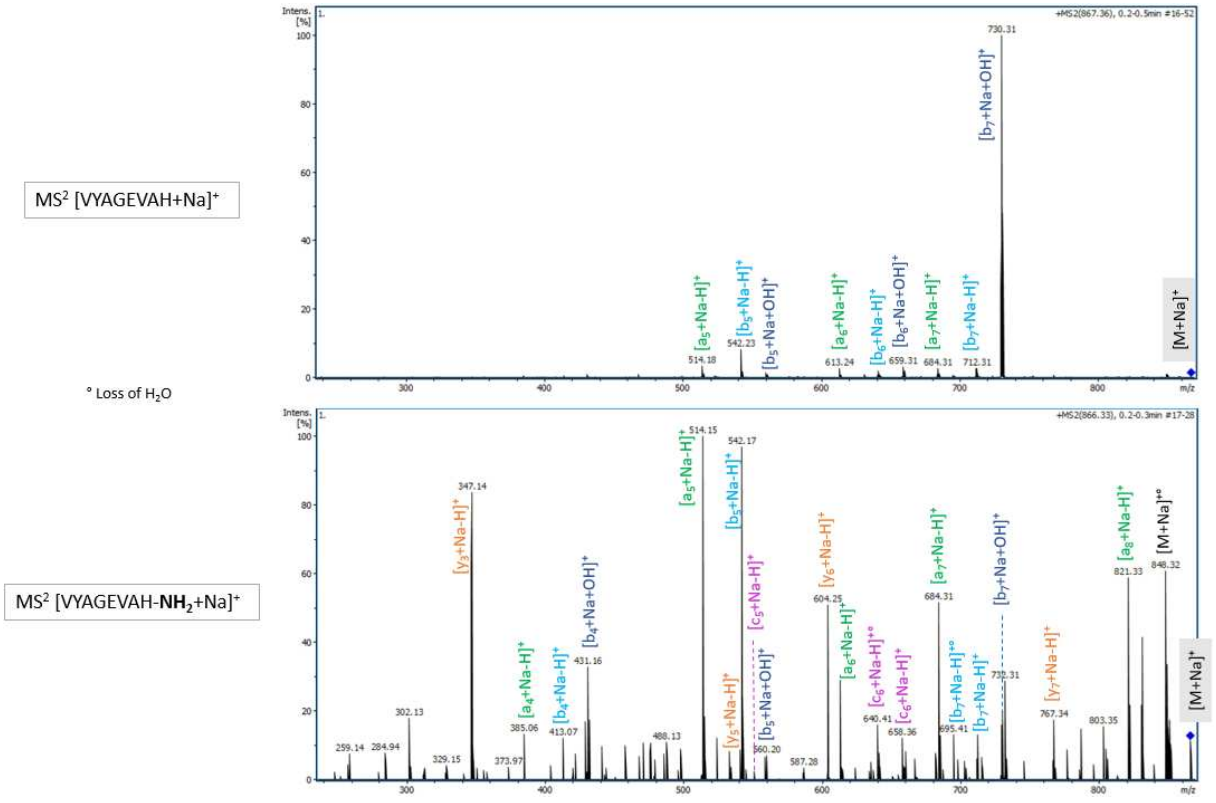


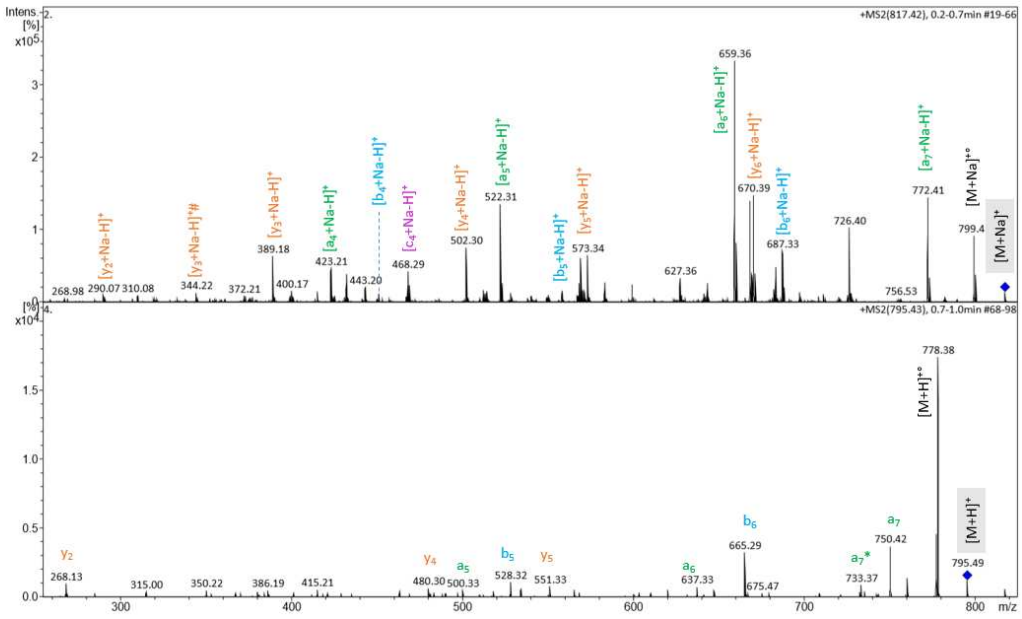
Figure S7e: MS/MS spectra of FPALVHI-NH_2 peptide recorded on Amazon spectrometer (Ion Trap)

MS² [FPALVHI+**Na**]⁺

° Loss of H_2O

* Loss of NH_3

Loss of $HCONH_2$



MS² [FPALVHI+**H**]⁺

2) Cationisation par un métal alcalino-terreux : le magnésium

Les dissociations de peptides acides cationisés par d'autres métaux [6–10], notamment les métaux alcalino-terreux, ont également été étudiés [11–13]. Les peptides acides cationisés par du Mg^{2+}, Ca^{2+} ou Ba^{2+} dissociés en CID basse énergie sous forme monochargés ($[M+Cat^{2+}-H]^+$) génèrent également des ions de type a, b, y mais aussi des ions c [12]. La différence entre ces différents adduits réside uniquement dans l'intensité des ions produits [11,12]. Teesch et Adams se sont également intéressées à la fragmentation des analogues amides : les deux formes se distinguent principalement par l'intensité des ions de type y, plus abondants dans le cas de la dissociation du peptide amide. Cette différence peut s'expliquer par l'ancrage initial de l'ion métallique sur l'oxygène d'un carbonyle amide. En effet, la cationisation du peptide en phase gazeuse déclencherait la déprotonation de l'azote amide pour aboutir à une liaison directe entre l'azote de la fonction amide et l'ion métallique. De ce fait, cette déprotonation devrait favoriser les groupes amides par rapport aux groupes acides C-terminaux, qui est reflétée par les abondances relatives des ions [12]. La dissociation des peptides sous formes $[M+Cat]^{2+}$ en CID basse énergie (avec Cat = ion métallique dichargé) génère des ions monochargés (par exemple, sachant que le fragment y porte une charge positive, $[y_x+Cat-2H]^+$) et dichargés (comme $[y_x+Cat-H]^{2+}$), similaires aux ions produits par la dissociation du peptide monochargé par le même métal alcalino-terreux [13].

Les dissociations de quelques peptides amides et acides cationisés par un ion sodium ou un ion magnésium ont été comparées pour évaluer la complémentarité des résultats, avec pour objectif l'obtention de recouvrements de séquence complets.

a) Matériel et Méthode

Les peptides sélectionnés ont été synthétisés dans le laboratoire selon les protocoles conventionnels de synthèse en phase solide et purifiés par HPLC préparative en phase inverse. Ces peptides ont été dilués dans un mélange H_2O/ACN (50/50, v/v) à 5.10^{-5} M et une solution de $MgCl_2$ a été ajoutée avant analyse (ratio molaire 1:1).

Les expériences MS/MS ont été réalisées sur le spectromètre de masse Synapt G2-S (Waters). Les données ont été enregistrées et traitées par le logiciel MassLynx. Les échantillons ont été infusés dans la source ESI à un débit de $5\mu L.min^{-1}$. Les tensions appliquées ont été de +2 kV pour le capillaire et adaptées à chaque peptide pour le sampling cone, sous un flux d'azote à $500\ L.h^{-1}$ chauffé à 250 °C. L'analyseur Tof a été calibré pour 0.1 acquisition.s^{-1} de 50 à 1000 Da, en mode positif. La durée de ces acquisitions a été fixée à 30 s. Une rampe d'énergie a été appliquée aux ions sélectionnés pour les expériences MS/MS, et adaptée pour chaque peptide.

b) Résultats

Les résultats de recouvrement de séquence à partir du peptide sodé, sans et avec dissociation du peptide cationisé au magnésium, sont répertoriés dans le Tableau 1 (voir **Annexe 1.2-1** pour les schémas illustrant les recouvrements de séquences).

Tableau 1 : Résultats de recouvrements de séquence suite à la dissociation des peptides sodés, en complément ou non de la cationisation par le métal alcalino-terreux Mg^{2+}

N°	Séquence	Fonction C-ter	Recouvrement de séquence	
			$[M+Na]^+$	$[M+Na]^+ + [M+Mg]^{2+}$
1a	GILFAVA	$-NH_2$	71 %	100 %
1b		-COOH	43 %	100 %
2a	LAVGIAE	$-NH_2$	100 %	100 %
2b		-COOH	100 %	100 %
3a	AGVDNFG	$-NH_2$	57 %	71 %
3b		-COOH	57 %	71 %
4a	LAVAIAS	$-NH_2$	100 %	100 %
4b		-COOH	71 %	100 %
5a	LAVTAIA	$-NH_2$	71 %	100 %
5b		-COOH	100 %	100 %
6a	LAVGIAW	$-NH_2$	100 %	100 %
6b		-COOH	57 %	57 %

Comme le démontrent les résultats du Tableau 1, la cationisation par le magnésium permet dans certains cas d'augmenter le recouvrement de séquence obtenu suite à la dissociation du peptide sodé, jusqu'à doubler le pourcentage comme pour le peptide 1b. Dans la majorité des cas, la couverture de séquence des peptides sodés n'est pas complète dû à l'absence du dernier ion C-terminal y_{n-1} (et donc l'absence de l'ion « b1 ») comme pour le peptide 1a, démontré dans la Figure 1.

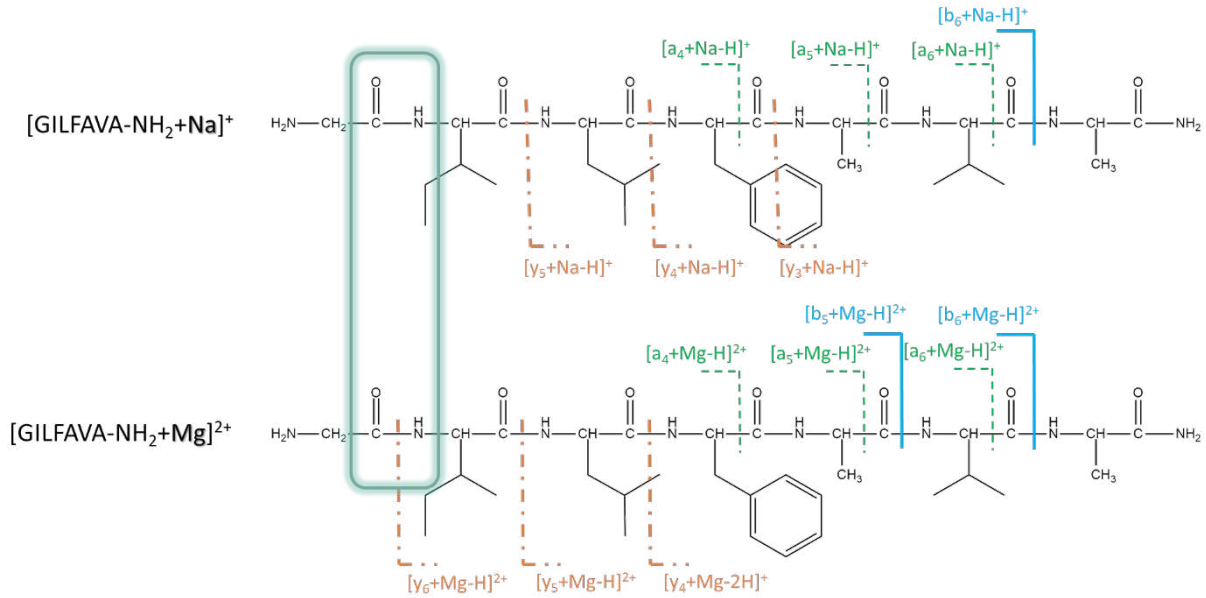


Figure 1 : Comparaison des dissociations du peptide 1a du Tableau 1 cationisé par un ion Na^+ ou Mg^{2+}

La cationisation par le métal alcalino-terreux Mg^{2+}, utilisé en complément de celle par le métal alcalin Na^+, permettrait ainsi d'améliorer le recouvrement de séquence de peptides dans le cadre d'un séquençage *de novo*. Les spectres MS/MS issus de la dissociation des peptides cationisés par le Mg seuls sont difficiles à interpréter par la présence d'ions fragments existants sous différents états

d'ionisation (mono- et dichargés). Le dernier ion C-terminal y_{n-1} est présent dans une grande majorité des cas (sauf pour le peptide 5b) (voir les spectres MS/MS en **Annexe 1.2-2**). L'absence d'autres ions y rend son identification compliquée car sans un ensemble d'ions de même structure, il est délicat de savoir à quelle série cet ion isolé appartient (C-ter ou N-ter). C'est pour ces raisons que le spectre MS/MS d'un peptide cationisé par un ion Mg^{2+} doit être utilisé en complément d'autres résultats obtenus de dissociations avec un autre agent d'ionisation monochargé, comme le Na^+.

Comme Teesch et Adams l'ont constaté, la différence de fragmentation entre les peptides amides et acides cationisés par le Mg^{2+} réside dans l'intensité des ions. Les ions de type y sont plus intenses sur les spectres MS/MS de peptides amides, tandis que les ions de type a sont plus abondants sur les spectres des peptides acides. Ces petites différences ne semblent pas être suffisantes en tant que telles pour être utilisées pour identifier sans ambiguïté les deux fonctions C-terminales dans le cadre d'un séquençage *de novo*.

3) Conclusion

Comme Teesch et Adams ont pu commencé à le constater en 1991 [5], la fragmentation des peptides amides sodés se différencie de celles des peptides natifs acides sodés. En effet, cette fonction amide C-terminale ne permet pas de générer des ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ comme les peptides acides, excepté si un résidu contenant au minimum une fonction hydroxyle se trouve dans la séquence peptidique. Même si ces ions sont produits à partir des deux formes, les peptides amides génèrent des ions de type y et a avec des intensités relatives beaucoup plus élevées que leurs homologues acides. Ces différences de fragmentations vont pouvoir ainsi être exploitées pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse résolue en énergie. Ces dernières vont permettre de séparer les deux peptides dans le but de caractériser la séquence amidée d'intérêt spécifiquement.

Suite à la détermination de la fonction C-terminale des peptides engagés dans des expériences MS/MS (amide ou acide), la cationisation au magnésium peut être suggérée afin d'apporter des améliorations de recouvrement de séquence.

4) Références

1. Mouls L, Subra G, Aubagnac JL, Martinez J, Enjalbal C. Tandem mass spectrometry of amidated peptides. *J Mass Spectrom*. 2006;41(11):1470-1483. doi:10.1002/jms.1118

2. Fujii T. Alkali-metal ion/molecule association reactions and their applications to mass spectrometry. 2000 May;19(3):111-38. doi: 10.1002/1098-2787(200005/06)19:3<111::AID-MAS1>3.0.CO;2-K.

3. Teesch LM, Adams J. Metal ions as special reagents in analytical mass spectrometry. *Org Mass Spectrom*. 1992;27(9):931-943. doi:10.1002/oms.1210270902

4. Anbalagan V, Patel JN, Niyakorn G, Van Stipdonk MJ. McLafferty-type rearrangement in the collision-induced dissociation of Li+, Na+ and Ag+ cationized esters of N-acetylated peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(4):291-300. doi:10.1002/rcm.912

5. Teesch LM, Adams J. Fragmentations of gas-phase complexes between alkali metal ions and peptides: metal ion binding to carbonyl oxygens and other neutral functional groups. *J Am Chem Soc*. 1991;113(3):812-820. doi:10.1021/ja00003a013

6. Wen D, Yalcin T, Harrison AG. Fragmentation reactions of Cu+-cationated α-amino acids. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1995;9(12):1155-1157. doi:10.1002/rcm.1290091214

7. Shields SJ, Bluhm BK, Russell DH. Fragmentation chemistry of [M + Cu]+ peptide ions containing an N-terminal arginine. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2000;11(7):626-638. doi:10.1016/S1044-0305(00)00128-8

8. Anbalagan V, Perera BA, Silva ATM, et al. Formation of [bn + 17 + Ag]+ product ions from Ag+ cationized native and acetylated peptides. *J Mass Spectrom*. 2002;37(9):910-926. doi:10.1002/jms.350

9. Lee VWM, Li H, Lau TC, Siu KWM. Structures of b and a Product Ions from the Fragmentation of Argentinated Peptides. *J Am Chem Soc*. 1998;120(29):7302-7309. doi:10.1021/ja9808245

10. Foreman DJ, Betancourt SK, Pilo AL, McLuckey SA. Novel peptide ion chemistry associated with gold (I) cationization: Preferential cleavage at lysine residues. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2018;427:114-122. doi:10.1016/j.ijms.2017.11.011

11. Küjckelmann U, Müller D, Weber C. Systematic studies of the mass spectrometric properties of alkaline earth metal cationized amino acids and peptides. *Journal of Molecular Structure*. 1997;412(1-2):135-139. doi:10.1016/S0022-2860(96)09641-X

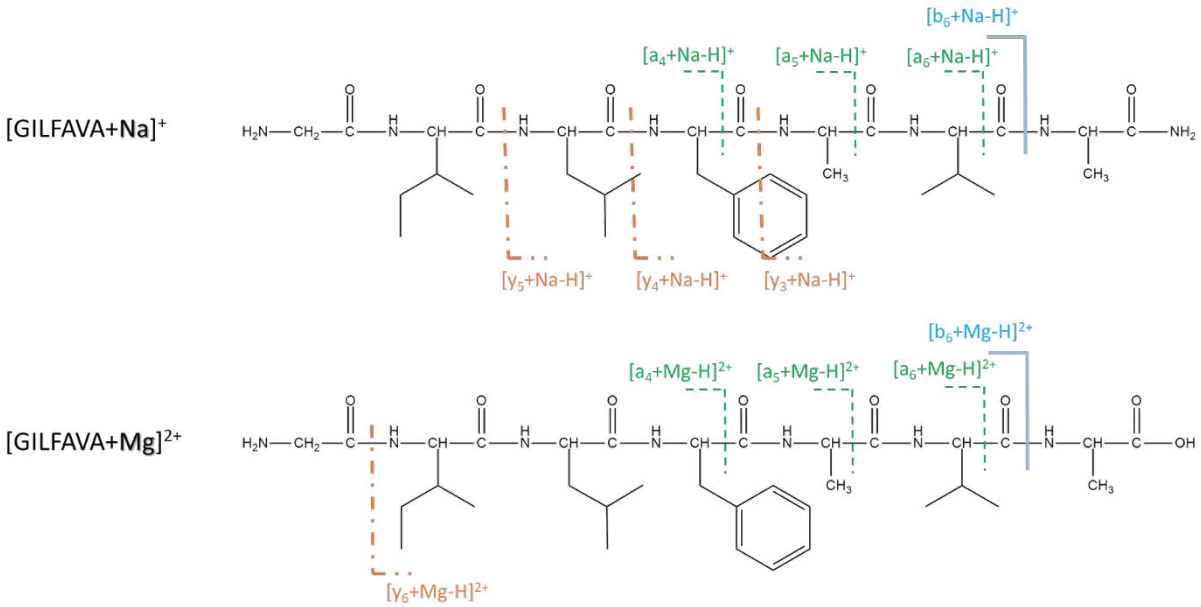
12. Teesch LM, Adams J. Intrinsic interactions between alkaline earth metal ions and peptides: a gas-phase study. *J Am Chem Soc*. 1990;112(11):4110-4120. doi:10.1021/ja00167a003

13. Nemirovskiy OV, Gross ML. Determination of calcium binding sites in gas-phase small peptides by tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1998;9(10):1020-1028. doi:10.1016/S1044-0305(98)00071-3

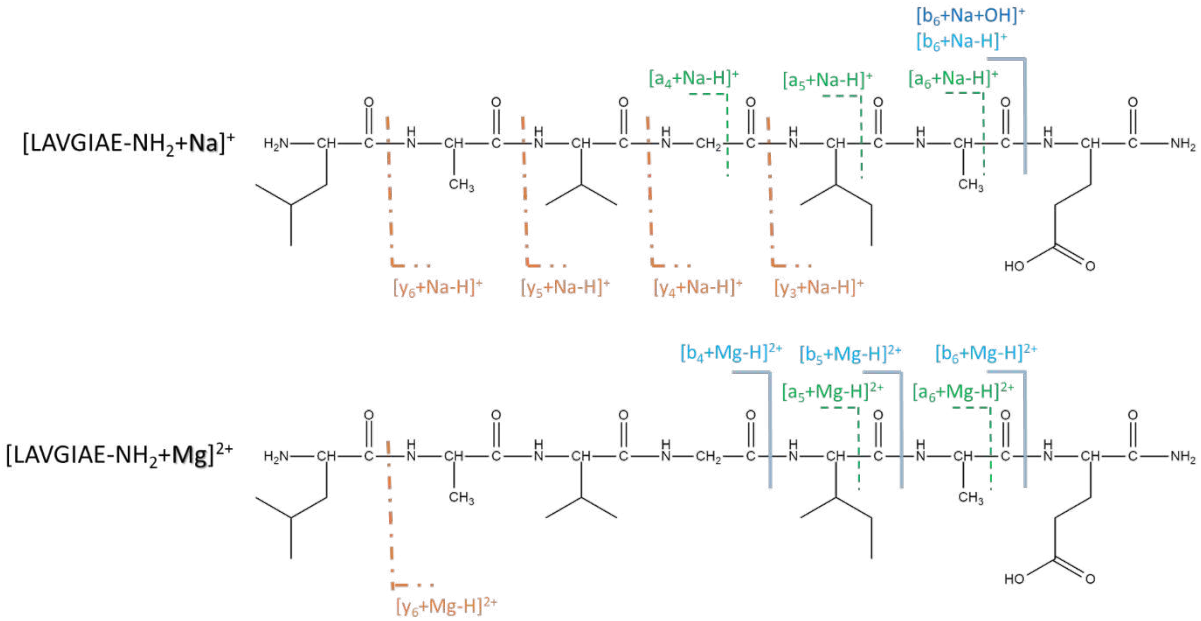
5) Annexes

Annexe 1.2-1 : Schémas illustrant les recouvrements de séquence de peptides cationisés par un ion Na^+ ou Mg^{2+}

Peptide 1b cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

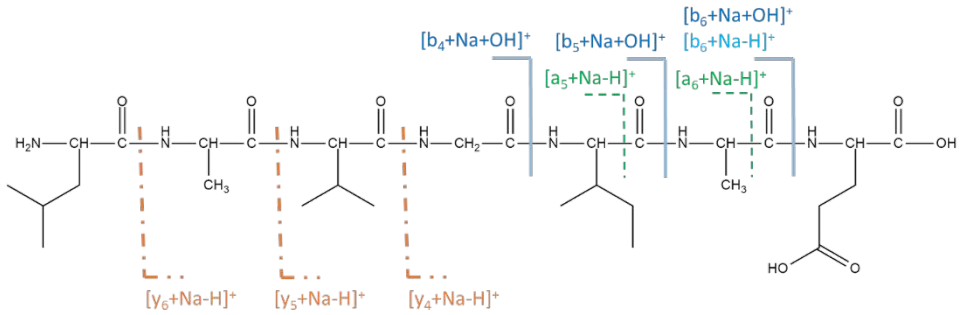


Peptide 2a cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

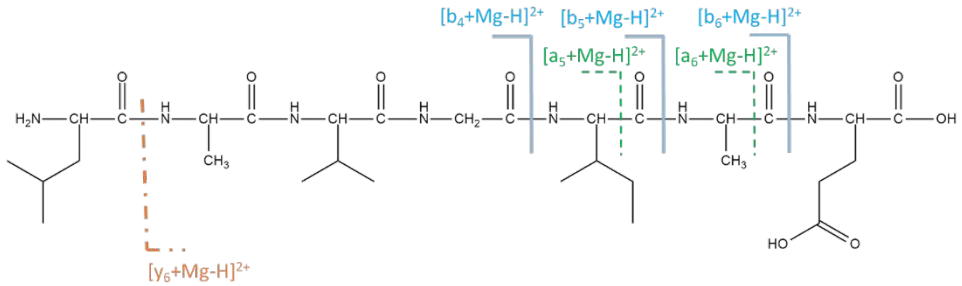


Peptide 2b cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

[LAVGIAE+Na]$^+$

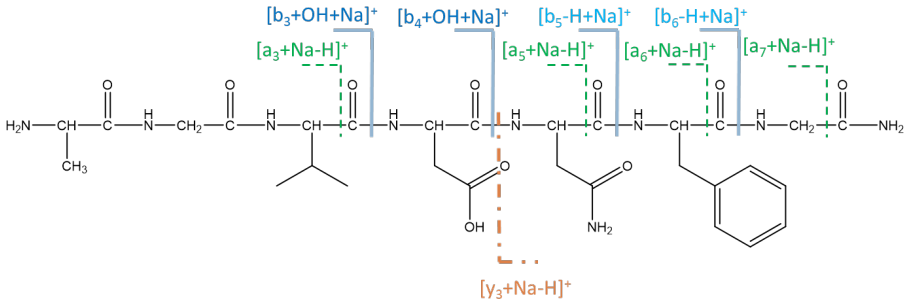


[LAVGIAE+Mg]$^{2+}$

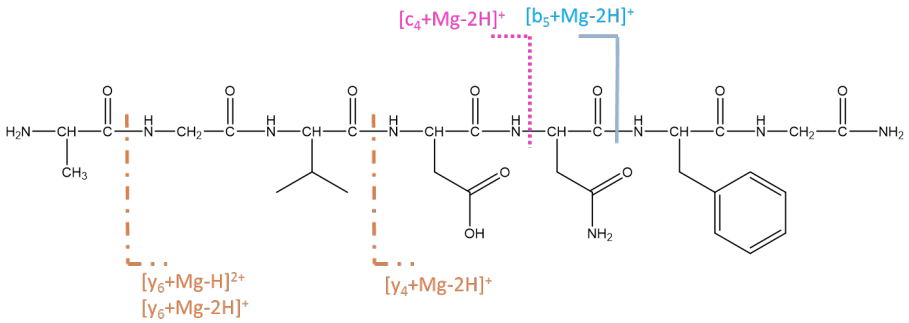


Peptide 3a cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

[AGVDNFG-NH_2+Na]$^+$

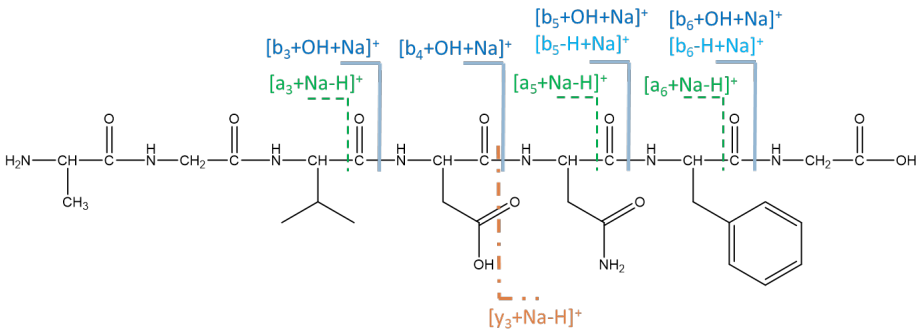


[AGVDNFG-NH_2+Mg]$^{2+}$

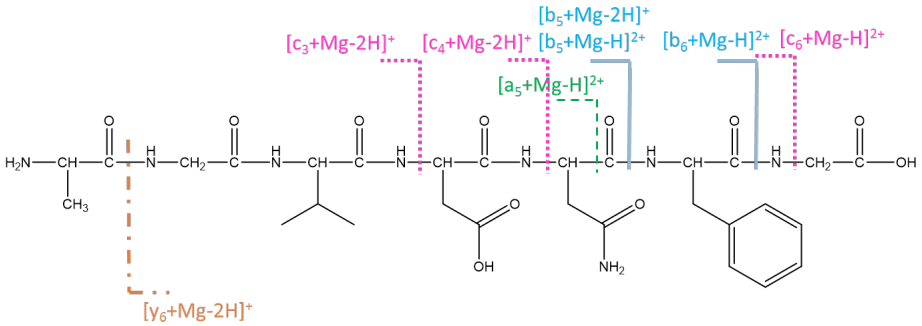


Peptide 3b cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

$[AGVDNFG+Na]^+$

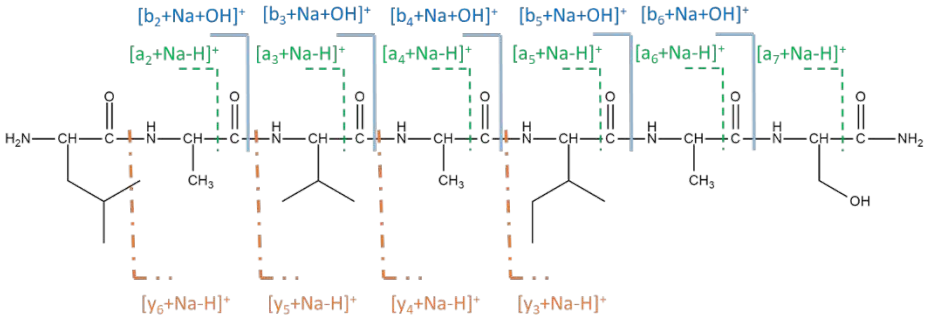


$[AGVDNFG+Mg]^{2+}$

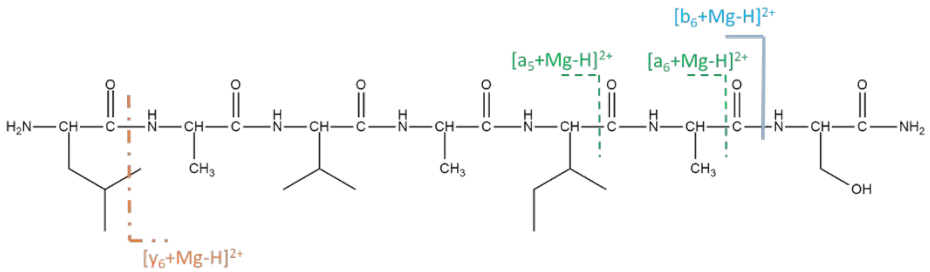


Peptide 4a cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

$[LAVAIAS\text{-}NH_2+Na]^+$

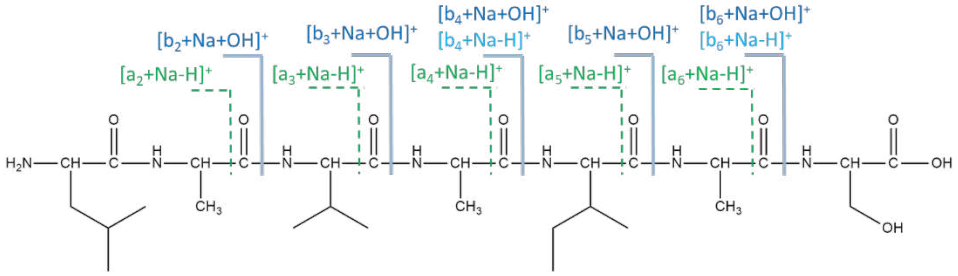


$[LAVAIAS\text{-}NH_2+Mg]^{2+}$

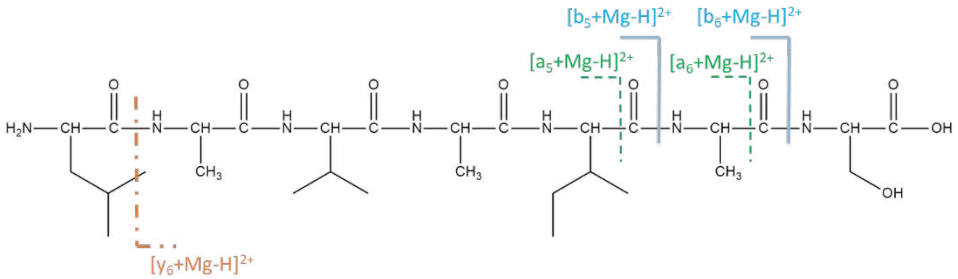


Peptide 4b cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

$[LAVAIAS+Na]^+$

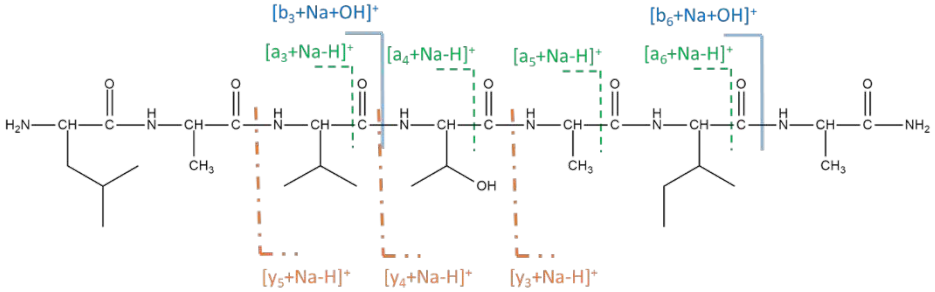


$[LAVAIAS+Mg]^{2+}$

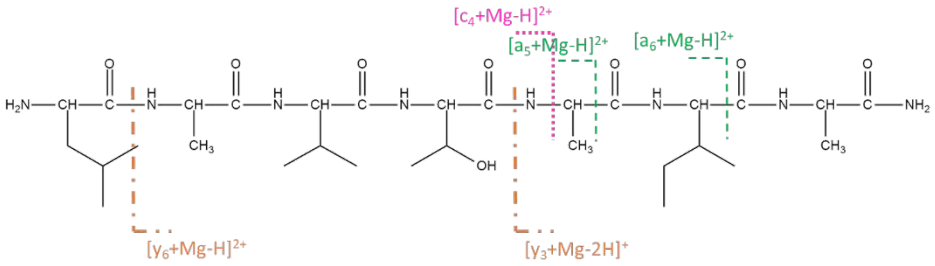


Peptide 5a cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

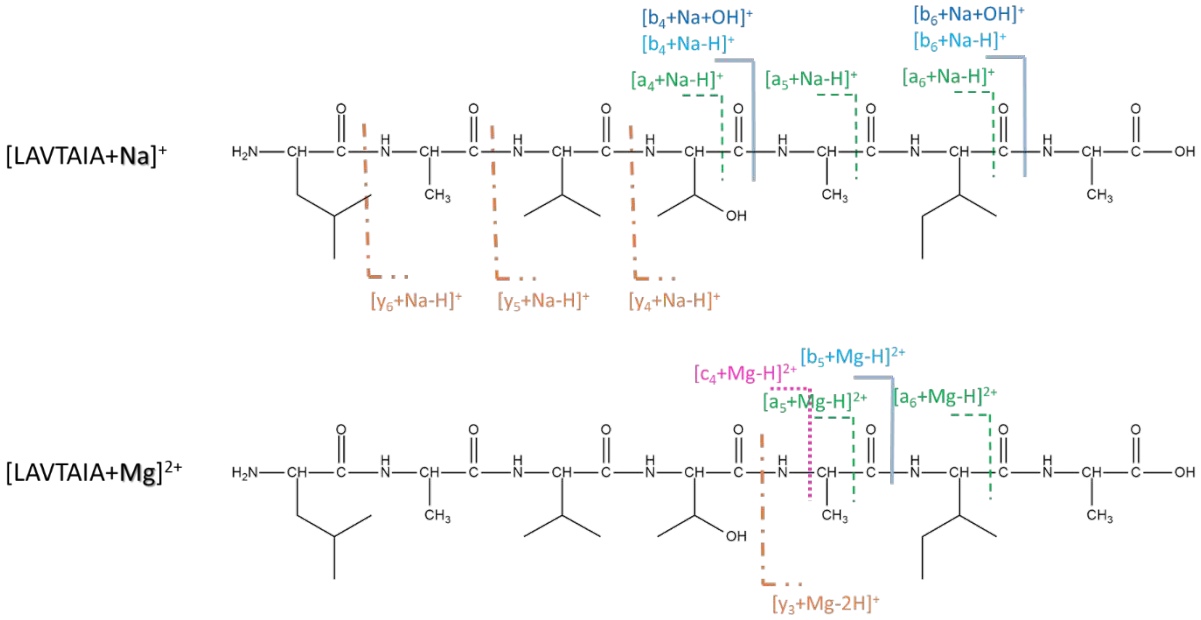
$[LAVTAIA\text{-}NH_2+Na]^+$



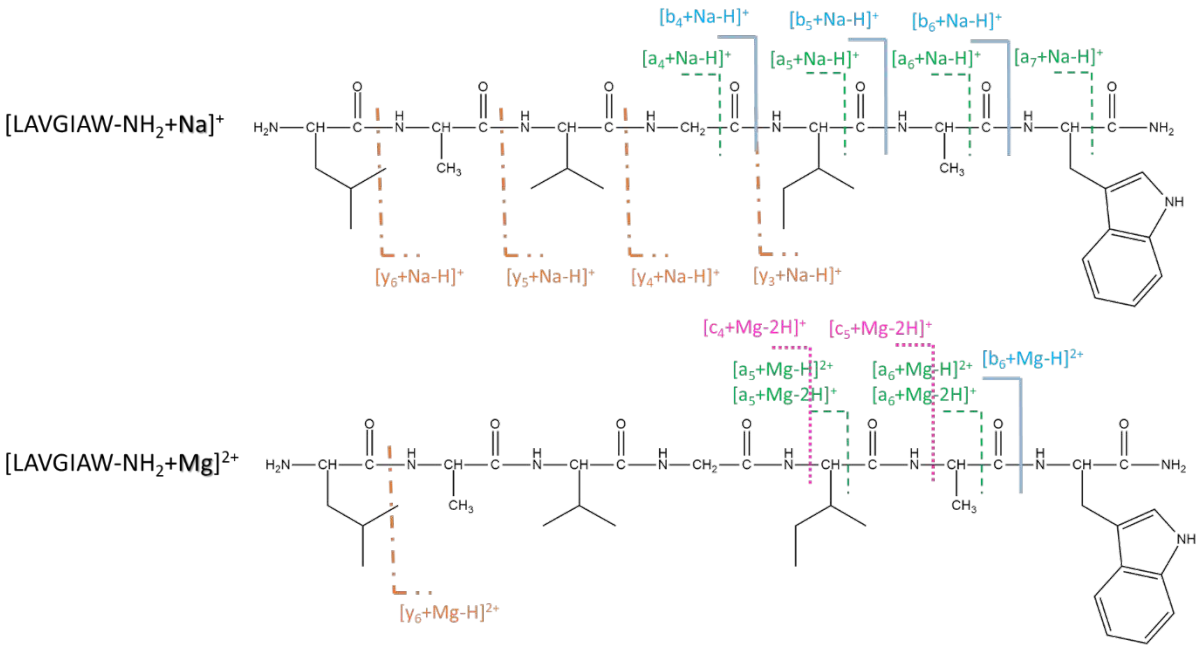
$[LAVTAIA\text{-}NH_2+Mg]^{2+}$



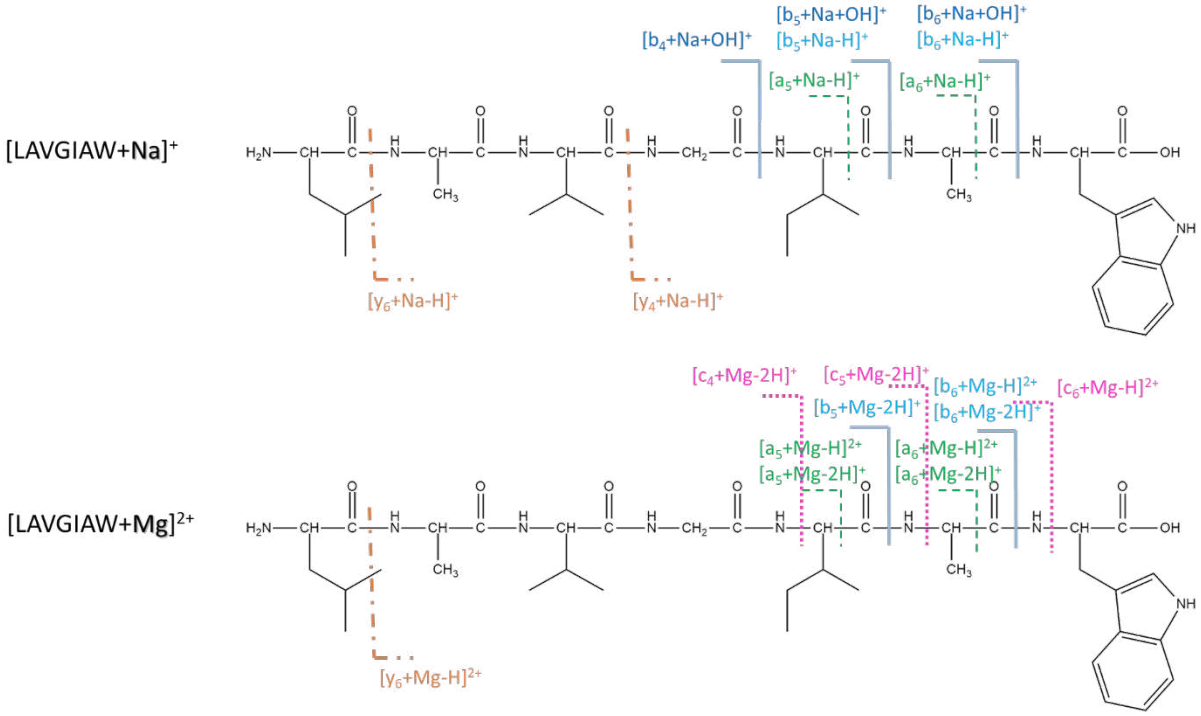
Peptide 5b cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}



Peptide 6a cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

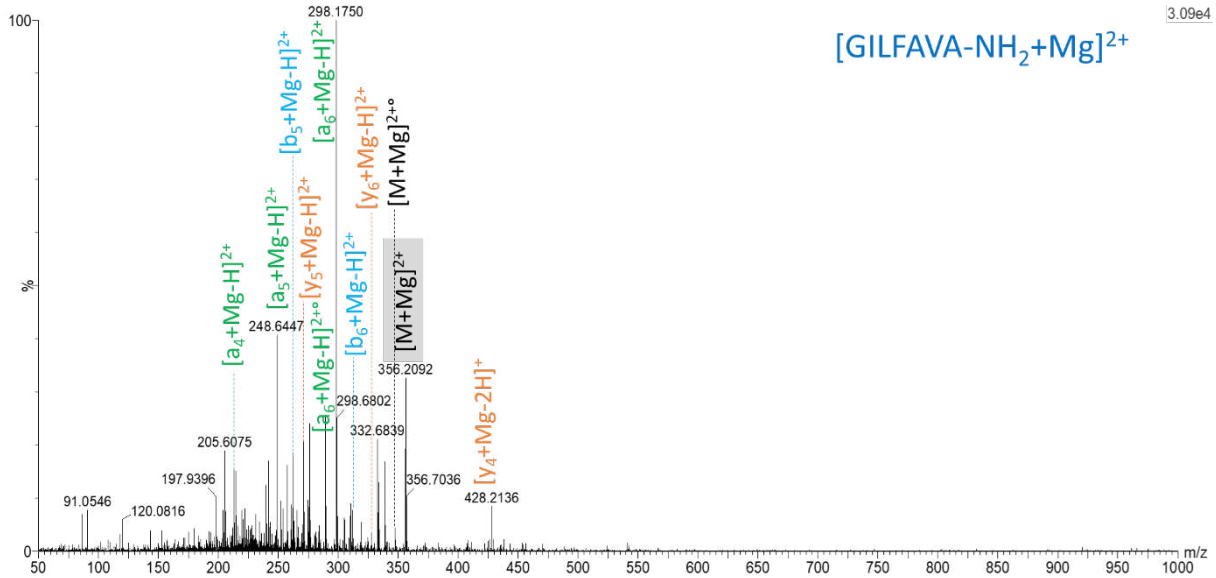


Peptide 6b cationisé par un ion Na^+ et Mg^{2+}

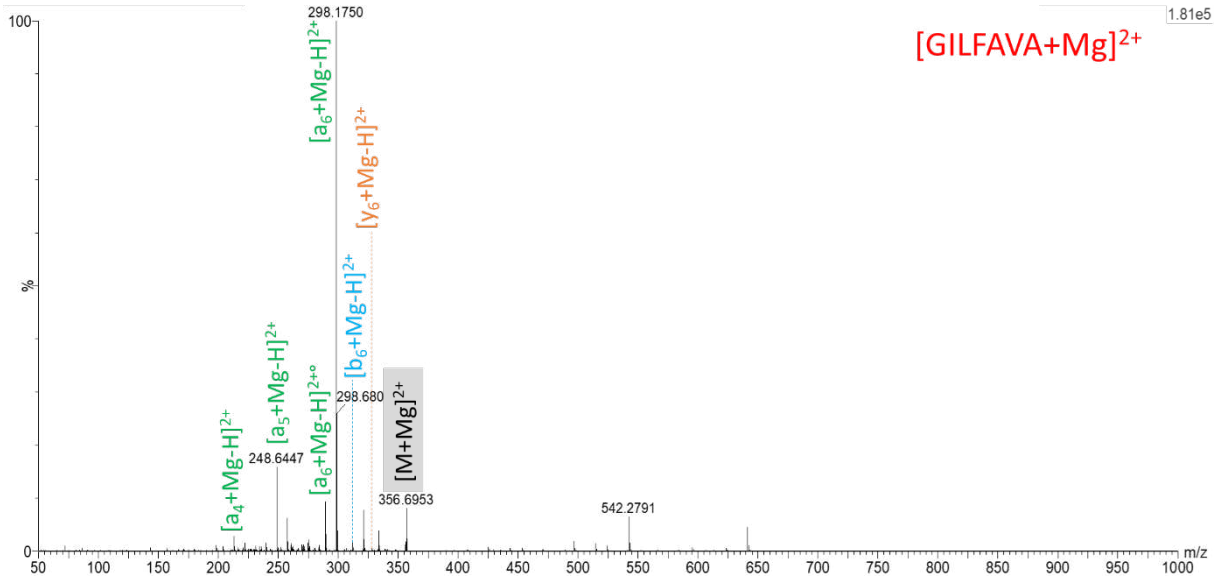


Annexe 1.2-1 : Spectres MS/MS des peptides du Tableau 1 cationisés par un ion Mg^{2+}

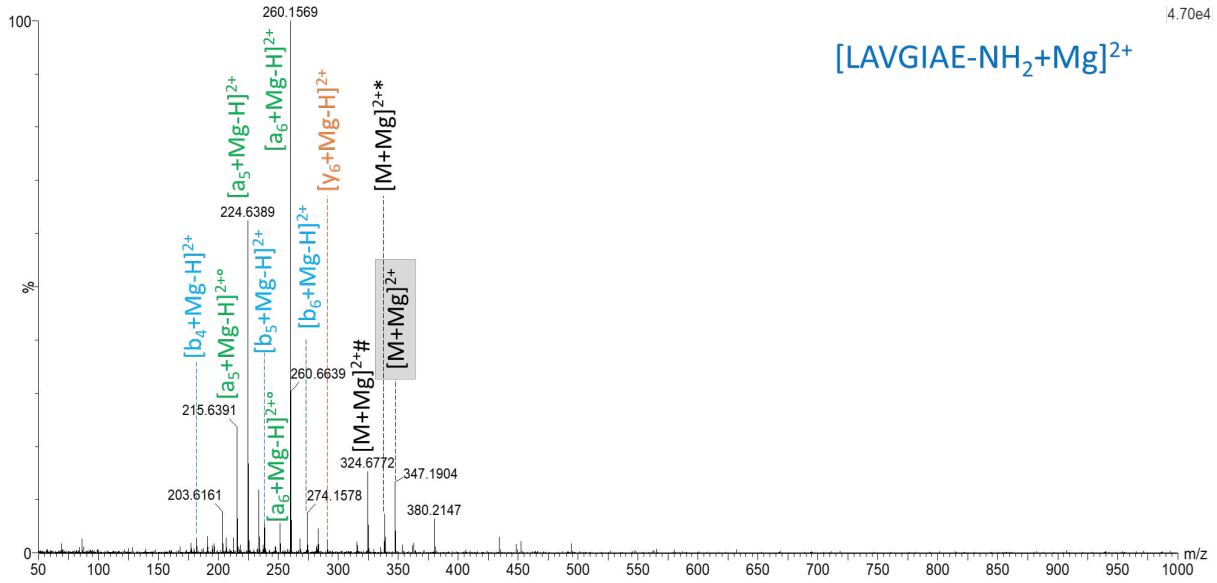
Peptide 1a



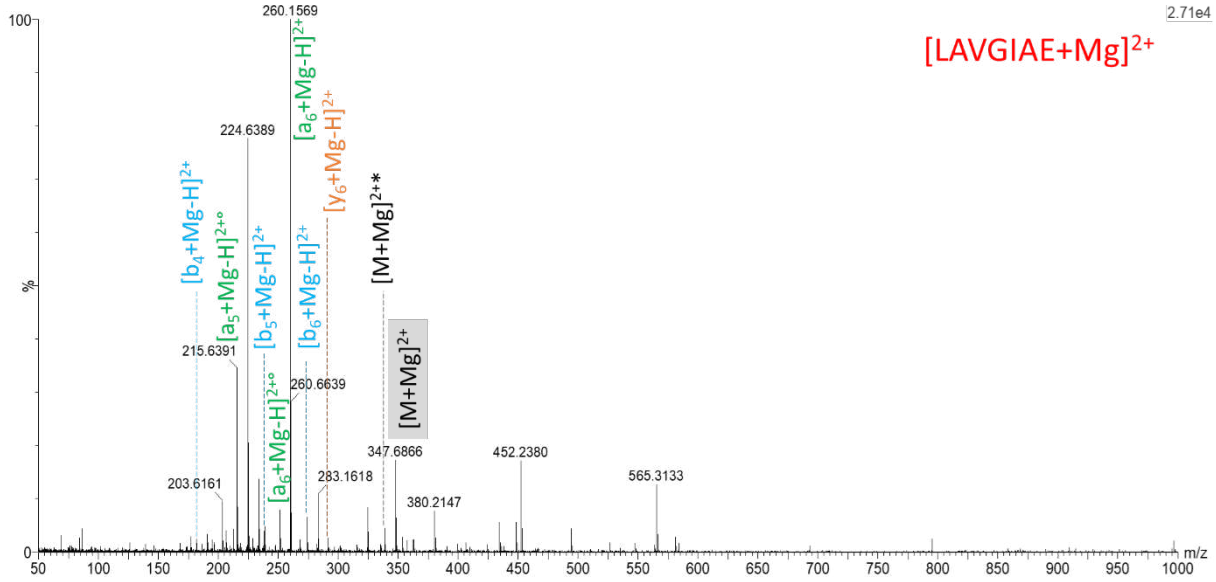
Peptide 1b



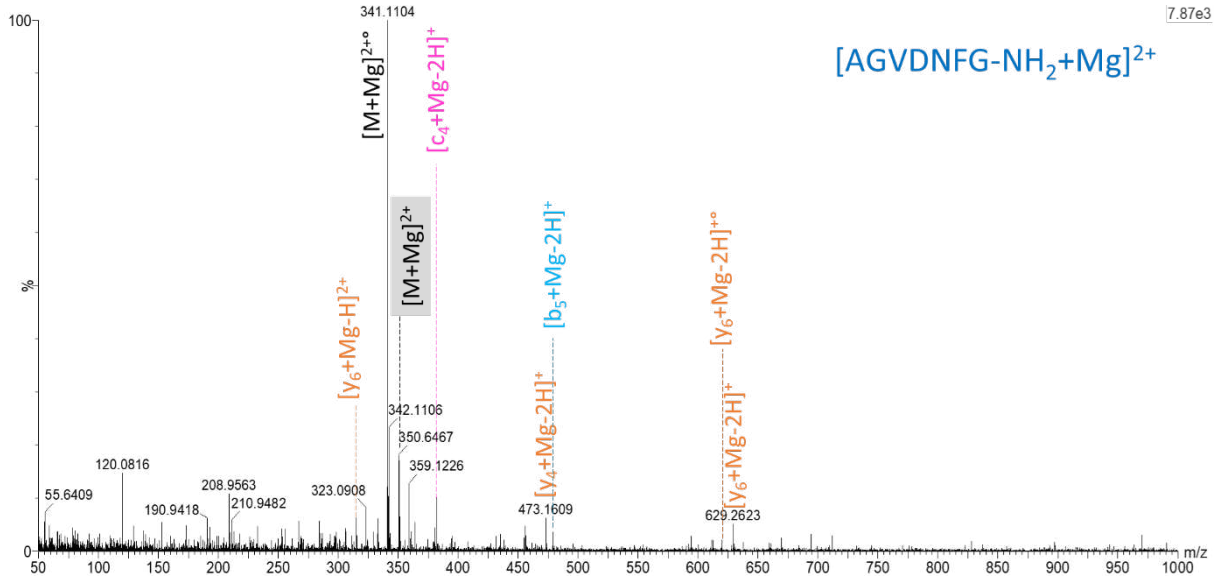
Peptide 2a



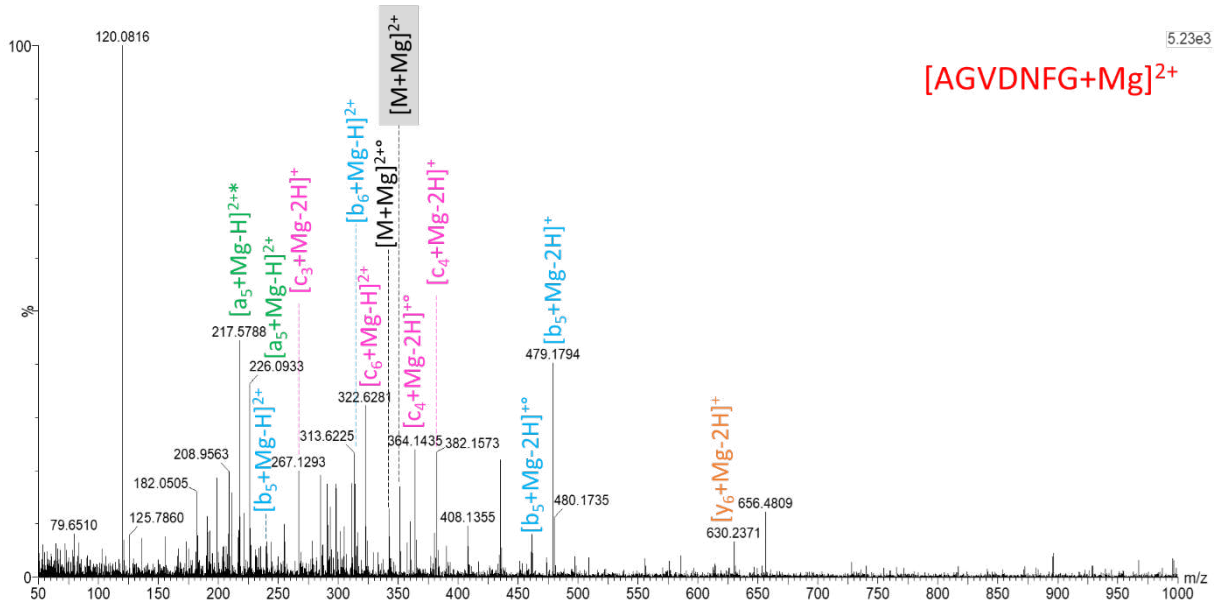
Peptide 2b



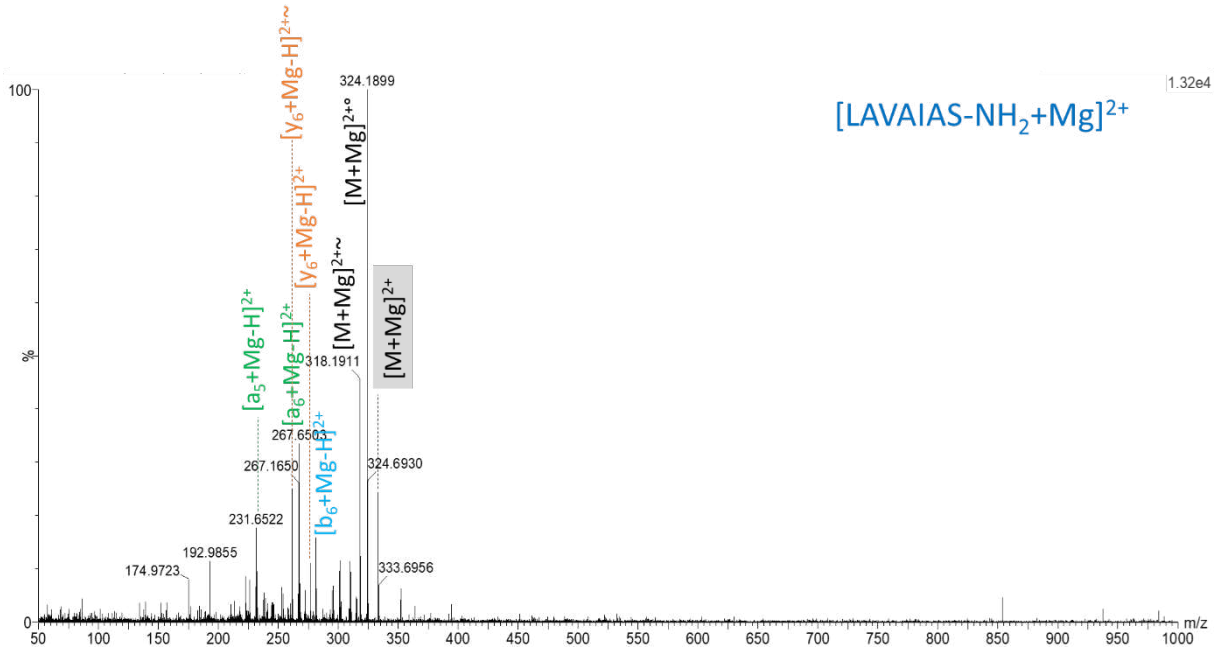
Peptide 3a



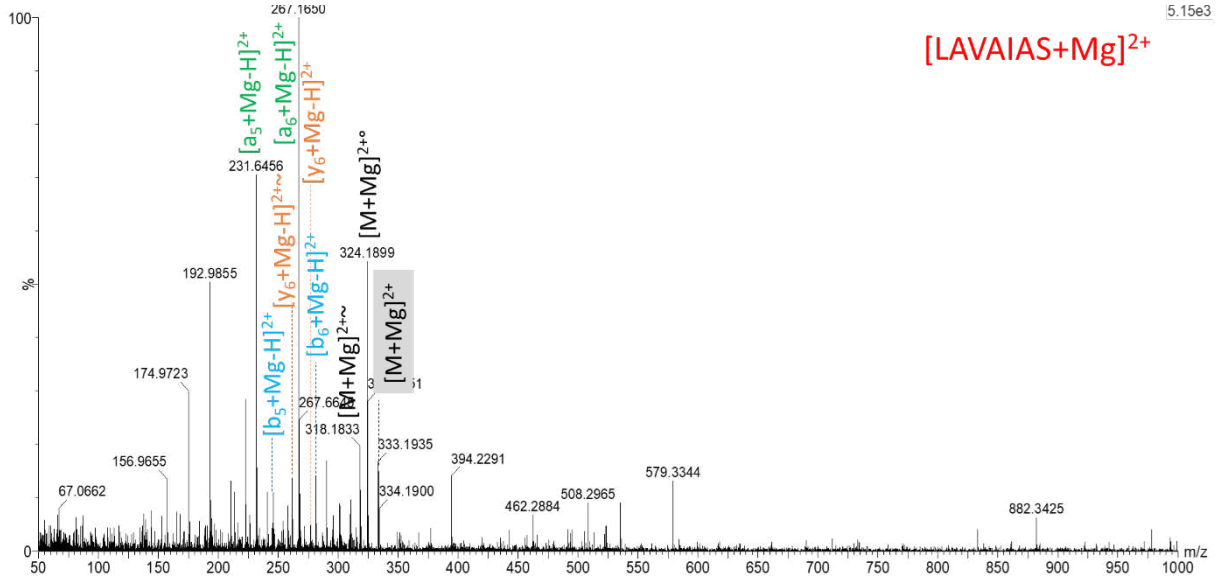
Peptide 3b



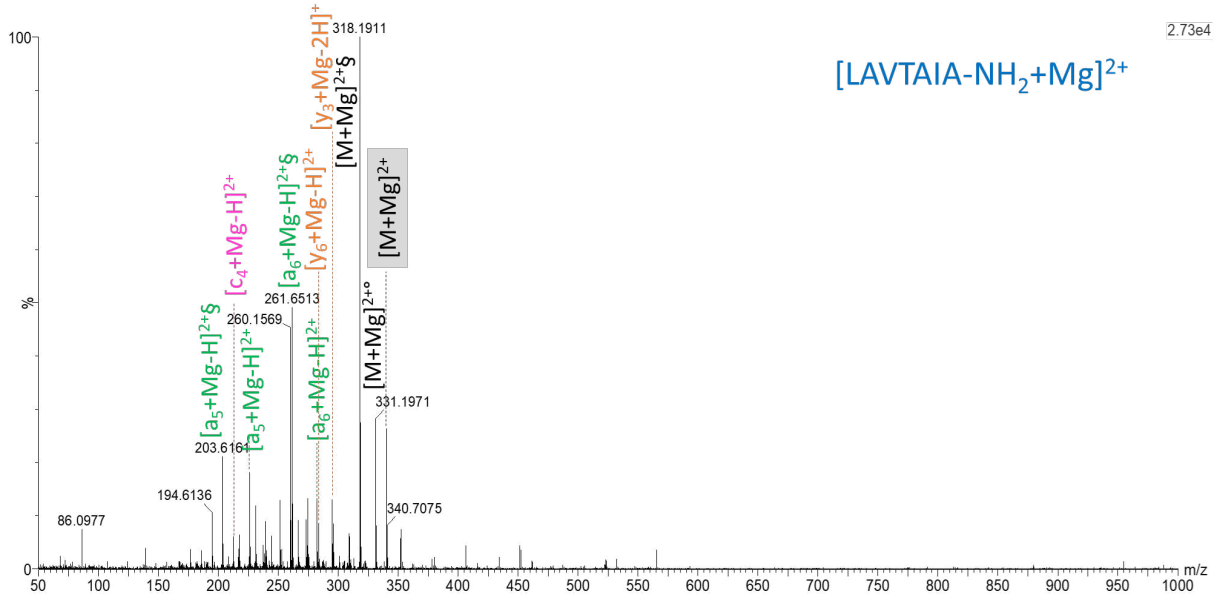
Peptide 4a



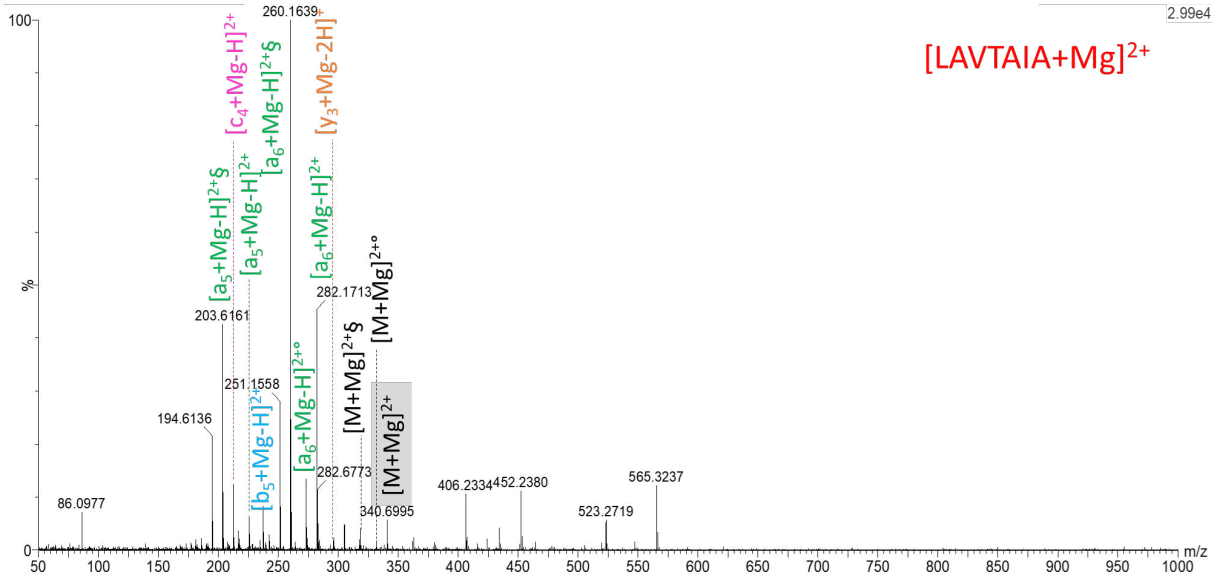
Peptide 4b



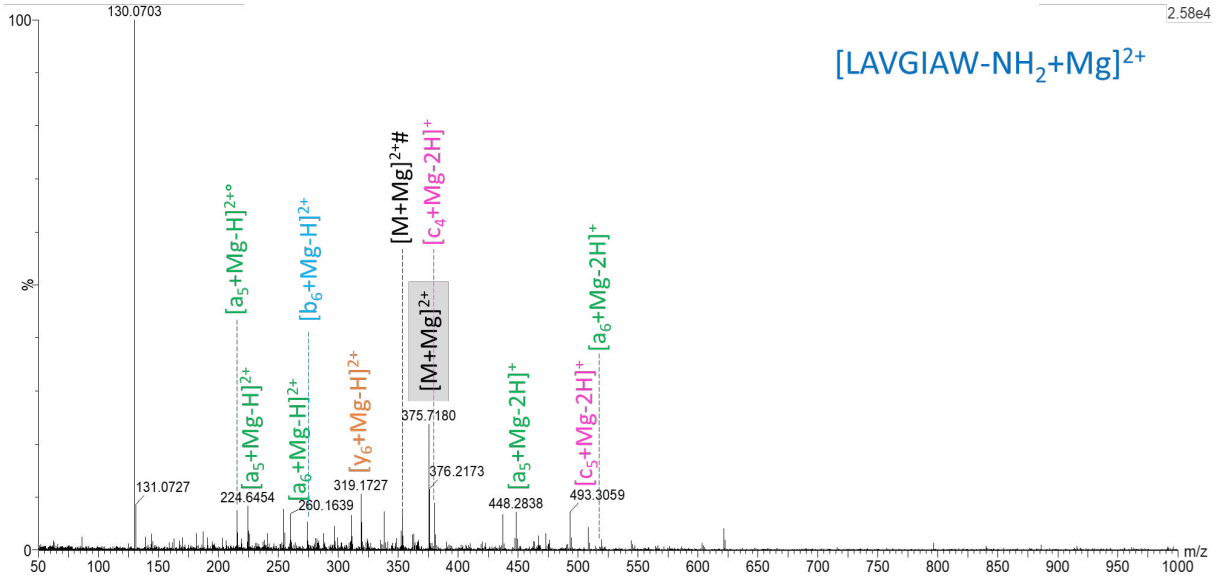
Peptide 5a



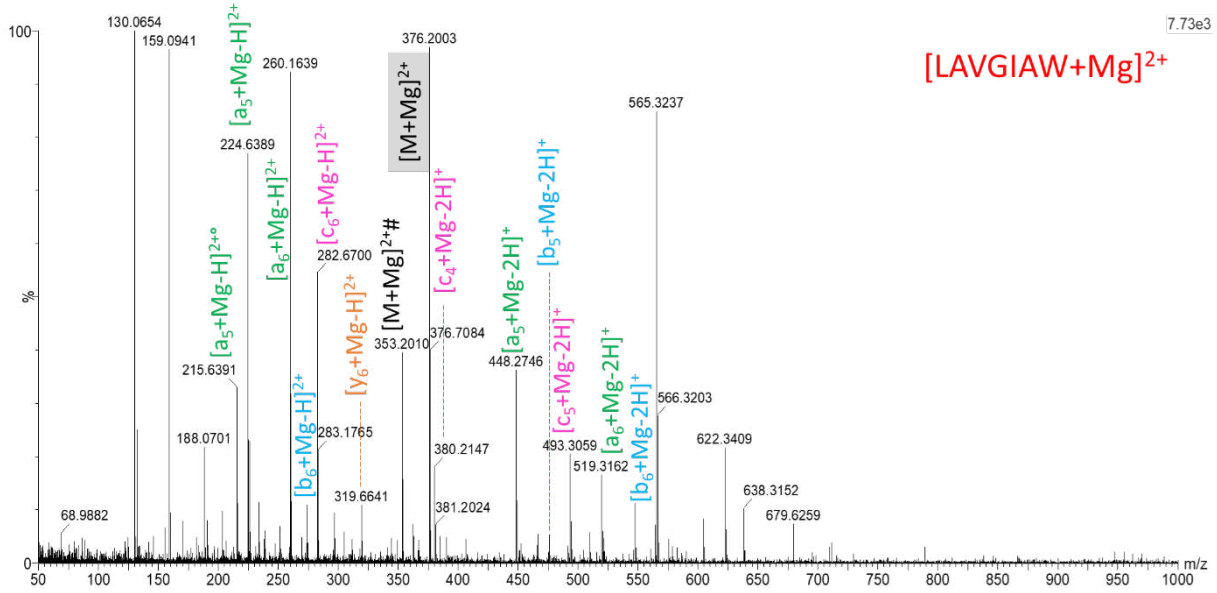
Peptide 5b



Peptide 6a



Peptide 6b



6) Liste Figures et Tableaux

Figure 1 : Comparaison des dissociations du peptide 1a du Tableau 1 cationisé par un ion Na^+ ou Mg^{2+}

Tableau 1 : Résultats de recouvrements de séquence suite à la dissociation des peptides sodés, en complément ou non de la cationisation par le métal alcalino-terreux Mg^{2+}

III. Chapitre 2

Caractérisation spécifique de peptides amides par la technique des ions survivants

III. Caractérisation spécifique de peptides amides par la technique des ions survivants

Les peptides amides et acides se différencient uniquement de 0.984 Da, résultant en une superposition des deux massifs isotopiques. A titre d'illustration, pour des petits peptides de 700 à 800 $g.mol^{-1}$, des spectromètres de masse d'une résolution de minimum 90 000 sont ainsi requis pour pouvoir différencier les massifs isotopiques des deux formes. Cependant, tous les laboratoires ne possèdent pas de spectromètres de masse avec une telle résolution. Par ailleurs, pour engager des expériences MS/MS dans le but de caractériser le peptide amide d'intérêt, la sélection de l'ion précurseur de ce dernier revient alors à également transmettre celui du peptide acide, générant ainsi des spectres chimériques contenant les ions fragments de chaque forme. En effet, la fenêtre de sélection de l'ion précurseur est très souvent suffisamment large pour que la forme acide soit aussi comprise (généralement 1 Da pour un analyseur quadripôlaire et plus large pour la transmission selon le temps de vol en configuration Tof/Tof). Il est néanmoins possible de restreindre cette fenêtre de sélection pour une meilleure spécificité de dissociation mais au détriment de la sensibilité ce qui n'est pas toujours envisageable avec des produits naturels. Au vu de ces éléments, la spectrométrie de masse résolue en énergie (ERMS), capable de séparer des composés isobares (isomères ou stéréoisomères) sous couvert de comportements de fragmentation distincts [1], a donc été appliquée à la problématique de séparation des peptides amides et acides. Afin de développer une méthode analytique extrapolable dans les laboratoires équipés de spectromètres de masse, un piège à ions basse résolution (amaZon speed, Bruker) a été choisi en raison de l'usage courant de cette technologie. Conformément aux résultats décrits dans le chapitre 1, les adduits sodium qui ont démontré des différences de fragmentation entre les deux formes acide/amide seront ainsi utilisés.

I) Usage de la spectrométrie de masse résolue en énergie

L'ERMS correspond à l'étude de la fragmentation d'ions en phase gazeuse. Elle implique donc l'activation d'ions générés en ESI, soit en source (ISD) soit en MS/MS par collision du précurseur sélectionné avec un gaz inerte [2,3,4]. Cette dernière méthode de CID basse énergie présente l'avantage de pouvoir contrôler la quantité d'énergie transférée à un ion, en faisant varier l'énergie de collision. Par cette méthode, les spectres de masse MS^2 sont enregistrés en fonction de l'énergie de collision appliquée, qui peut varier de 2 à 50-100 eV [4]. Il a été démontré qu'à ces faibles énergies, l'énergie cinétique transformée en énergie interne augmente de manière proportionnelle avec l'énergie de collision, bien que la relation entre l'énergie de collision et l'énergie interne moyenne est méconnue et semble varier d'un système à un autre [5-9]. Il est donc possible par cette technique d'obtenir des informations qualitatives sur l'évolution énergétique des voies de fragmentations des ions en phase gazeuse. Les résultats obtenus (courbes ERMS) sont spécifiques à chaque composé, et sont donc exploités pour la caractérisation d'isomères de position ou de stéréoisomères [10-13] . Cette technique a été exploitée pour des petites molécules organiques [2,3,14], des biomolécules [15–19], et a même été utilisée pour l'analyse d'échantillons biologiques (plasma) [20]. Même pour des molécules isobares qui génèrent des ions fragments identiques, l'ERMS donne la possibilité de les séparer en se basant sur des variations de fragmentations en fonction de l'énergie de collision appliquée [20].

La technique des ions survivants est une application de l'ERMS, qui permet de décrire l'efficacité de la fragmentation [21]. Pour les techniques d'ionisations douces, cette méthode a été développée par l'équipe de Pauw [22–24]. Le taux d'ions survivants (SY) est calculé à partir de l'intensité de l'ion précurseur et celles des ions fragments selon l'équation suivante :

$$SY = I(precurseur) \Big/ \Sigma I(fragments) + I(precurseur)$$

Cette méthode a été utilisée et adaptée à la problématique de séparation des peptides amides et acides dans le but de caractériser les peptides amides d'intérêt.

2) Révélation de la fonction amide C-terminale des peptides amides par l'utilisation de la technique des ions survivants

a) Publication (Analytical Biochemistry, 2022, DOI : 10.1016/j.ab.2022.114823)

Revealing C-terminal peptide amidation by the use of the survival yield technique

Elodie Logerot[1], Guillaume Cazals[1], Antony Memboeuf[2], Christine Enjalbal[1*]

[1] *Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, IBMM, Montpellier, France*
[2] *Univ Brest, CNRS, UMR 6521 CEMCA, Brest, France*

Keywords: Peptide, C-terminal amidation, Energy resolved mass spectrometry, Fragmentation, Recognition

ABSTRACT α-amidation of peptide sequences is a common post-translational modification in the living world. Since the majority of these C-terminal amidated peptides are bioactive, there is hence a great interest to identify and characterize them from biological matrices and natural extracts. Regarding conventional separative methods dedicated to peptides (such as HPLC or CE), elution protocols must be carefully optimized hampering straightforward LC-MS analysis of complex samples. From a mass spectrometry point of view, they are difficult to pinpoint owing to the only 1 Da mass difference between the post-translational amidated and the corresponding native carboxylated forms producing overlapping isotopic contributions of both molecular ions. To circumvent this analytical difficulty, usage of energy-resolved tandem mass spectrometry experiments and of the survival yield technique was investigated. Pair of peptides were thus dissociated in positive and negative mode according to the survival yield technique, in MS^2 and MS^3 experiments, in order to separate them giving a reliable MS/MS methodology to detect such post-translationally modified sequence.

1. Introduction

In the past few years, therapeutic peptides have gradually become established in the pharmaceutical world thanks to their various activities, but especially for their high specificity and selectivity [1–5]. Therefore, many researches are conducted to find potential therapeutic peptides in natural samples known to contain many bioactive molecules [6–10]. Natural resources such as venoms or plant extracts are successfully explored [7,11–13]. C-terminal amidation is a post-translational modification that can be considered as a signature of bioactivity since the majority of known amidated peptides are bioactive (antibacterial, antiviral, antifungal, antiparasitic or antitumoral activities) [12,14]. Thus, it could be interesting to be able to specifically detect these C-amidated peptides in biological samples and natural extracts.

Noteworthy, from a mass spectrometry point of view, C-terminal amidated peptides differ from C-terminal carboxylated ones by only 1 Dalton mass shift, which can also be related to side-chain mass difference between carboxylic acid or amide containing residues, like aspartic acid and asparagine or glutamic acid and glutamine for example. In contrast to the former backbone modification targeted for drug discovery purposes, the latter side-chain substitution mostly occurs from degradation reactions (mainly hydrolysis of lateral amide function upon sample storage or handling) leading to characterization analyses with another objective (peptide structural integrity assessment). In a general manner, it is important to be able to separate C-terminal amidated and carboxylated peptides in order to pinpoint and thereafter unambiguously characterize the two closely structural related species that can however exhibit different properties [10,15,16].

Regarding the separation of deamidation products leading to a carboxylic acid function either at the C-terminal position or in pending side-chains, conventional methods such as capillary electrophoresis [17,18] or liquid chromatography [19,20] can be adopted, but they may not be appropriate for the reliable distinction of the two types of peptides when analyzing natural products because of the high sample molecular complexity. High resolution mass spectrometry [21] can also be used for this purpose, but instruments allowing this characterization performance are not available in all laboratories due to their high costs. Using more common mass spectrometers such as ion trap or time of flight mass analyzers presenting medium-range resolutions, the two biomolecules isotopic distributions overlap due to the 1 Da difference between the two C-terminal functions. As a result, the chimeric isotopic cluster inhibits confident C-terminal amidated peptide characterization from the knowledge of molecular ions as well as from fragmentation patterns. Indeed, taking into account a mass unit resolution of precursor ion selection, both peptides would be fragmented in MS^2 experiments, and thus give false information about the presence and structure of C-amidated peptide sequence.

As a matter of fact, energy-resolved mass spectrometry allows, by using the survival yield technique, separating and quantifying isomeric or isobaric compounds in mixtures [22,23]. This method has therefore been investigated to tackle C-terminal carboxylated and amidated peptides separation in order to develop an analytical tool able to discriminate both compounds with standard readily accessible instruments. We report the results gathered from the study of 17 couples of model peptides designed to cover sequence diversity with a mass range below 1 000 Da. The aim of this mass spectrometry energy-resolved study was to provide a simple mean of evidencing C-terminal amidated peptide in a mixture with the corresponding native one. In this regard, MS^2 experiments from sodiated peptides were conducted and for most of the studied cases the plotted SY curves were clearly

separated allowing to assess the presence of amidated and carboxylated chains. Yet, the incidence of a carboxylic acid function in the side-chains of aspartic acid (D) or glutamic acid (E) was found to hamper such straightforward MS^2 separation of amidated and carboxylated sequences necessitating to pursue with MS^3 experiments in that case. Depending on the studied D/E containing-peptides, more investigation was sometimes required to unambiguously pinpoint the presence of an amide function. As such, some answers were obtained by conducting MS analyses in the negative mode with the recourse of anionizing agents belonging to the halogen family (chlorine, bromine and iodine). On the whole, 15 over 17 couples of peptides were successfully analyzed by the survival yield of cationized or anionized molecular ions in MS^2 or MS^3 experiments thus demonstrating the advantages and limitations of the developed methodology.

2. Experimental

2.1 Data acquisition

ESI experiments were conducted on an Ion Trap mass spectrometer AmaZon Speed (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Data were acquired with TrapControl software. CID fragmentation was performed, thanks to helium as collision gas, in positive and negative manual MS^n mode with Ultrascan resolution mode. Analyzer was calibrated with a speed of 32 500 m/z sec from 50 to 1000 Da. Acquisition times were 3 minutes, allowing the accumulation of 90 scans on average. Voltages acquisitions were set at 200 V for the capillary and adjusted for the sampling cone. Nitrogen constituted both nebulizing and desolvation gas. Drying gas was heated at 200°C with a flow rate of 5.0 $mL.min^{-1}$. According to previous results [24], the He trap pressure that is recommended by the manufacturer to be set at $4.6 \cdot 10^{-6}$ mbar was increased to $8.2 \cdot 10^{-6}$ mbar thanks to the Service Mode of the TrapControl software to achieve optimal curve separation (the SY curves recorded for 5 peptides of Table 1 under both pressure values are displayed in Figure S1.a-e in supplemental information). For MS^2 and MS^n experiments, samples were infused into the ESI source at a flow rate of 6 $\mu L.min^{-1}$ using injections by syringe pump. For each analyzed peptide, applied excitation voltages are chosen between two values from the non-fragmented parent ions to their complete dissociation. Between these two values, voltages were applied to obtain 15-20 points per curve. For positive mode, isolation width was set at 1.0 Da, and at 5.0 Da for negative mode. For both modes, excitation width was set at 10 Da, fragmentation time at 100 ms and delay time at 200 ms.

2.2 Data Processing

Data were first processed with DataAnalysis software. Mass spectra were smoothed with Savitsky Golay algorithm, with a 0.25 m/z width and 2 cycles. Mass-to-charge ratios as the corresponding intensities are taken from the mass list of present ions on the recorded spectra, to calculate the survival yield (SY) necessary to plot curves [23]. For quantitative analysis, SY data were fitted with the freely available SciDAVis software [25]. A 2-parameters Boltzman-type function was used to fit the data, namely equation (1):

$$SY = 1/(1+\exp((V_{coll}-V_{coll}(SY=0,5))/dV)) \quad \textbf{(1)}$$

Vcoll corresponding to the collision voltage applied (the independent controlled variable of our experiments), Vcoll(SY=0,5) being the collision voltage necessary to achieve 50% fragmentation (parameter of the model) and ΔV corresponding to the range of voltages on which the fragmentation varies from 0% (SY=1) to 100% (SY=0).

2.3 Sample preparation

Peptides were prepared in amidated and carboxylated forms according to conventional solid-phase protocols and purified by preparative reversed-phase HPLC. These peptides were dissolved in a mixture of 0.01 % trifluoroacetic H_2O/CH_3CN (50/50, v/v) for positive mode, or a mixture of H_2O/CH_3CN (50/50, v/v) for negative mode, at 5.10^{-5} M for injections from syringe pump or 5.10^{-4} M for injections from liquid chromatographic system (Flow Injection Analysis (FIA)), to obtain ion intensities high enough to plot curves. Samples were spiked, depending on the application, with NaCl, NaBr or NaI solutions (1:1 mole ratio).

2.4 Repeatability

The robustness of the method was also studied. For this purpose, the mass spectrometer was coupled to a liquid chromatographic system, and injections were performed under the FIA mode (20 µL injected). Thus, it was possible to automate acquisitions as soon as excitation voltages limits are known. The mass spectrometer was coupled to an ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) (UPLC Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA), which was driven by Chromeleon 6.8 software. The ionization source was directly linked to the output of the UHPLC injector, bypassing the stationary phase (FIA mode), but also reducing the tubing length (bypassing the column oven and the UV detector) to save analysis time. Therefore, no UV trace was recorded. A pre-column (SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC EVO C18 for 2.1mm, Phenomenex) positioned at the source entrance was nevertheless required to slightly increase the pressure value and thus to avoid any fluctuation that is prerequisite for repeatable analyses. To keep in phase with the acquisition time performed with the syringe pump (infusion mode), the applied gradient was designed to reach in FIA injection mode the same overall elution time (0 to 0.2 minutes at 100 $\mu L.min^{-1}$, from 0.2 to 4 minutes at 20 $\mu L.min^{-1}$ and from 4 to 5 minutes at 100 $\mu L.min^{-1}$). Thus, the extracted mass spectra were processed similarly from any mass chromatograms recorded over 3 minutes in both infusion and FIA modes.

3. Results and Discussion

Energy-resolved mass spectrometry (ERMS) allows the study of gas phase ion fragmentation. By modifying the CID acceleration voltage, the energy transferred to ions and their dissociation output can be controlled leading to the opening/closing of different fragmentation paths. Although ion fragmentation can be done in the ionization source (ISD) [26], tandem mass spectrometry with precursor activation by collision with an inert gas (CID) is preferred. Indeed, the latter permits a better control of transferred energy and accurate mass-selection of ions of interest, and thus a better

fragmentation monitoring. For each applied voltage, a survival yield is calculated by applying equation (1) [23]. This value corresponds to the precursor ions peak intensity divided by the intensity of all peaks present on the MS^2 spectrum (precursor and fragments). Precursor ion fragmentation can thus be followed, and survival yield curves are plotted as a function of acceleration voltage.

3.1 ESI(+)-MS^2 experiments from sodiated peptides

3.1.1 Cationization vs protonation for efficient SY methodology

To probe the separation of C-terminal amidated and carboxylated peptides using this tandem mass spectrometry technique, 17 pairs of peptides, which exhibit monoprotonated ions lower than 1000 Da, were selected as listed in Table 1. Differences in the fragmentation output for each peptide pair were required to achieve good SY curve separations. So far, the major reported distinction in the backbone dissociation of amidated and carboxylated protonated peptides relies on the production of two types of fragments. First, protonated carboxylated peptides generate $[b_{n-1}+OH]^+$ ions issued from C-terminal residue exclusion. Since this charge remote fragmentation (CRF) mechanism implies sequestering of the ionization proton on a basic site [27], it can only occur with peptides possessing one of the three basic residues within their sequence (R, K or H) [28]. Second, protonated amidated peptides do not show such specific C-terminal charge remote fragmentation whatever their amino acid composition [28] but exhibit instead a charge directed abundant ammonia loss from their molecular ions [29]. Despite such features, the overall dissociation profile of both peptide forms was too similar for distinguishing SY curves. According to previous results based on peptide cationization with sodium alkali metal, many distinctive fragment ions between amidated and carboxylated sequence were evidenced [30]. In particular, sodium molecular adduct of carboxylated peptides, whatever their amino acid composition, provided $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions [31–33]. Regarding amidated peptides cationized with sodium, they were found to produce more y-type ions than carboxylated peptides. Besides, although the C-terminal residue exclusion was surprisingly observed in the presence of hydroxyl or carboxylic acid lateral function (S, T, Y, D, E residues) [30,33], such signals were always detected with low intensities. Reckoning on sufficiently distinct dissociation paths, we therefore selected such experimental protocol with the formation of sodium adduct prior to MS^2 acquisition to plot survival yield curves (SY). The peptide pairs were classified into two categories in Table 1 to pinpoint the sequences that produce $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ solely from carboxylated chains or from both forms.

For pairs of peptides belonging to the first group (peptides 1 to 8 in Table 1), those in which the C-terminal amidated peptide does not produce ions from C-terminal residue exclusion whereas C-carboxylated peptides do, it is possible to separate the two species by plotting the yields of the surviving ions as shown in Figure 1.a for sequence n°1 in Table 1. The two curves are considered to be distinctly separated when the amide peptide SY is greater than 0 with the carboxylated peptide SY equal to 0 which is clearly the case for the dissociated sodiated ions and not for the protonated ones. More results are shown for peptides n°2 to 8 in supplemental information (Figures S2.a-g). As expected, all curves obtained from protonated peptide fragmentations were slightly different between the amidated and carboxylated forms but too close to allow a clear separation of the two species as shown in Figure 1.a and in Figures S3.a-e in supplemental information. Sodium cationization and the subsequent different fragmentation behaviors between amidated and native peptides were thus

efficient enough to induce a viable separation of both SY curves. Among other things concerning noticeable fragmentation behaviors, in addition to already described C-terminal residue exclusion well depicted in the literature [32,33,34], the greater abundance of sequence ions in the case of amidated sequences also accounted for the successful SY discrimination. The two MS^2 spectra of peptide n°1 recorded at a SY of 0.6 (Figure 1.b) showed many more a/b and y sodiated sequence ions for the amidated chain compared to the carboxylated counterpart [30,33]. As a matter of fact, all of these sodiated sequence ions, not only the expected y ions but also the a/b-type structures whose appearance is depicted along the SY curves in Figure 1.c, tend to be produced at very close energies for the amidated sequence. More spread out values were recorded for the native peptide meaning that increasing collision energies are required to successively observe all sequence ions. The other studied peptide pairs behaved similarly. Fragmentation of all sodiated amidated peptides was found to be much more energetic, requiring higher activation steps than for the native ones but thereafter triggering extensive competitive backbone fragmentations. For sodiated native peptides, these steps were lower in energy and the precursor ions gradually dissociated compared to the amidated one. Thus, for the same survival yield along the two recorded curves, the dissociation paths were always more numerous in the case of amidated chain than carboxylated ones. In an attempt to probe any gas-phase three dimensional structure between the amidated and carboxylated peptides maybe explaining the need to increase or decrease the energy rates required for fragment ion formation, ion mobility experiments were conducted but no probing results were obtained leaving this question opened (supporting info Figure S4).

For pairs of peptides belonging to the second group (peptides 9 to 17 in Table 1), the $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ fragment ion was produced from both sodium adduct of amidated and carboxylated forms. As stated previously, lateral function (-OH, $-CO_2H$) of S, T, Y, D or E residues present in these sequences induced additional fragmentation routes leading to residue exclusion. Despite the fact that this behavior may affect to some extent the SY output with fewer distinctive fragmentation paths between amidated and carboxylated peptides, two different results were actually observed. Indeed, 4 couples of peptides (peptides 9 to 12 in Table 1) were well differentiated whereas 5 pairs failed to be distinguished (peptides 13 to 17 in Table 1). No satisfactory explanation could be drawn from the experimental data to determine the sequence features accountable for SY curves separation failures.

3.1.2 SY method repeatability and reproducibility

We questioned the repeatability and reproducibility of such MS/MS method. A pair of synthetic peptides, as well as 5 mixtures of both representing a total of 5 samples, were analyzed 3 times the same day, as well as over 3 weeks (1 week interval between each analytical batch). For each data set, an average of the standard deviations obtained was calculated (See Figure S5 in supplemental information). Results were repeatable on the same day, but were not reproducible, certainly due to many experimental parameters such as fluctuating laboratory temperature or quencher gas pressure for instance that may alter the pressure inside the ion trap mass analyzer. Thus, for experiments conducted several days apart, the energies applied to the selected precursor ion must be readjusted to obtain the best possible results. Nevertheless, repeatable data allowed to validate the obtained SY results by this method easy to implement in any mass spectrometry laboratory.

3.1.3 SY method viability

Another question may arise from the necessity of disposing of both peptide forms to detect an amidated sequence in an unknown sample. As a general point of view, sodiated amide peptides always required more energy to dissociate compared to the corresponding native peptides. And for the protonated peptide survival yield curves, the opposite was true: native peptides necessitated more energy compared to amidated peptides to fragment. Consequently, there is one experimental condition allowing to totally eliminate one compound by its complete fragmentation. The second structure is maintained unaffected and is thus ready for further selective dissociation experiments. This analytical strategy has been recently described as "gas-phase collisional purification" [23]. Referring to this concept, we intentionally worked on sodiated ions subjected to high collision energies to eliminate the C-terminal carboxylated form leaving the amidated sequence intact that was the sole molecular ion included in the precursor ion isolation window. As shown in Figure 1, at high collision energies, the C-terminal carboxylated sodiated peptide n°1 was completely dissociated, and can no longer be included in the isolation window of the amidated peptide precursor ion. Hence, a MS^2 spectrum of the amidated peptide is obtained, with the guarantee that it will not contain ions from the fragmentation of the corresponding carboxylated one. This case cannot be obtained by dissociating the protonated peptides since at high collision energies, the native peptide was not fully dissociated and thus can contaminate MS^2 data obtained for the amide peptide. In addition to this advantage of working on sodiated peptides for a separation purpose, fragmenting them can provide more information on the sequence of unknown peptides in De Novo sequencing. Regarding characterization of low mass peptides only producing singly charged ions, sodiated peptides produce more sequence ions than protonated ones [30] with a better signal to noise ratio, allowing an easier sequencing. Using an ion trap mass spectrometer to perform De Novo sequencing is limited by the Low Mass Cutoff phenomenon inherent to CID activation (1/3 rule) [35]. As a result, low mass ions such as y_1, b_2 or immonium ions are not detected. However, this has no impact on the realization of SY curves. Indeed, dissociation of sodiated peptides does not generate immonium ions [31]. Moreover, amidated and carboxylated peptides have a very small mass difference (about 1 Da). Therefore, the Low Mass Cutoff will be the same for the two biomolecules, and thus has no impact on the plotted curves.

3.2 ESI(+)-MS^n experiments from sodiated peptides

As shown in Table 1, this method allowed a clear separation from MS^2 spectra of 71% of the studied amidated peptides from their carboxylated versions. For the peptide pairs that failed to be distinguished (about 29% corresponding to peptides n°13 to 17, see Figures S6.a-h in supplemental information), the nature of the produced fragment ions has an impact on the SY curve separation that is difficult to judge. As stated previously, C-terminal amidated and carboxylated peptides n°9 to 12 in Table 1 are distinguished even if they produce [bn-1+Na+OH]+ ions issued by C-terminal residue exclusion from the sodiated precursor ion. Similarly, residues with hydroxyl or carboxylic acid containing side-chains also induced feature fragmentation paths that may perturb the separation output. As a matter of fact, the overall peptide sequence composition is known to trigger additional competing dissociation behaviors [36] whose effect on SY curve plotting is difficult to predict. Although the presence of aspartic acid residue (D) for peptides n°15 to 17 in Table 1, and of glutamic acid residue (E) for peptides n°13 and 14 was found to notably affect the SY curves separation from MS^2 data, it was not possible to separate amidated and carboxylated peptides that contain an aspartic acid residue

in their sequence, whereas the separation of glutamic acid containing sequences was observed for some while not for others. For instance, in the case of peptide n°12 in Table 1 whose sequence possesses cysteine and glutamic acid, the former must have a greater effect on the fragmentation pathways compared to the latter, contributing to efficient separation of the SY curves. Aspartic acid was thus the sole residue whose presence whatever the sequence composition always hampered SY curve separation. When we look at the composition of sequences ranging from 2 to 35213 residues out of a total of 565928 recorded peptides and proteins, aspartic acid occupies the tenth position (on 20 natural residues) on the scale of residue occurrence whereas the less troublesome glutamic acid stands in the fifth position [37] (see Figure S7 in supplemental information). Therefore, survival yield method can be used in many cases to separate amidated and carboxylated peptides.

Anyway, for those peptides not separated from MS^2 experiments performed on the sodiated molecular ion peptides, there is an alternative since fragmentations are performed with an ion trap mass spectrometer permitting iterative dissociation stages (MS^n), as shown in the workflow in Figure 2.

Therefore, MS^3 experiments were conducted on some sodiated fragment ions that were recorded for both unseparated amidated and carboxylated peptides belonging to the second category (n°13 to 17 in Table 1). Moreover, some peptides that were already separated thanks to MS^2 experiments, were also engaged in similar MS^3 experiments as controls as shown in Figure 3. Just like results obtained from MS^2 spectra, working on sodiated ions allowed to differentiate amidated and carboxylated peptides (see Figures S8.a-c in supplemental information).

However, the selection of proper precursor ion to make these curves from MS^3 spectra is very important. Indeed, as we can see on Figure 3, ions deriving from N-terminal part of peptides (b-, a-, b+OH-type of ions) did not permit to differentiate the two analyzed biomolecules (see Figure S9.a-c in supplemental information). This was expected since the structural difference between amidated and carboxylated peptides resides in their C-terminal function. Therefore, it would be recommended to select fragment ions related to the peptide C-terminal part, namely y-type ions. Indeed, a fragmentation difference was evidenced between the two peptides. The fragmentation of [yn+Na-H]+ ions from amidated peptides caused the loss of $HCONH_2$ (45 Da). This fragmentation pathway was specific to C-terminal amidated peptides since the corresponding loss of formic acid (46 Da) was not observed in the case of y-type ions fragmentation issued from C-terminal carboxylated peptides (see Figures S10 in supplemental information). Separation of the two peptides thanks to MS^3 experiments conducted on sodiated y-type ions also allowed characterization of the uncontaminated amide peptide. Since experiments are performed on an ion trap mass spectrometer, it is possible to perform MS^n experiments from the fragmentation of the selected MS^3 ion to recover the sequence of the unknown peptide in De Novo sequencing [32,30,38,39]. Despite the striking results obtained from MS^3 data of most of aspartic acid and glutamic acid containing sequences, this method was found to present a limitation since some $[y_n+Na-H]+$ ions must be recorded in common between the two molecules, gave superimposed plotted curves not permitting the separation of amidated and carboxylated peptides (see Figures S9.d in supplemental information). This may be due to competitive dissociation effects according to the overall amino acid composition of the analyzed peptides, which still remain complex molecules for comprehensive dissociation knowledge.

As discussed, some couples of peptides failed to be separated in the positive mode with the SY technique using neither MS^2 nor MS^3 experiments (for instance peptide n°7 in Table 1). Alternatively, the negative mode was explored. Such additional protocol allowed to confirm the presence of an

amidated form as depicted in Figure 2 but the two couples of peptides that failed to be separated in the positive mode behaved similarly under negative ionization. Detailed protocols and results recorded in the negative mode are given in Figures S11 in Supplemental Information.

3.3 Quantification trials

Quantification was evaluated in positive mode from a pair of sodiated peptides (n°1 in Table 1) since the synthetic amidated peptide contained less than 1% of contamination with the carboxylated one. Five mixtures of the n°1 carboxylated and amidated peptides in Table 1, namely 'Pept1 acid:Pept1 amide' respectively, were prepared: 9:1, 7:3, 1:1, 3:7, 1:9. They were compared with samples of pure peptides 1:0 and 0:1. Triplicates of SY curves were measured within a day (intra-day experiments) and once a week during 3 weeks (inter-day experiments). SY curves for the two samples of pure n°1 amidated and carboxylated peptides in Table 1 were fitted separately with the following 2-parameters Boltzmann-type function (equation 2):

$$SY = 1/(1+\exp((V_{coll}-b)/c)) \quad (2)$$

parameters b and c obtained in those two cases, accounting for triplicate data points, were then used in a linear combination to fit the SY curves for all mixtures prepared, in the following way (equation 3):

$$SY_{mixture} = a.SY_{Pept1\ amide} + (1-a).SY_{Pept1\ acid} \quad (3)$$

The linear combination is supposed to describe correctly the SY curves for mixtures as the fragmentation energetics of a compound is not supposed to be modified by the presence of the other isobaric compound in the precursor ion cloud [40]. Therefore, parameter a may be related to the molar fraction of the amide form of peptide 1 in the sample mixture, while (1-a) should correspond to the molar fraction of acid form of peptide 1. All curves were fitted by using the Levenberg-Marquardt least-squares curve-fitting algorithm to obtain both b and c parameters for SY curves from pure samples as well as the a parameter in the case of mixtures. Experimental data points for all 7 samples (in triplicates), repeated 3 times in the same day and the resulting Boltzmann-type fitting functions are displayed in Figure 4 (left hand-side). Fits were achieved with coefficients of determination R^2>0.99944. A calibration curve was then plotted (top right diagram in figure 4), ln(a) vs ln(XPept1 amid) with XPept1 amid the molar fraction of amid form of peptide 1. A linear correlation was confirmed with the coefficient of determination R^2=0.999103 together with the analysis of residuals (bottom diagram). Fitting was performed with a focus on large molar fractions of the amide form (by considering less than 70 % of the acid form is present in the sample), hence discarding the data point at top right of the calibration curve diagram (9:1 acid/amid). Indeed, too large a contamination with the acid form (large values on the x axis, bottom diagram on the right Figure 4) leads to significant discrepancy from linearity (≈ 8% deviation of the calculated value from predicted with the linear model), which is most probably due to differences in ionization efficiencies. Nevertheless, in this case the quantification can be accurately performed as long as the acid form does not represent more than 70% of the peptide mixture. In the latter case this is the amide form that would be the contaminant and the same analysis should be repeated with the molar fraction of the acid form rather than with the amide form.

Although accurate quantification is usually performed with a short time delay after calibration (eventually using internal standard), we evaluated the performance of the method over a larger time period. To this end, the same experiments were conducted weekly during 3 weeks. All SY curves (including the above-mentioned intra-day data) were fitted using Equation 2 leading to R^2>0.99761. This suggests there is larger deviations/dispersion than with intra-day experiments (R^2>0.99944). The dispersion of data points is indeed larger, although the tendency remains the same as for intra-day experiments. A calibration curve was indeed plotted (optimal coefficients a as a function of the molar fraction XPept1 amide, see Figure S12 in supplemental information). The expected linear behavior is still confirmed with 4 data points as long as the molar fraction of the amide peptide remains larger than 0.7 (R^2=0.999974). Although the performance is lower as compared to intra-day experiments, the bias of recovered molar fraction from the fitting function does not exceed 0.0262 %, which confirms again quantitative information may be obtained. It should be noted that a logarithmic regression was successfully applied to the whole set of data points allowing to process the entire range of molar fractions (see Figure S13 in supplemental information).

4. Conclusion

The described energy-resolving mass spectrometry study was intended to provide a simple methodology of highlighting the presence of a C-terminal amidated peptide in a mixture with the corresponding native carboxylated sequence. Indeed, dissociation of C-terminal amidated and carboxylated peptide sodium adducts afforded most of the time different fragmentation paths allowing efficient separation by plotting distinct SY curves. Difficulties were encountered for 29% of the studied sequences (5 over 17 peptides). The SY curves that failed to be sufficiently differentiated were related to an overall dissociation pattern very similar for both peptide forms or to the presence of a carboxylic acid function in the side-chains of amidated peptides. Complementary MS^3 experiments from $[y_n+Na-H]^+$ fragment ions in the positive mode or from $[M-H]^-$ fragment ions issued from $[M+X]^-$ adducts (X=Cl, Br, I) in the negative mode allowed to resolve the issue. Among the 5 peptide sequences that failed to be separated from SY curves acquired in MS^2 in the positive mode, one peptide behaved well upon MS^3 dissociation in both positive and negative modes (peptide n°13 of Table 1), whereas 2 sequences were separated in MS^3 in the positive mode (peptides n°15 and 16 of Table 1). Combination of all these MS^2/MS^3 in the positive and negative modes permited to separate 15 over 17 pairs of studied peptides (88% of success). Finally, quantification was also attempted for mixtures prepared from one sequence. This model study showed that quantification was feasible in the positive ion mode.

References

[1] B.G. de la Torre, F. Albericio, Peptide Therapeutics 2.0, Molecules. 25 (2020) 2293. https://doi.org/10.3390/molecules25102293.

[2] J.L. Lau, M.K. Dunn, Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 26 (2018) 2700–2707. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052.

[3] F. Albericio, H.G. Kruger, Therapeutic peptides, Future Medicinal Chemistry. 4 (2012) 1527–1531. https://doi.org/10.4155/fmc.12.94.

[4] S.K. Dubey, S. Parab, N. Dabholkar, M. Agrawal, G. Singhvi, A. Alexander, R.A. Bapat, P. Kesharwani, Oral peptide delivery: challenges and the way ahead, Drug Discovery Today. (2021) S1359644621000015. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.001.

[5] L. Di, Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties, AAPS J. 17 (2015) 134–143. https://doi.org/10.1208/s12248-014-9687-3.

[6] S.P. Patil, A. Goswami, K. Kalia, A.S. Kate, Plant-Derived Bioactive Peptides: A Treatment to Cure Diabetes, Int J Pept Res Ther. 26 (2020) 955–968. https://doi.org/10.1007/s10989-019-09899-z.

[7] T. Uhlig, T. Kyprianou, F.G. Martinelli, C.A. Oppici, D. Heiligers, D. Hills, X.R. Calvo, P. Verhaert, The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation, EuPA Open Proteomics. 4 (2014) 58–69. https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.05.003.

[8] K.L. Wong, R.N.S. Wong, L. Zhang, W.K. Liu, T.B. Ng, P.C. Shaw, P.C.L. Kwok, Y.M. Lai, Z.J. Zhang, Y. Zhang, Y. Tong, H.-P. Cheung, J. Lu, S.C.W. Sze, Bioactive proteins and peptides isolated from Chinese medicines with pharmaceutical potential, Chin Med. 9 (2014) 19. https://doi.org/10.1186/1749-8546-9-19.

[9] A. Munawar, S. Ali, A. Akrem, C. Betzel, Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery, Toxins. 10 (2018) 474. https://doi.org/10.3390/toxins10110474.

[10] A. Stefanucci, M.P. Dimmito, G. Tenore, S. Pieretti, P. Minosi, G. Zengin, C. Sturaro, G. Calò, E. Novellino, A. Cichelli, A. Mollica, Plant-derived peptides rubiscolin-6, soymorphin-6 and their c-terminal amide derivatives: Pharmacokinetic properties and biological activity, Journal of Functional Foods. 73 (2020) 104154. https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104154.

[11] J. Giribaldi, T. Kazandjian, F.G. Amorim, G. Whiteley, S.C. Wagstaff, G. Cazals, C. Enjalbal, L. Quinton, N.R. Casewell, S. Dutertre, Venomics of the asp viper Vipera aspis aspis from France, Journal of Proteomics. 218 (2020) 103707. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103707.

[12] A.A. Rodríguez, A. Otero-González, M. Ghattas, L. Ständker, Discovery, Optimization, and Clinical Application of Natural Antimicrobial Peptides, Biomedicines. 9 (2021) 1381. https://doi.org/10.3390/biomedicines9101381.

[13] M.W. Pennington, A. Czerwinski, R.S. Norton, Peptide therapeutics from venom: Current status and potential, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 26 (2018) 2738–2758. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029.

[14] S.-B. Peng, X. Zhang, D. Paul, L.M. Kays, W. Gough, J. Stewart, M.T. Uhlik, Q. Chen, Y.-H. Hui, M.J. Zamek-Gliszczynski, J.A. Wijsman, K.M. Credille, L.Z. Yan, Identification of LY2510924, a Novel Cyclic Peptide CXCR4 Antagonist That Exhibits Antitumor Activities in Solid Tumor and Breast Cancer Metastatic Models, Mol Cancer Ther. 14 (2015) 480–490. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0850.

[15] D. Konopińska, G. Rosiński, W. Sobótka, Insect peptide hormones, an overview of the present literature, International Journal of Peptide and Protein Research. 39 (2009) 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1992.tb01548.x.

[16] Darrell Teh-Yung Liu, Deamidation: a source of microheterogeneity in pharmaceutical proteins, Trends in Biotechnology. 10 (1992) 364-369. https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90269-2.

[17] R. Haselberg, V. Brinks, A. Hawe, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis-mass spectrometry using noncovalently coated capillaries for the analysis of biopharmaceuticals, Anal Bioanal Chem. 400 (2011) 295–303. https://doi.org/10.1007/s00216-011-4738-4.

[18] E. Dominguez-Vega, T. De Vijlder, E.P. Romijn, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry as a highly selective tool for the compositional and site-specific assessment of multiple peptide-deamidation, Analytica Chimica Acta. 982 (2017) 122–130. https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.021.

[19] P.T. Jedrzejewski, A. Girod, A. Tholey, N. König, S. Thullner, V. Kinzel, D. Bossemeyer, A conserved deamidation site at asn 2 in the catalytic subunit of mammalian cAMP-dependent protein kinase detected by capillary LC-MS and tandem mass spectrometry: Site-specific deamidation of cAPK C-subunits, Protein Science. 7 (1998) 457–469. https://doi.org/10.1002/pro.5560070227.

[20] A.D. Carlson, R.M. Riggin, Development of Improved High-Performance Liquid Chromatography Conditions for Nonisotopic Detection of Isoaspartic Acid to Determine the Extent of Protein Deamidation, Analytical Biochemistry. 278 (2000) 150–155. https://doi.org/10.1006/abio.1999.4421.

[21] D.G. Schmid, F. von der Mülbe, B. Fleckenstein, T. Weinschenk, G. Jung, Broadband Detection Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry To Reveal Enzymatically and Chemically Induced Deamidation Reactions within Peptides, Anal. Chem. 73 (2001) 6008–6013. https://doi.org/10.1021/ac0104274.

[22] A. Memboeuf, L. Jullien, R. Lartia, B. Brasme, Y. Gimbert, Tandem Mass Spectrometric Analysis of a Mixture of Isobars Using the Survival Yield Technique, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 22 (2011) 1744–1752. https://doi.org/10.1007/s13361-011-0195-8.

[23] D. Jeanne Dit Fouque, A. Maroto, A. Memboeuf, Purification and Quantification of an Isomeric Compound in a Mixture by Collisional Excitation in Multistage Mass Spectrometry Experiments, Anal. Chem. 88 (2016) 10821–10825. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03490.

[24] A. Maroto, D. Jeanne Dit Fouque, A. Memboeuf, Ion trap MS using high trapping gas pressure enables unequivocal structural analysis of three isobaric compounds in a mixture by using energy-resolved mass spectrometry and the survival yield technique, J Mass Spectrom. 55 (2020) e4478. https://doi.org/10.1002/jms.4478.

[25] J. Bell, B.A. Eipper, R.E. Mains, Amidation, in: Encyclopedia of Endocrine Diseases, Elsevier, 2004: pp. 188–191. https://doi.org/10.1016/B0-12-475570-4/00089-5.

[26] D. Jeanne Dit Fouque, A. Maroto, A. Memboeuf, Structural analysis of a compound despite the presence of an isobaric interference by using in-source Collision Induced Dissociation and tandem mass spectrometry, J Mass Spectrom. 56 (2021). https://doi.org/10.1002/jms.4698.

[27] B.J. Bythell, I.P. Csonka, S. Suhai, D.F. Barofsky, B. Paizs, Gas-Phase Structure and Fragmentation Pathways of Singly Protonated Peptides with N-Terminal Arginine, J. Phys. Chem. B. 114 (2010) 15092–15105. https://doi.org/10.1021/jp108452y

[28] M. Dupré, S. Cantel, J. Martinez, C. Enjalbal, Occurrence of C-Terminal Residue Exclusion in Peptide Fragmentation by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23 (2012) 330–346. https://doi.org/10.1007/s13361-011-0254-1

[29] L. Mouls, J.-L. Aubagnac, J. Martinez, C. Enjalbal, Low Energy Peptide Fragmentations in an ESI-Q-Tof Type Mass Spectrometer, J. Proteome Res. 6 (2007) 1378–1391. https://doi.org/10.1021/pr060574o.

[30] E. Logerot, C. Enjalbal, Dissociation Pattern of Sodiated Amide Peptides as a Tool for De Novo Sequencing, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 31 (2020) 2328–2337. https://doi.org/10.1021/jasms.0c00269.

[31] X.-J. Tang, P. Thibault, R.K. Boyd, Fragmentation reactions of singly and doubly charged alkali metal ion-peptide complexes: A reaction specific toC-terminal arginine residues, Org. Mass Spectrom. 28 (1993) 1047–1052. https://doi.org/10.1002/oms.1210281012.

[32] T. Lin, A.H. Payne, G.L. Glish, Dissociation pathways of alkali-cationized peptides: Opportunities for C-terminal peptide sequencing, J Am Soc Mass Spectrom. 12 (2001) 497–504. https://doi.org/10.1016/S1044-0305(01)00234-3.

[33] K.B. Tomer, L.J. Deterding, C. Guenat, Collisionally activated dissociation spectra of sodiated peptides and peptide amides, Biol. Mass Spectrom. 20 (1991) 121–129. https://doi.org/10.1002/bms.1200200305.

[34] W.Y. Feng, S. Gronert, K.A. Fletcher, A. Warres, C.B. Lebrilla, The mechanism of C-terminal fragmentations in alkali metal ion complexes of peptides, International Journal of Mass Spectrometry. 222 (2003) 117–134. https://doi.org/10.1016/S1387-3806(02)00958-2.

[35] R. Kiyonami, T. Schlabach, J. Schwartz, K. Miller, L. Taylor, Analysis of Low Mass Ions in Peptide Fragmentation Spectra With a Linear Ion Trap, (n.d.) 1.

[36] Maux D, Enjalbal C, Martinez J, Aubagnac JL. New example of proline-induced fragmentation in electrospray ionization mass spectrometry of peptides. Rapid Commun Mass Spectrom. 2002;16(15):1470-5. doi: 10.1002/rcm.741.

[37] M.L. Lingdong Quan, CID,ETD and HCD Fragmentation to Study Protein Post-Translational Modifications, Mod Chem Appl. 01 (2013). https://doi.org/10.4172/2329-6798.1000e102.

[38] T. Lin, G.L. Glish, C-Terminal Peptide Sequencing via Multistage Mass Spectrometry, Anal. Chem. 70 (1998) 5162–5165. https://doi.org/10.1021/ac980823v.

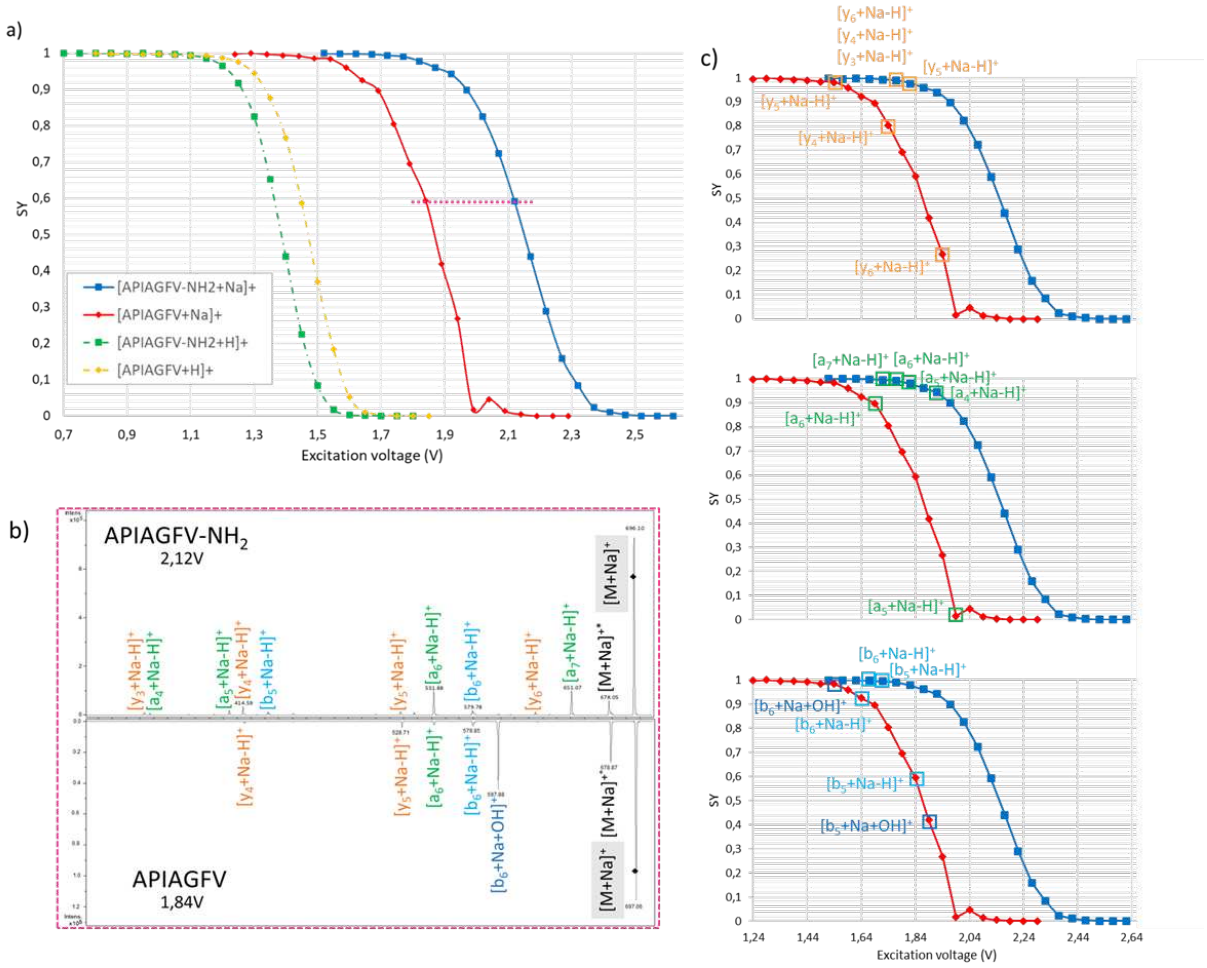
[39] L.C.M. Ngoka, M.L. Gross, Location of alkali metal binding sites in endothelin A selective receptor antagonists, cyclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu) and cyclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Ile-Leu), from multistep collisionally activated decompositions, J. Mass Spectrom. (2000) 12.

[40] D. Jeanne Dit Fouque, A. Maroto, A. Memboeuf, Internal Standard Quantification Using Tandem Mass Spectrometry of a Tryptic Peptide in the Presence of an Isobaric Interference, Anal. Chem. 90 (2018) 14126–14130. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05016.

Table 1:

		Production of $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ fragment ion from		ESI(+)		ESI(-)
N°	Sequences	carboxylated peptides (noted XXXX)	amidated peptides (noted XXXX-NH_2)	Peptides separation (MS^2 data from $[M+Na]^+$)	Peptides separation (MS^3 data from y ions)	Peptides separation (MS^3 data from $[M-H]^-$)
1	APIAGFV	✓	X	✓	✓	✓
2	GILFAVA	✓	X	✓	✓	✓
3	FPARVGI	✓	X	✓	-	-
4	IFAVLGA	✓	X	✓	✓	✓
5	LAVGIAW	✓	X	✓	-	-
6	IVAVLGA	✓	X	✓	-	-
7	LAVGIAR	✓	X	✓	X	✓
8	FFAVAIA	✓	X	✓	-	-
9	LAVAIAS	✓	✓	✓	✓	✓
10	LGHVASLY	✓	✓	✓	-	-
11	LAVTAIA	✓	✓	✓	✓	✓
12	FPCEAFA	✓	✓	✓	-	-
13	LAVGIAE	✓	✓	X	✓	✓
14	TNGVEYA	✓	✓	X	X	X
15	AGVDNFG	✓	✓	X	✓	X
16	FDAVAIA	✓	✓	X	✓	X
17	FPCDAFA	✓	✓	X	X	X

Figure 1:



* loss of NH_3

Figure 2:

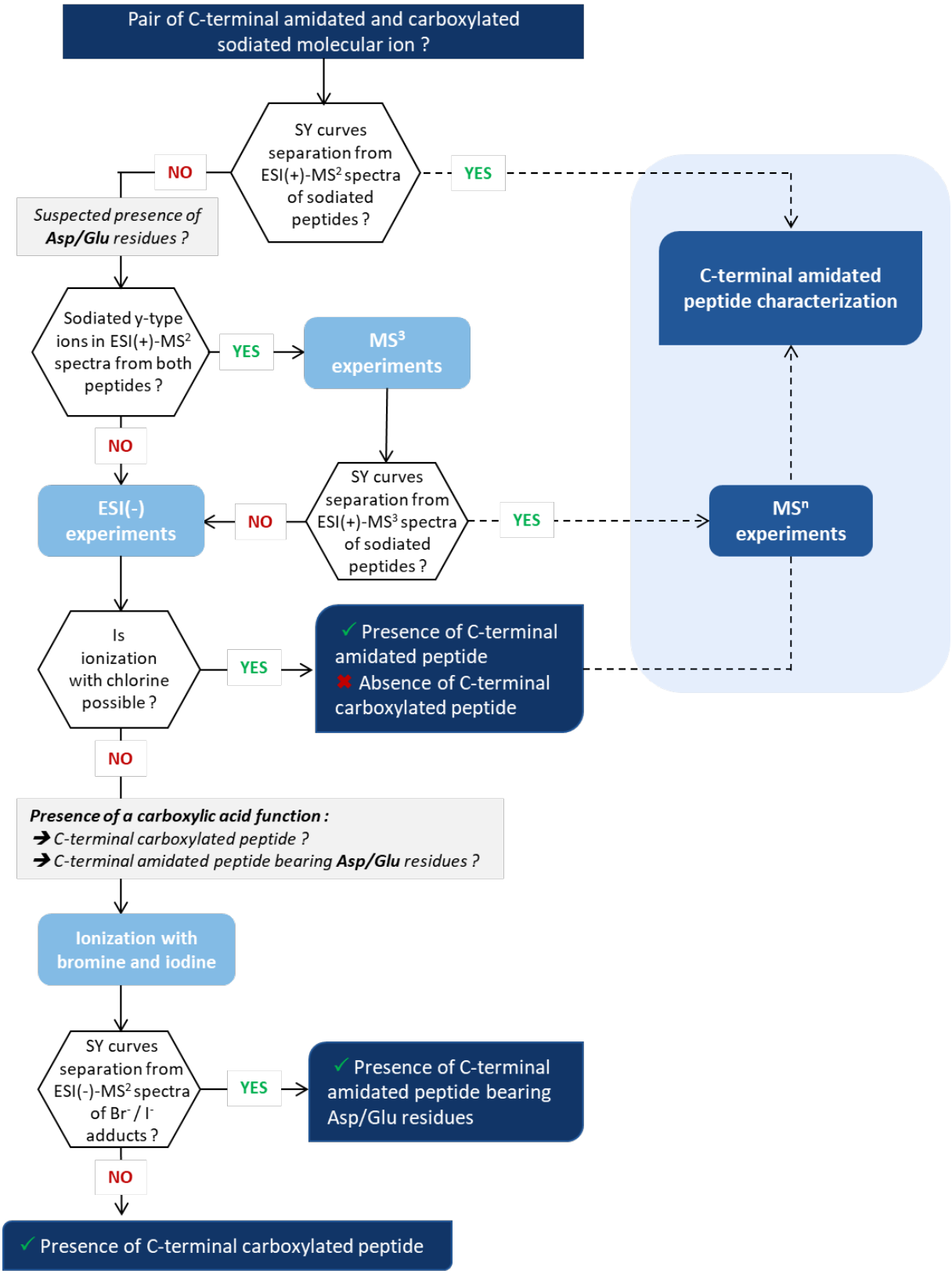

Pair of C-terminal amidated and carboxylated sodiated molecular ion ?
SY curves separation from ESI(+)-MS² spectra of sodiated peptides ?
NO
YES
Suspected presence of Asp/Glu residues ?
C-terminal amidated peptide characterization
Sodiated y-type ions in ESI(+)-MS² spectra from both peptides ?
YES
MS³ experiments
NO
ESI(-) experiments
NO
SY curves separation from ESI(+)-MS³ spectra of sodiated peptides ?
YES
MSⁿ experiments
Is ionization with chlorine possible ?
YES
✓ Presence of C-terminal amidated peptide
✖ Absence of C-terminal carboxylated peptide
NO
Presence of a carboxylic acid function :
➔ C-terminal carboxylated peptide ?
➔ C-terminal amidated peptide bearing Asp/Glu residues ?
Ionization with bromine and iodine
SY curves separation from ESI(-)-MS² spectra of Br⁻ / I⁻ adducts ?
YES
✓ Presence of C-terminal amidated peptide bearing Asp/Glu residues
NO
✓ Presence of C-terminal carboxylated peptide

Figure 3:

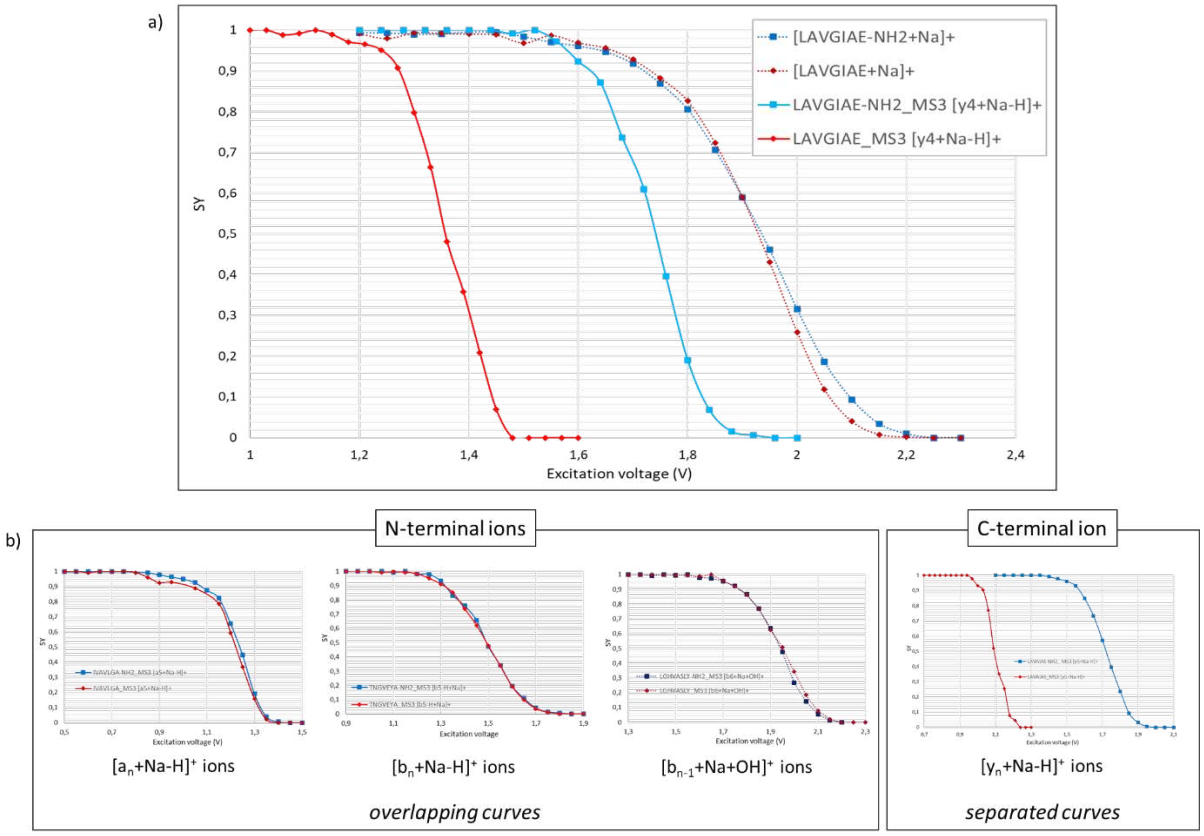
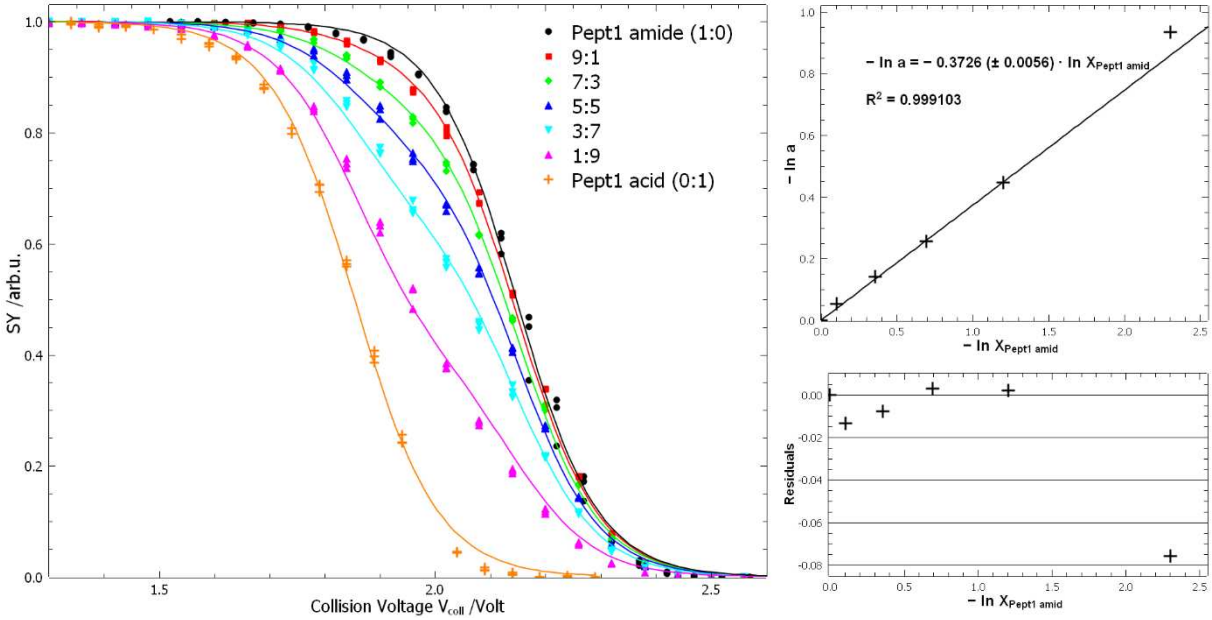


Figure 4:



b) Supplemental information

Table of contents

Figures S1: SY curves issued from different agent ionization and pressure in the ion trap mass spectrometer .....

a) APIAGFV peptides (n°1 in Table 1) .....

b) GILFAVA peptides (n°2 in Table 1).....

c) LAVGIAR peptides (n°7 in Table 1) .....

d) LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1).....

e) LAVAIAS peptides (n°9 in Table 1).....

Figures S2: SY curves of sodiated peptides pairs in which C-terminal amidated peptide does not produce $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions .....

a) GILFAVA peptides (n°2 in Table 1) b) FPARVGI peptides (n°3 in Table 1) .....

c) IFAVLGA peptides (n°4 in Table 1) d) LAVGIAW peptides (n°5 in Table 1).....

e) IVAVLGA peptides (n°6 in Table 1) f) LAVGIAR peptides (n°7 in Table 1).....

g) FFAVAIA peptides (n°8 in Table 1).....

Figures S3: SY curves plotted from protonated (dotted lines) and sodiated (solide lines) precursor peptide ions.....

a) GILFAVA peptides (n°2 in Table 1) b) LAVAIAS peptides (n°9 in Table 1).....

c) LAVGIAR peptides (n°7 in Table 1) d) LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1) .....

e) AGVDNFG peptides (n°15 in Table 1) .....

Figures S4: IMS experiences on protonated and sodiated molecular ions of C-terminal amidated (in blue) and carboxylated (in red) peptides. .....

a) APIAGFV peptides (n°1 in Table 1) b) GILFAVA peptides (n°2 in Table 1) .....

c) LAVGIAW peptides (n°5 in Table 1) d) LAVGIAR peptides (n°7 in Table 1) .....

e) LAVAIAS peptides (n°9 in Table 1) f) LAVTAIA peptides (n°11 in Table 1).....

g) AGVDNFG peptides (n°15 in Table 1) h) FDAVAIA peptides (n°16 in Table 1) .....

Figures S5: Repeatability and reproducibility .....

Figures S6: SY curves of sodiated peptides pairs in which C-terminal amidated peptide produce $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions.....

a) LAVAIAS peptides (n°9 in Table 1) b) LGHVASLY peptides (n°10 in Table 1).....

c) LAVTAIA peptides (n°11 in Table 1) d) FPCEAFA peptides (n°12 in Table 1).....

e) TNGVEYA peptides (n°14 in Table 1) f) AGVDNFG peptides (n°15 in Table 1) .....

g) FDAVAIA peptides (n°16 in Table 1) h) FPCDAFA peptides (n°17 in Table 1).....

Figure S7: Residues proportion in listed peptide-protein in UniprotKB/Swiss-Prot database .....

Figures S8: SY curves plotted from MS^3 spectra experiments of different protonated and sodiated fragment ions .....

a) y_5 and $[y_5+Na-H]^+$ SY curves of LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1) .....

b) y_4 and $[y_4+Na-H]^+$ SY curves of LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1) .....

c) a_5 and $[a_5+Na-H]^+$ SY curves of LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1) .....

Figures S9: MS^3 of sodiated fragment ions SY curves .....

a) $[b_n+Na-H]^+$ ions .....

b) $[a_n+Na-H]^+$ ions .....

c) $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions.....

d) $[y_n+Na-H]^+$ ions .....

Figure S10: Comparison of MS^2 spectra of sodiated precursor ions and MS^3 spectra of $[y_4+Na-H]^+$ ions of LAVGIAE-NH_2 and LAVGIAE peptides.....

Figures S11: Protocols in the negative mode.....

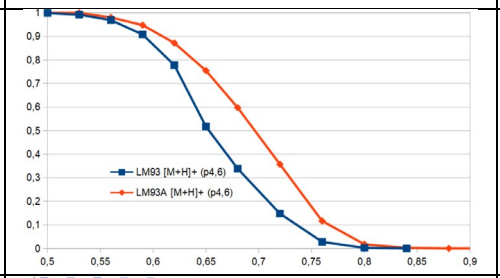
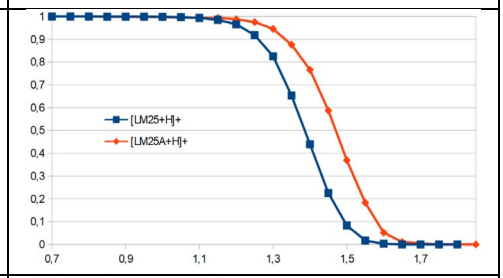
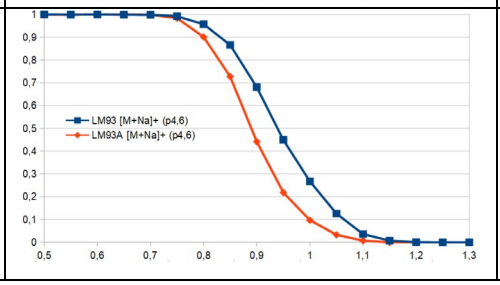
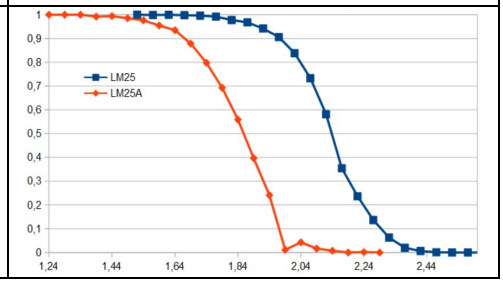
Figure S12: SY curves obtained for different mixtures of Pept1 amide/Pept1 acid for intra- and inter-day data .....

Figure S13: Logarithmic plots for the numerically determined "a" molar fraction of Pept1 amide as a function of the natural logarithm of experimental molar fraction of the prepared solutions. Intra-day experiments are presented on the left hand-side while the whole set of data are presented on the right hand-side diagram. Linear regression models are also presented on the diagrams together with their related performances indicators .....

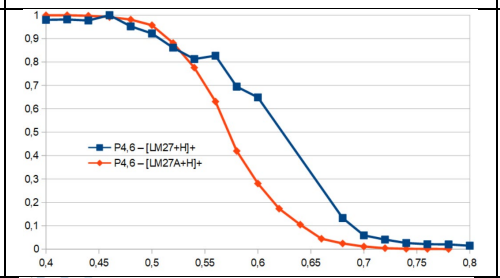
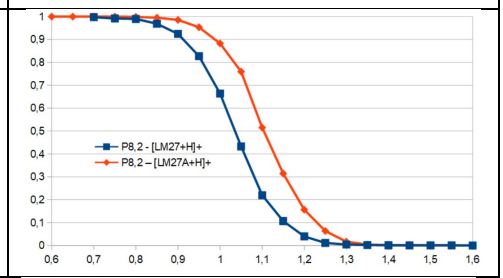
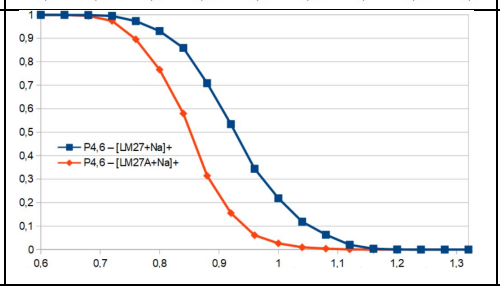
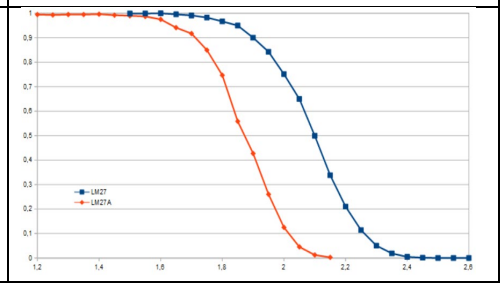
Figure S14: Linear mixture curve of GILFAVA-NH_2 and GILFAVA peptides (n°2 in Table 1).....

Figures S1: SY curves issued from different agent ionization and pressure in the ion trap mass spectrometer

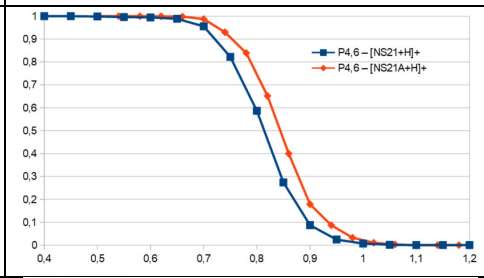
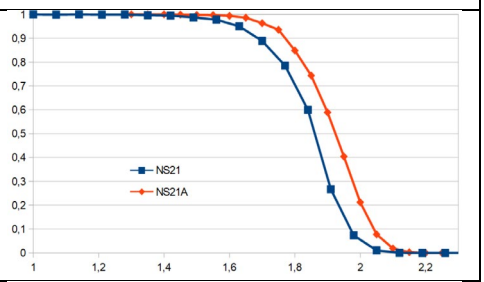
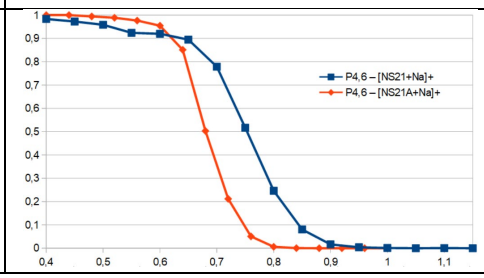
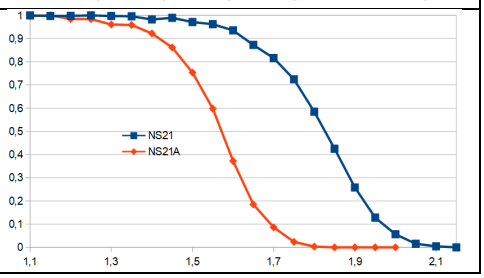
a) APIAGFV peptides (n°1 in Table 1)

APIAGFV-NH2 APIAGFV (n°1 in Table 1)	4,6.10^{-6}mbar	8,2.10^{-6}mbar
+H		
+Na		

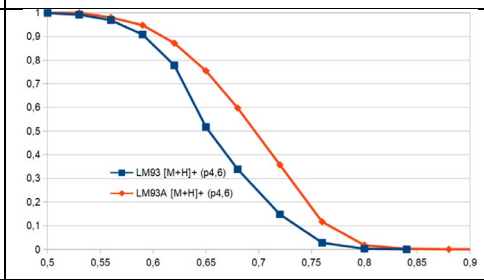
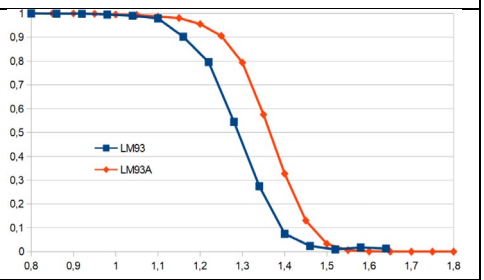
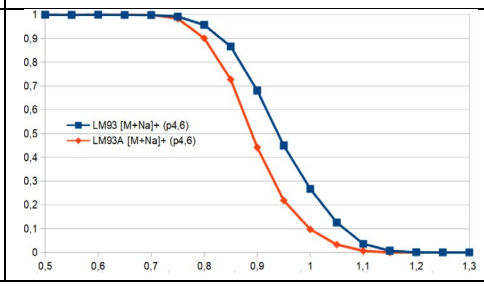
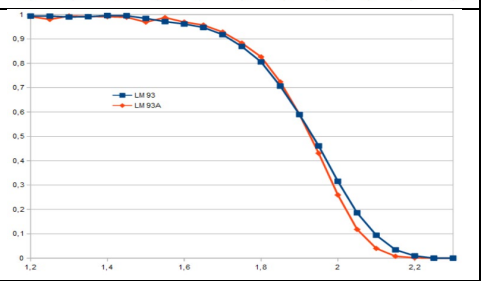
b) GILFAVA peptides (n°2 in Table 1)

GILFAVA-NH$_2$ GILFAVA (n°2 in Table 1)	4,6.10^{-6}mbar	8,2.10^{-6}mbar
+H		
+Na		

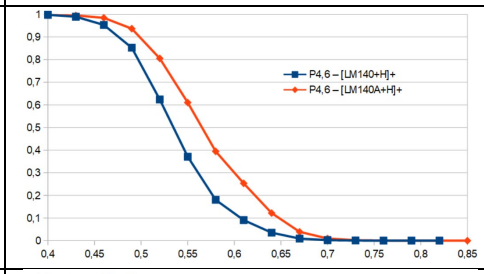
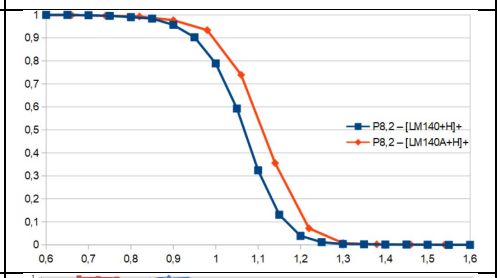
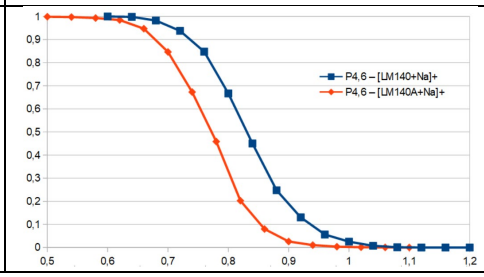
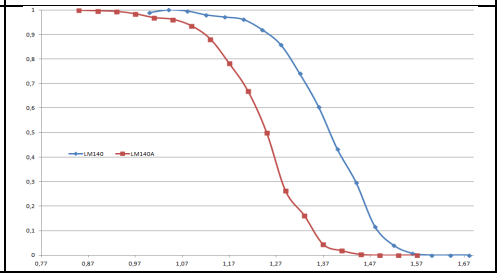
c) LAVGIAR peptides (n°7 in Table 1)

LAVGIAR-NH_2 LAVGIAR (n°7 in Table 1)	4,6.10^{-6}mbar	8,2.10^{-6}mbar
+H		
+Na		

d) LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1)

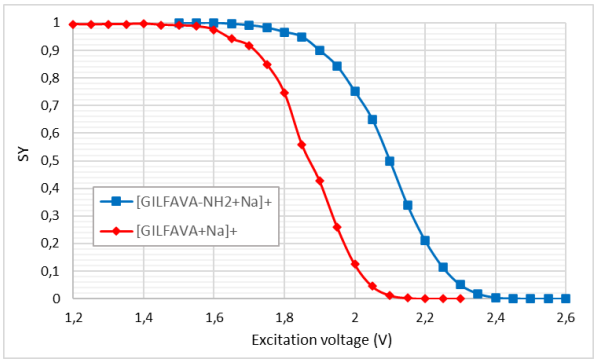
LAVGIAE-NH_2 LAVGIAE (n°13 in Table 1)	4,6.10^{-6}mbar	8,2.10^{-6}mbar
+H		
+Na		

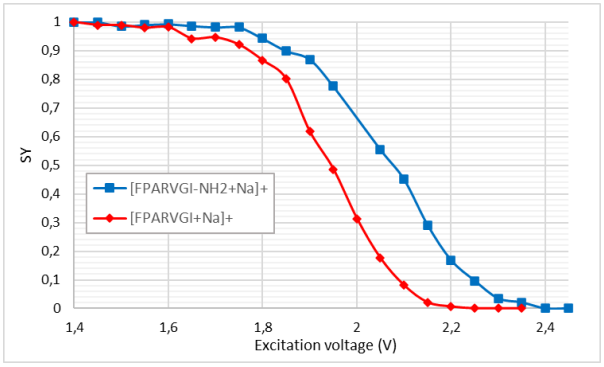
e) LAVAIAS peptides (n°9 in Table 1)

LAVAIAS-NH_2 LAVAIAS (n°9 in Table 1)	4,6.10^{-6}mbar	8,2.10^{-6}mbar
+H		
+Na		

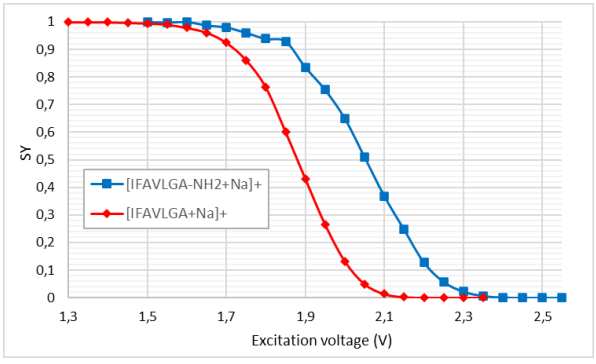
Figures S2: SY curves of sodiated peptides pairs in which C-terminal amidated peptide does not produce $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions

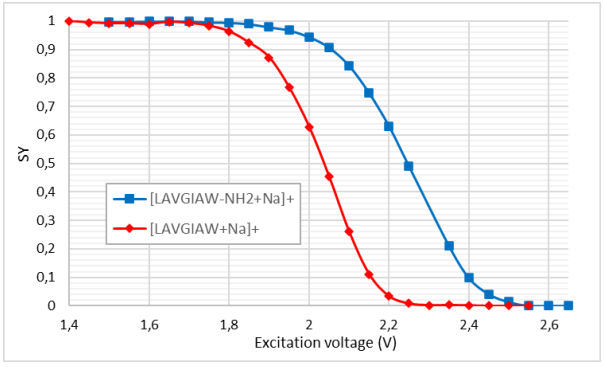
a) GILFAVA peptides (n°2 in Table 1) b) FPARVGI peptides (n°3 in Table 1)



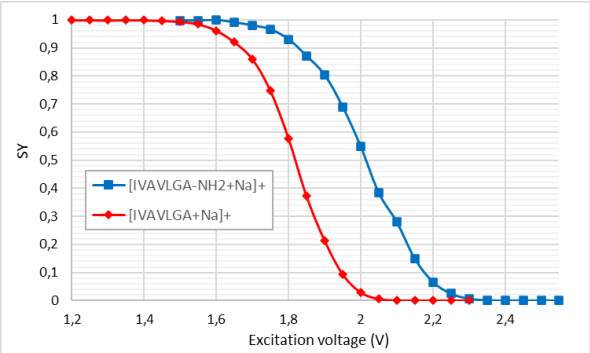


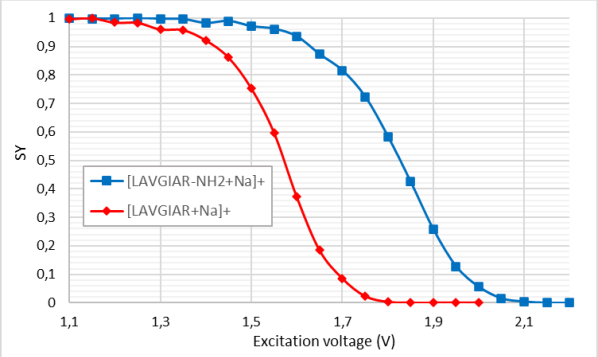
c) IFAVLGA peptides (n°4 in Table 1) d) LAVGIAW peptides (n°5 in Table 1)



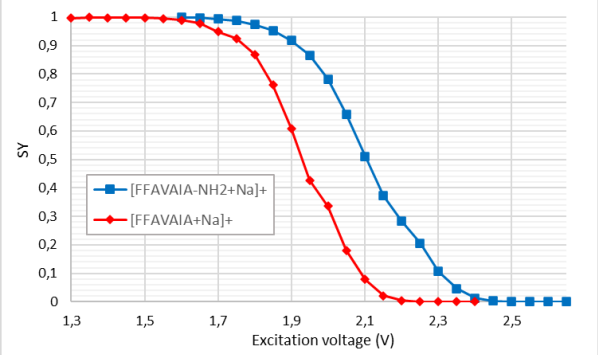


e) IVAVLGA peptides (n°6 in Table 1) f) LAVGIAR peptides (n°7 in Table 1)



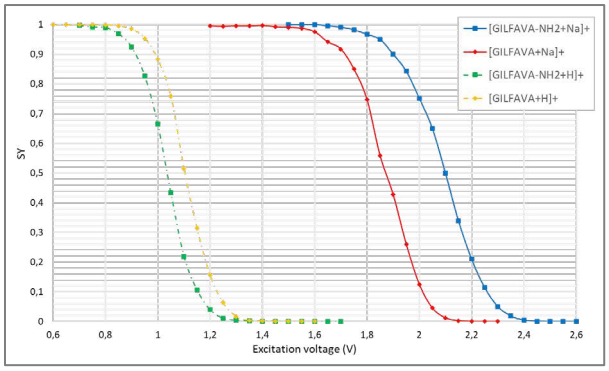


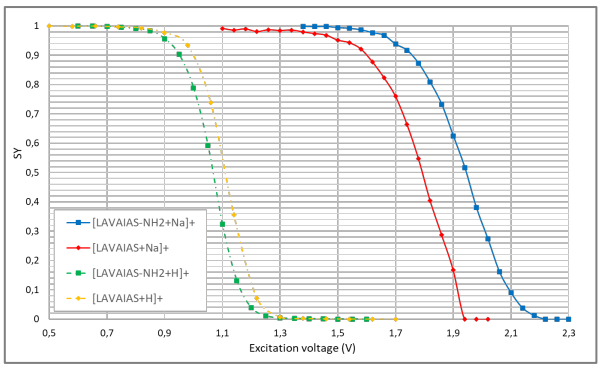
g) FFAVAIA peptides (n°8 in Table 1)



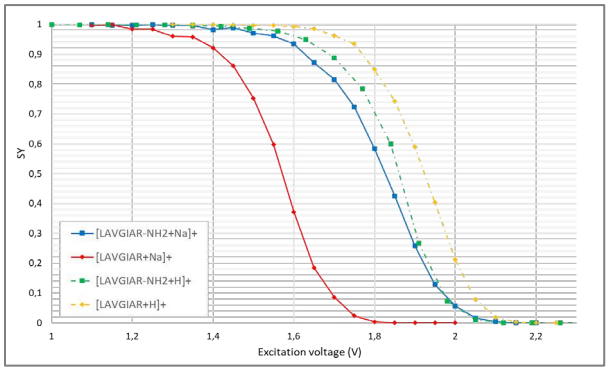
Figures S3: SY curves plotted from protonated (dotted lines) and sodiated (solide lines) precursor peptide ions

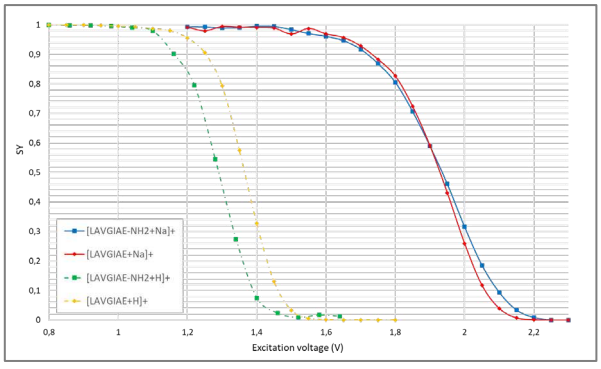
a) GILFAVA peptides (n°2 in Table 1) b) LAVAIAS peptides (n°9 in Table 1)



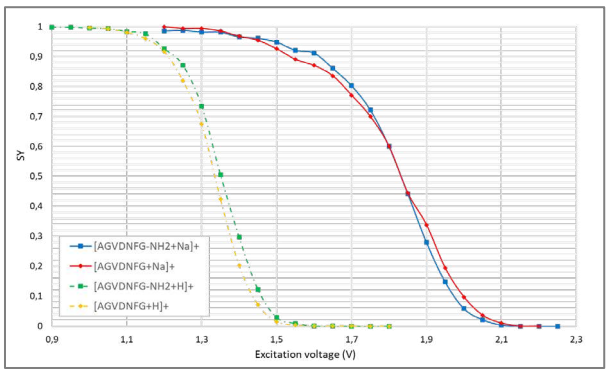


c) LAVGIAR peptides (n°7 in Table 1) d) LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1)





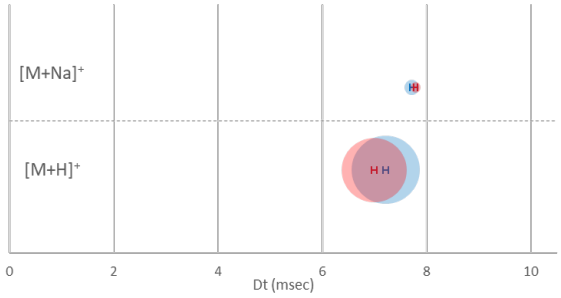
e) AGVDNFG peptides (n°15 in Table 1)



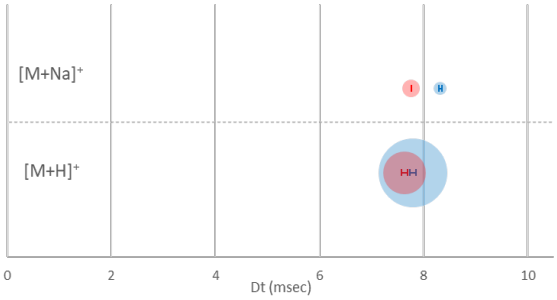
Figures S4: IMS experiences on protonated and sodiated molecular ions of C-terminal amidated (in blue) and carboxylated (in red) peptides.

Mass spectrometer: Synapt G2-S. Bubble areas represent ion intensities.

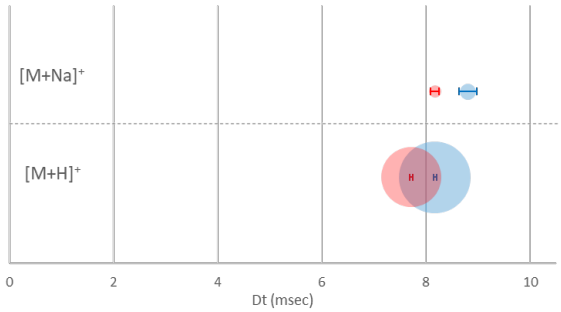
a) APIAGFV peptides (n°1 in Table 1)



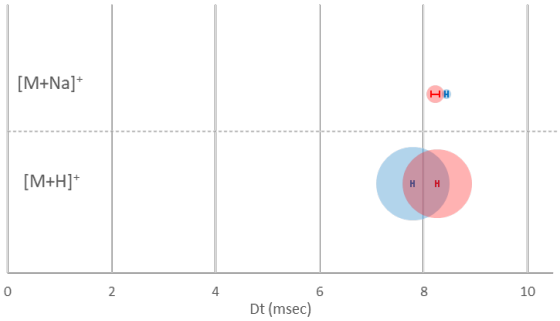
b) GILFAVA peptides (n°2 in Table 1)



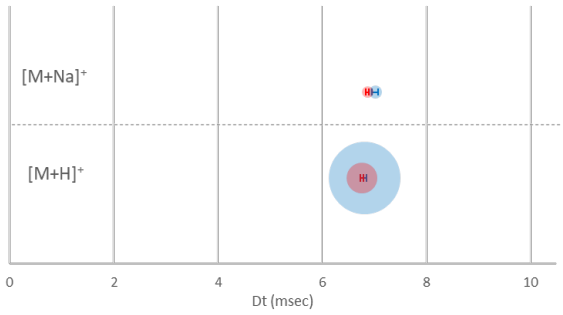
c) LAVGIAW peptides (n°5 in Table 1)



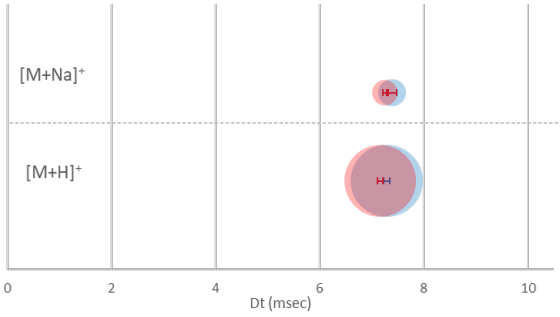
d) LAVGIAR peptides (n°7 in Table 1)



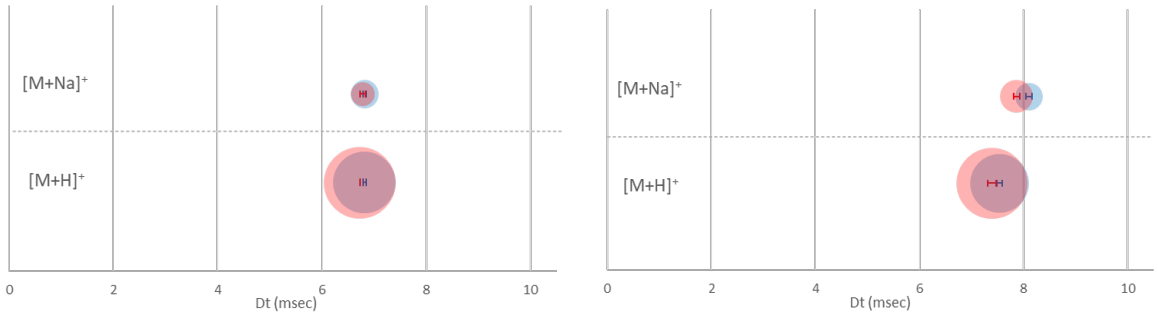
e) LAVAIAS peptides (n°9 in Table 1)



f) LAVTAIA peptides (n°11 in Table 1)

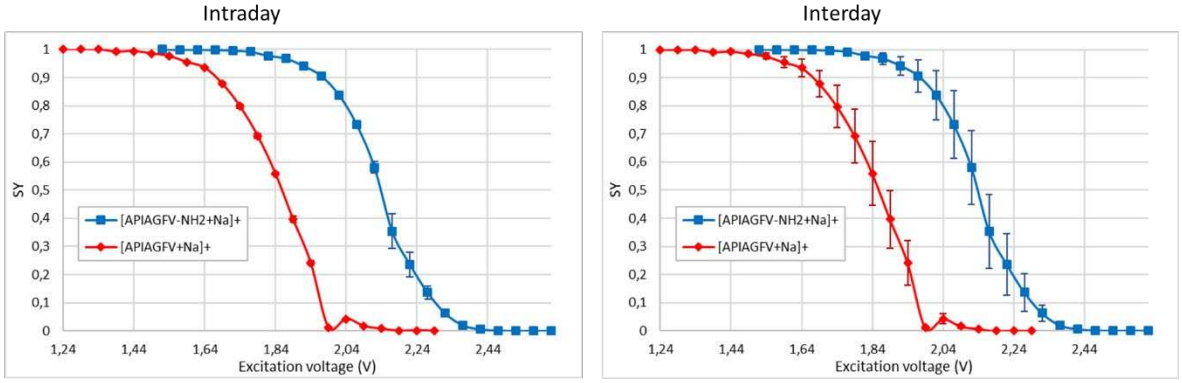


g) AGVDNFG peptides (n°15 in Table 1) h) FDAVAIA peptides (n°16 in Table 1)

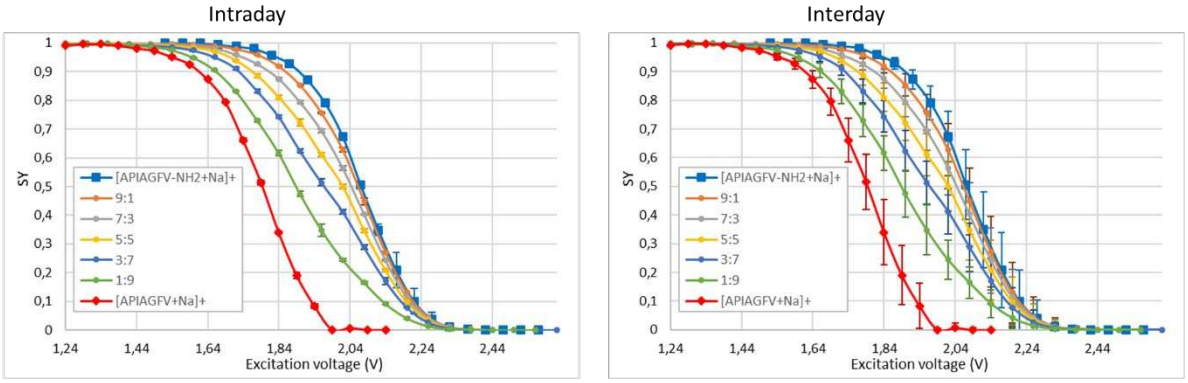


Figures S5: Repeatability and reproducibility

a) A pair of synthetic peptides (n°1 in Table 1), were analyzed 3 times the same day, as well as over 3 weeks (1 week interval between each analytical batch).

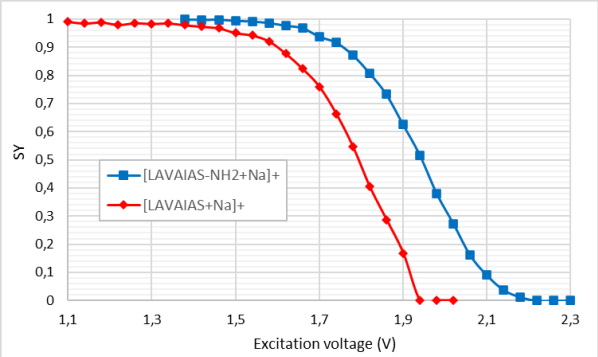


b) Several mixtures of both representing a total of 5 samples were also analyzed 3 times the same day, as well as over 3 weeks (1 week interval between each analytical batch).

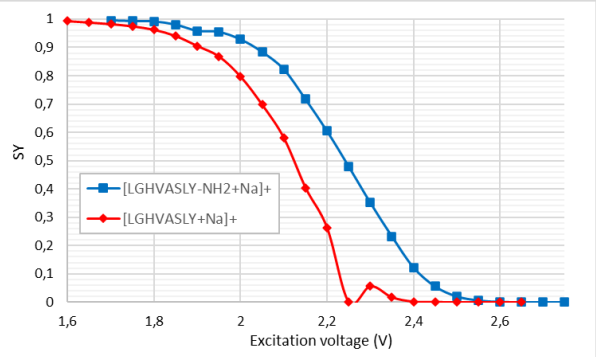


Figures S6: SY curves of sodiated peptides pairs in which C-terminal amidated peptide produce $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions

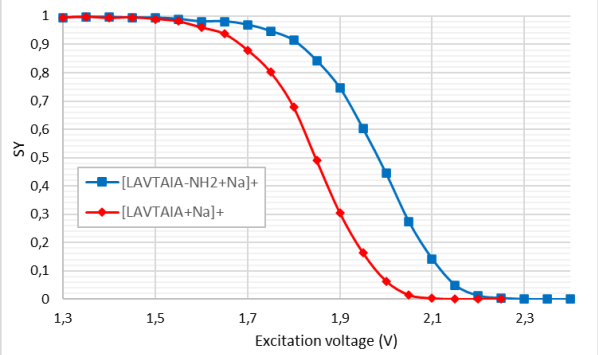
a) LAVAIAS peptides (n°9 in Table 1)



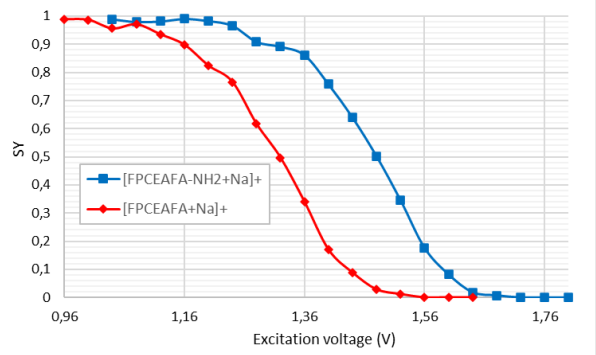
b) LGHVASLY peptides (n°10 in Table 1)



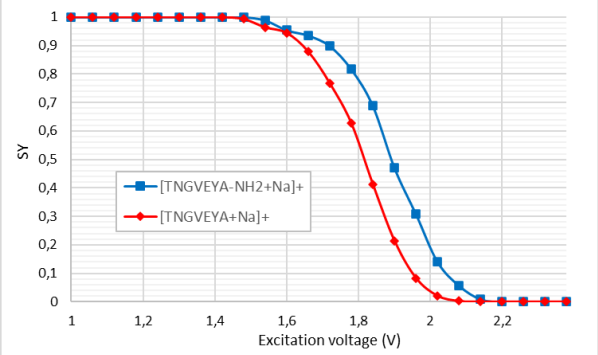
c) LAVTAIA peptides (n°11 in Table 1)



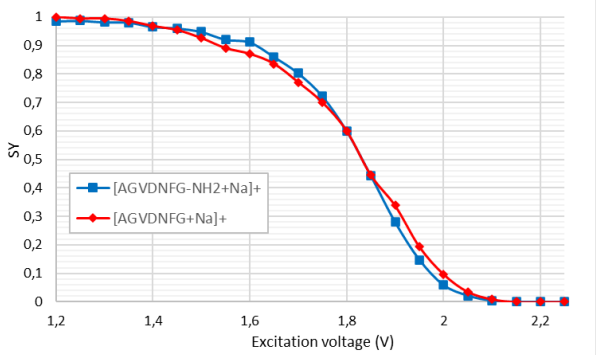
d) FPCEAFA peptides (n°12 in Table 1)



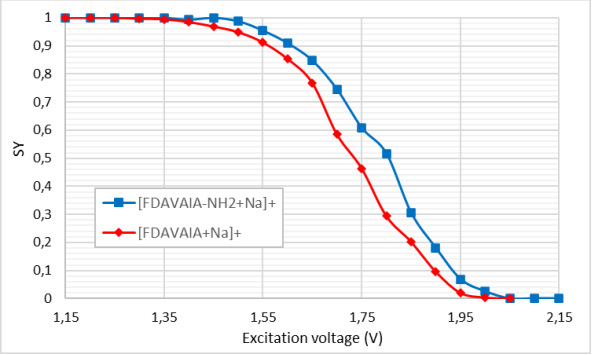
e) TNGVEYA peptides (n°14 in Table 1)



f) AGVDNFG peptides (n°15 in Table 1)



g) FDAVAIA peptides (n°16 in Table 1)



h) FPCDAFA peptides (n°17 in Table 1)

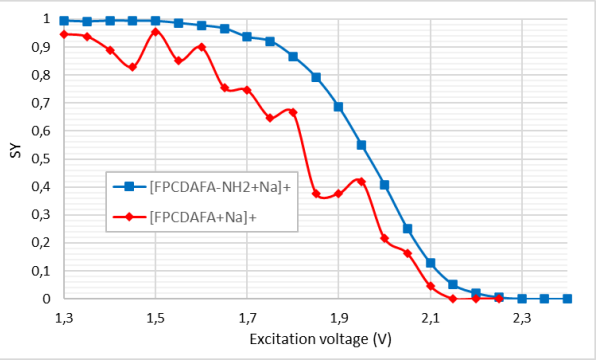
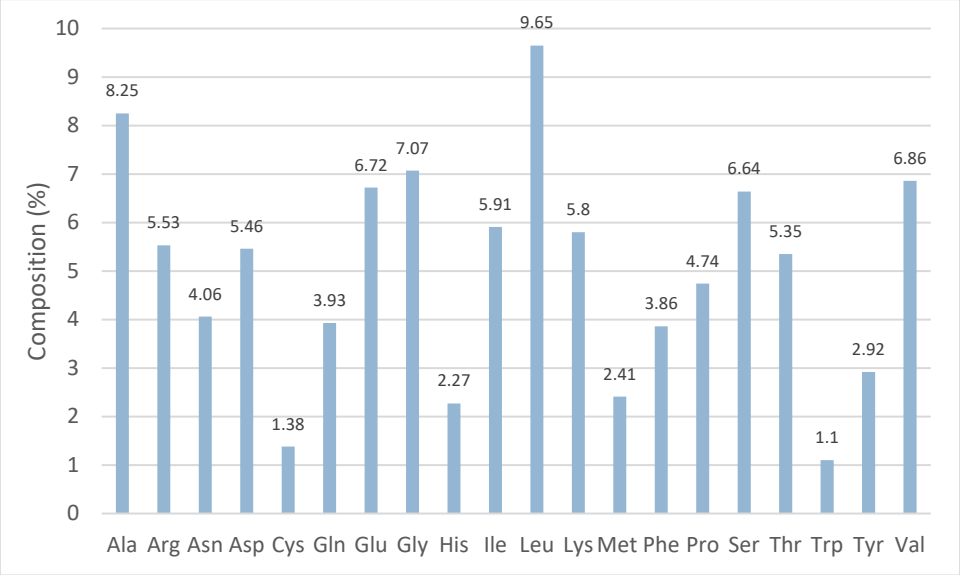


Figure S7: Residues proportion in listed peptide-protein in UniprotKB/Swiss-Prot database

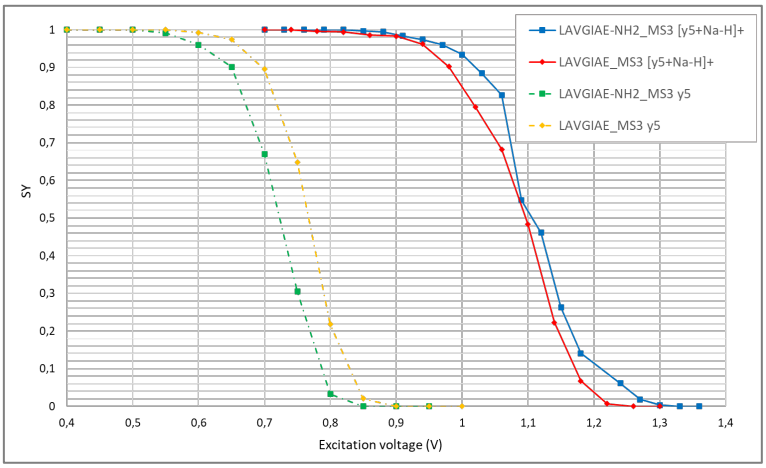


https://web.expasy.org/docs/relnotes/relstat.html

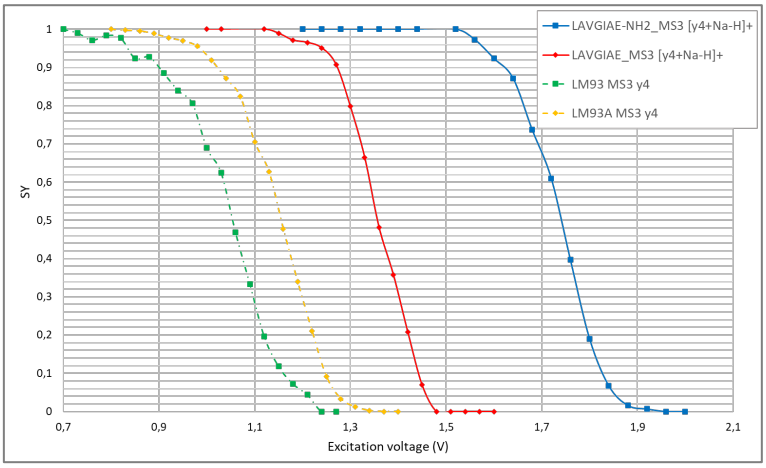
Data were updated on September 9, 2021. Displayed results were calculated from 565928 entries, ranging from 2 to 35213 residues. They are issued from bacteria (59%), archea (3%), viruses (3%) and eukaryotes (34%).

Figures S8: SY curves plotted from MS^3 spectra experiments of different protonated and sodiated fragment ions

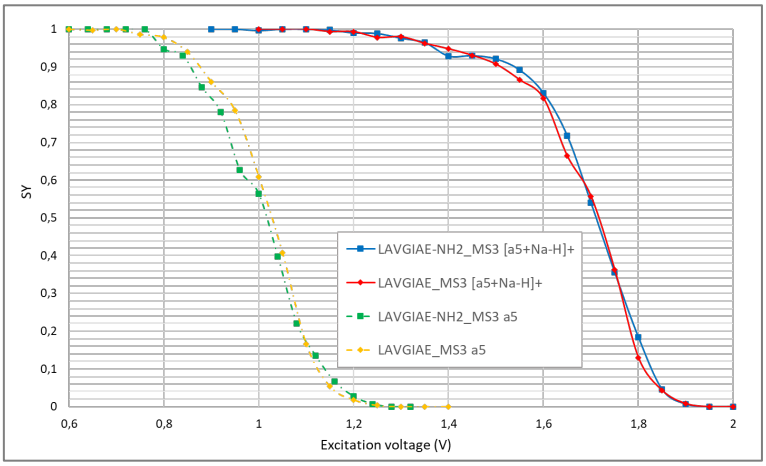
a) y_5 and $[y_5+Na-H]^+$ SY curves of LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1)



b) y_4 and $[y_4+Na-H]^+$ SY curves of LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1)



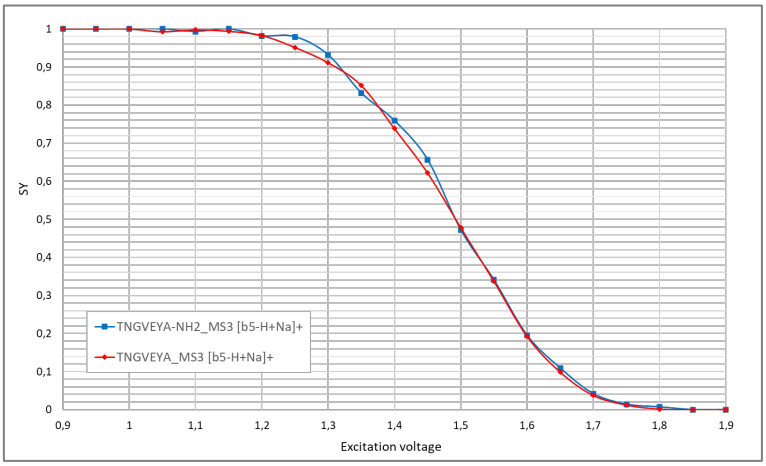
c) a_5 and $[a_5+Na-H]^+$ SY curves of LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1)



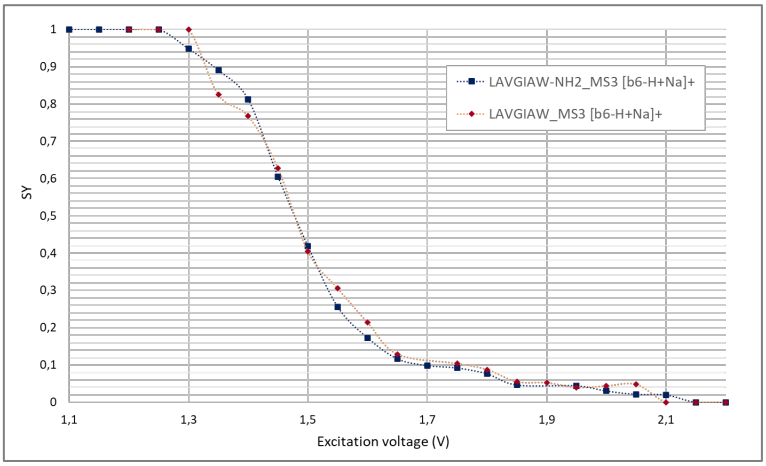
Figures S9: MS^3 of sodiated fragment ions SY curves

a) $[b_n+Na-H]^+$ ions

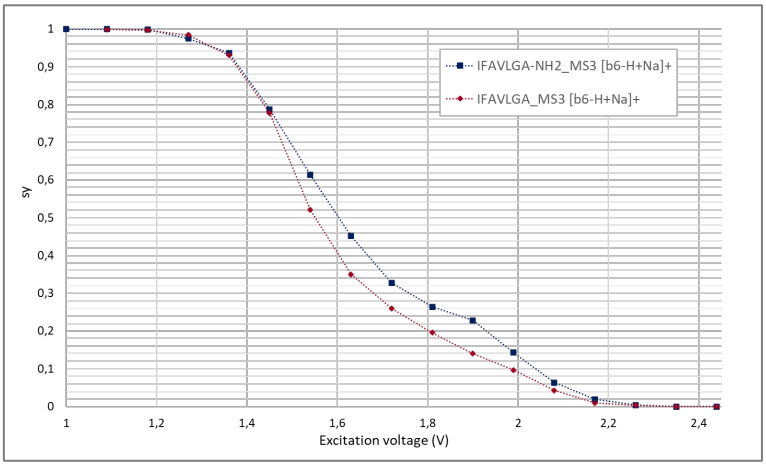
i. $[b_5+Na-H]^+$ ions of TNGVEYA peptides (n°14 in Table 1)



ii. $[b_6+Na-H]^+$ ions of LAVGIAW peptides (n°5 in Table 1)

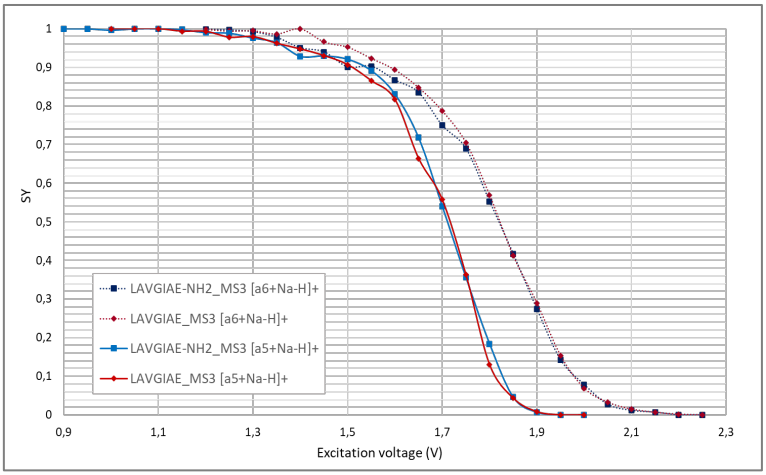


iii. $[b_6+Na-H]^+$ ions of IFAVLGA peptides (n°4 in Table 1)

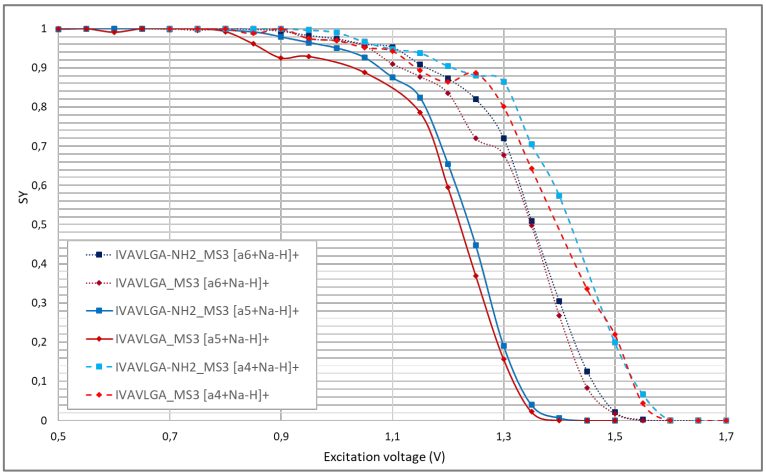


b) $[a_n+Na-H]^+$ ions

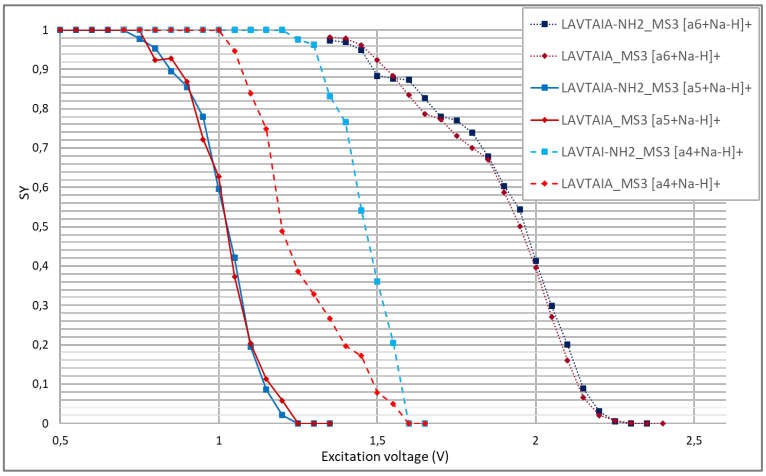
i. $[a_6+Na-H]^+$ and $[a_5+Na-H]^+$ ions of LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1)



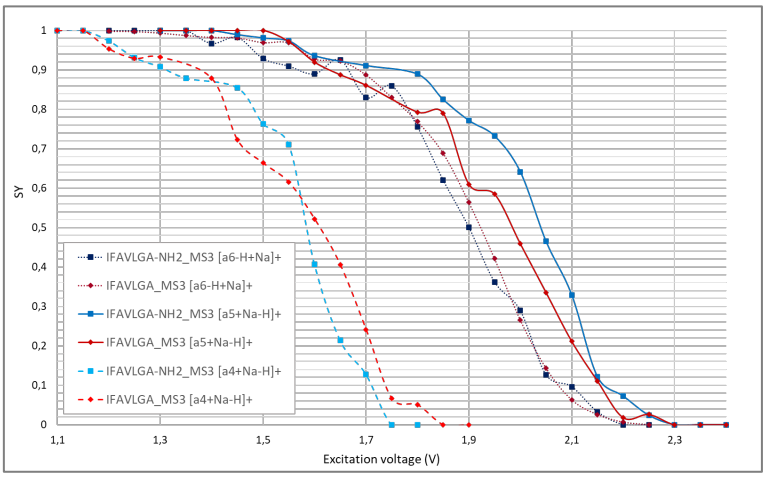
ii. $[a_6+Na-H]^+$, $[a_5+Na-H]^+$ and $[a_4+Na-H]^+$ ions of IVAVLGA peptides (n°6 in Table 1)



iii. $[a_6+Na-H]^+$, $[a_5+Na-H]^+$, $[a_4+Na-H]^+$ ions of LAVTAIA peptides (n°11 in Table 1)

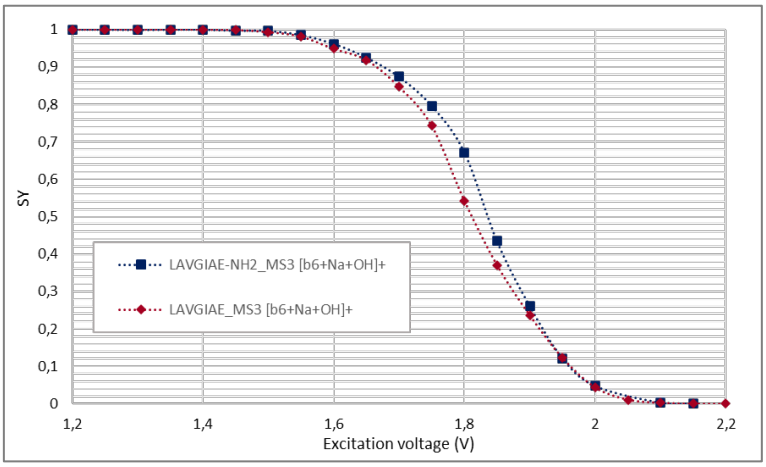


iv. $[a_6+Na-H]^+$, $[a_5+Na-H]^+$ and $[a_4+Na-H]^+$ ions of IFAVLGA peptides (n°4 in Table 1)

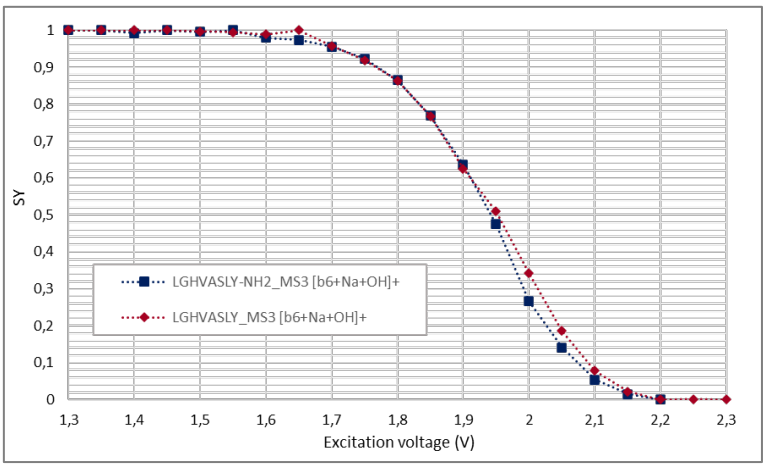


c) $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ ions

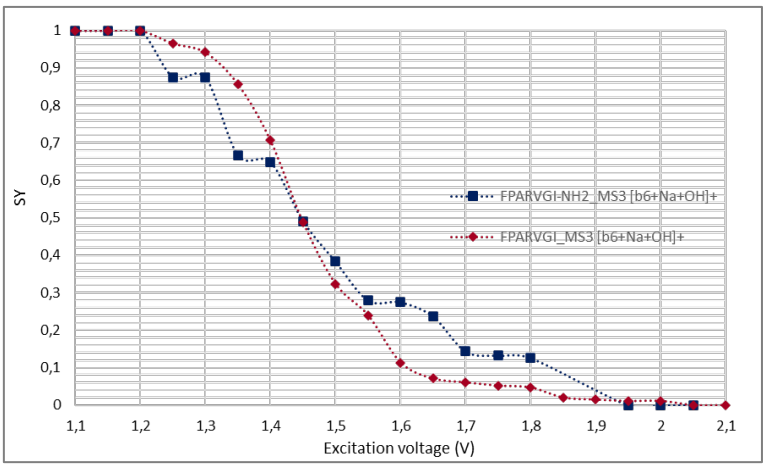
i. $[b_6+Na+OH]^+$ ions of LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1)



ii. $[b_6+Na+OH]^+$ ions of LGHVASLY peptides (n°10 in Table 1)

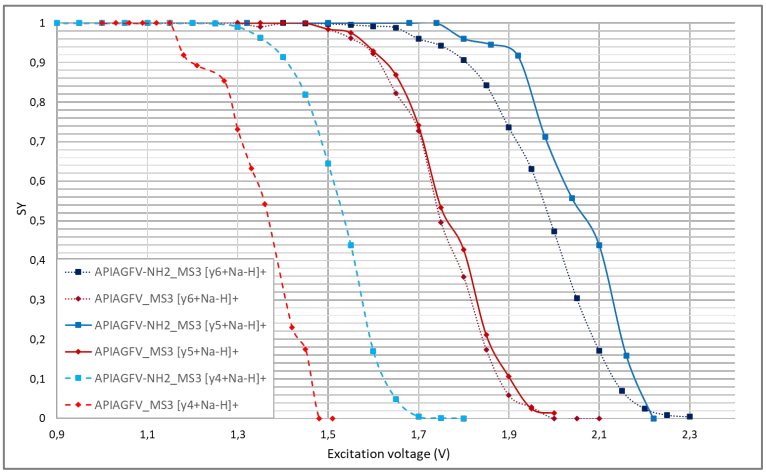


iii. $[b_6+Na+OH]^+$ ions of FPARVGI ions (n°3 in Table 1)

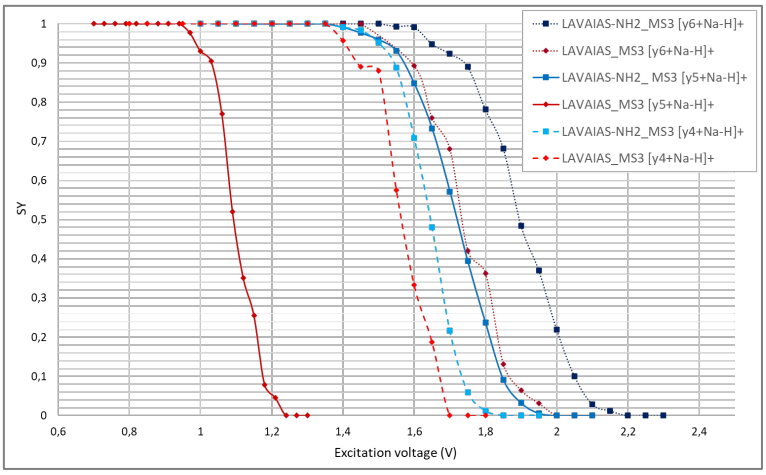


d) $[y_n+Na-H]^+$ ions

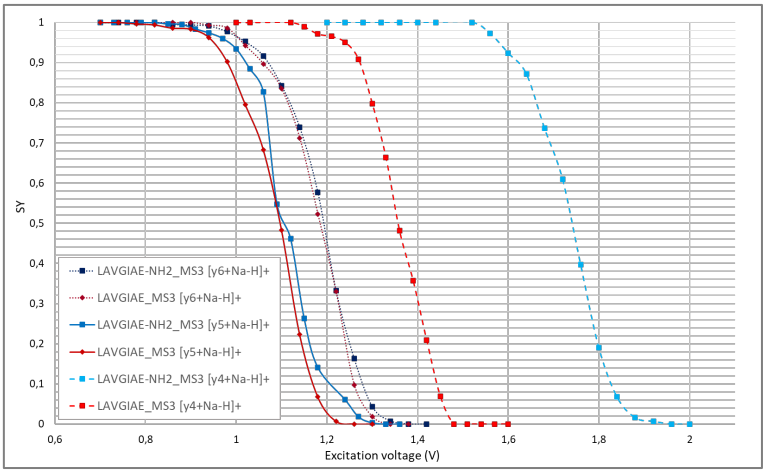
i. $[y_6+Na-H]^+$, $[y_5+Na-H]^+$ and $[y_4+Na-H]^+$ ions of APIAGFV peptides (n°1 in Table 1)



ii. $[y_6+Na-H]^+$, $[y_5+Na-H]^+$ and $[y_4+Na-H]^+$ ions of LAVAIAS peptides (n°9 in Table 1)



iii. $[y_6+Na-H]^+$, $[y_5+Na-H]^+$ and $[y_4+Na-H]^+$ ions of LAVGIAE peptides (n°13 in Table 1)



iv. $[y_6+Na-H]^+$, $[y_5+Na-H]^+$ and $[y_4+Na-H]^+$ ions of IFAVLGA peptides (n°4 in Table 1)

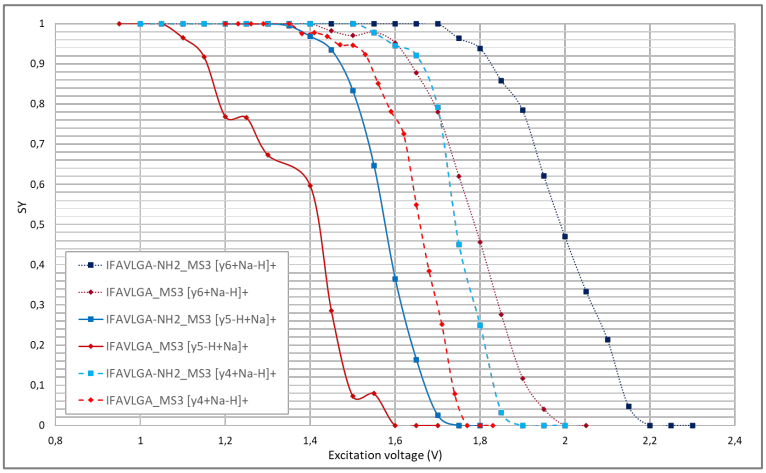
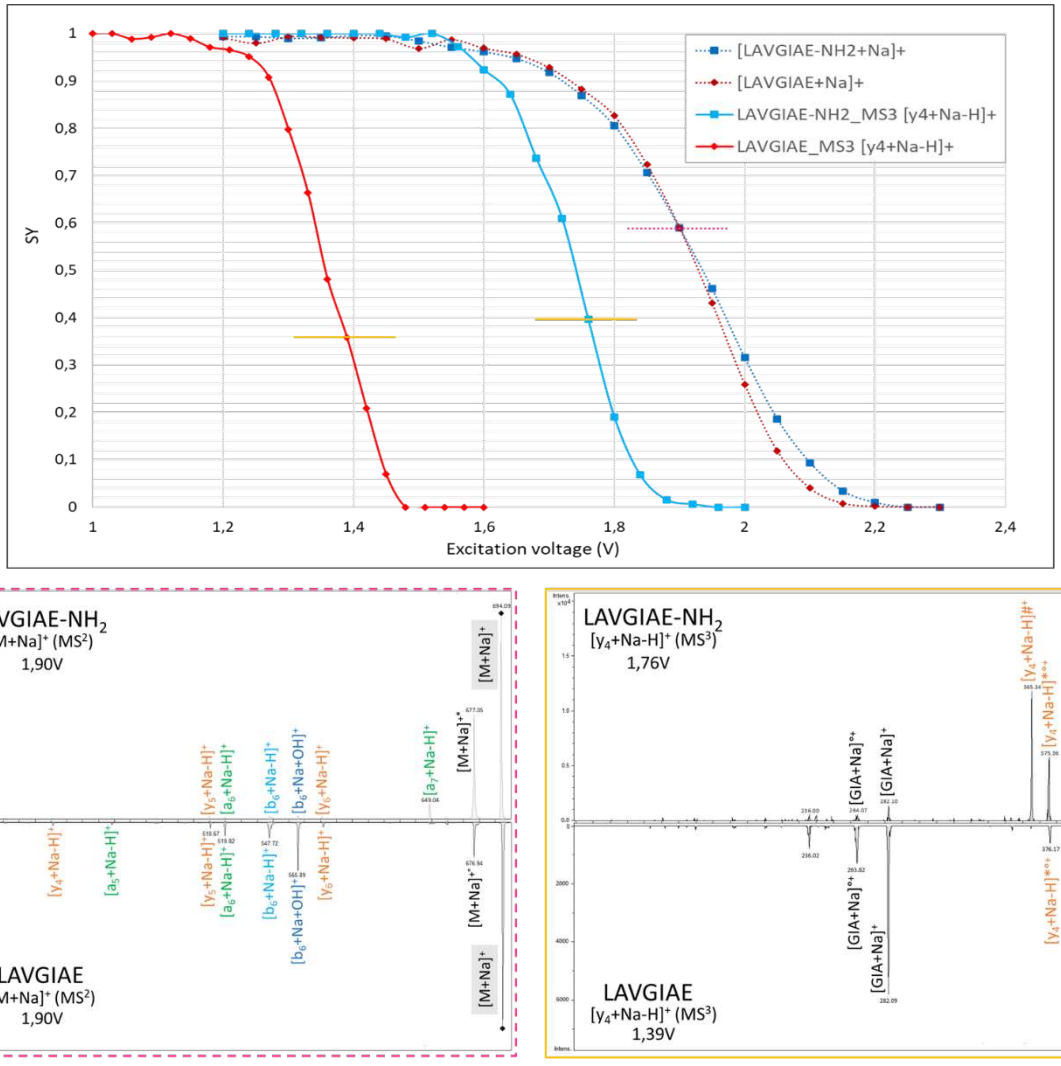


Figure S10: Comparison of MS^2 spectra of sodiated precursor ions and MS^3 spectra of $[y_4+Na-H]^+$ ions of LAVGIAE-NH_2 and LAVGIAE peptides

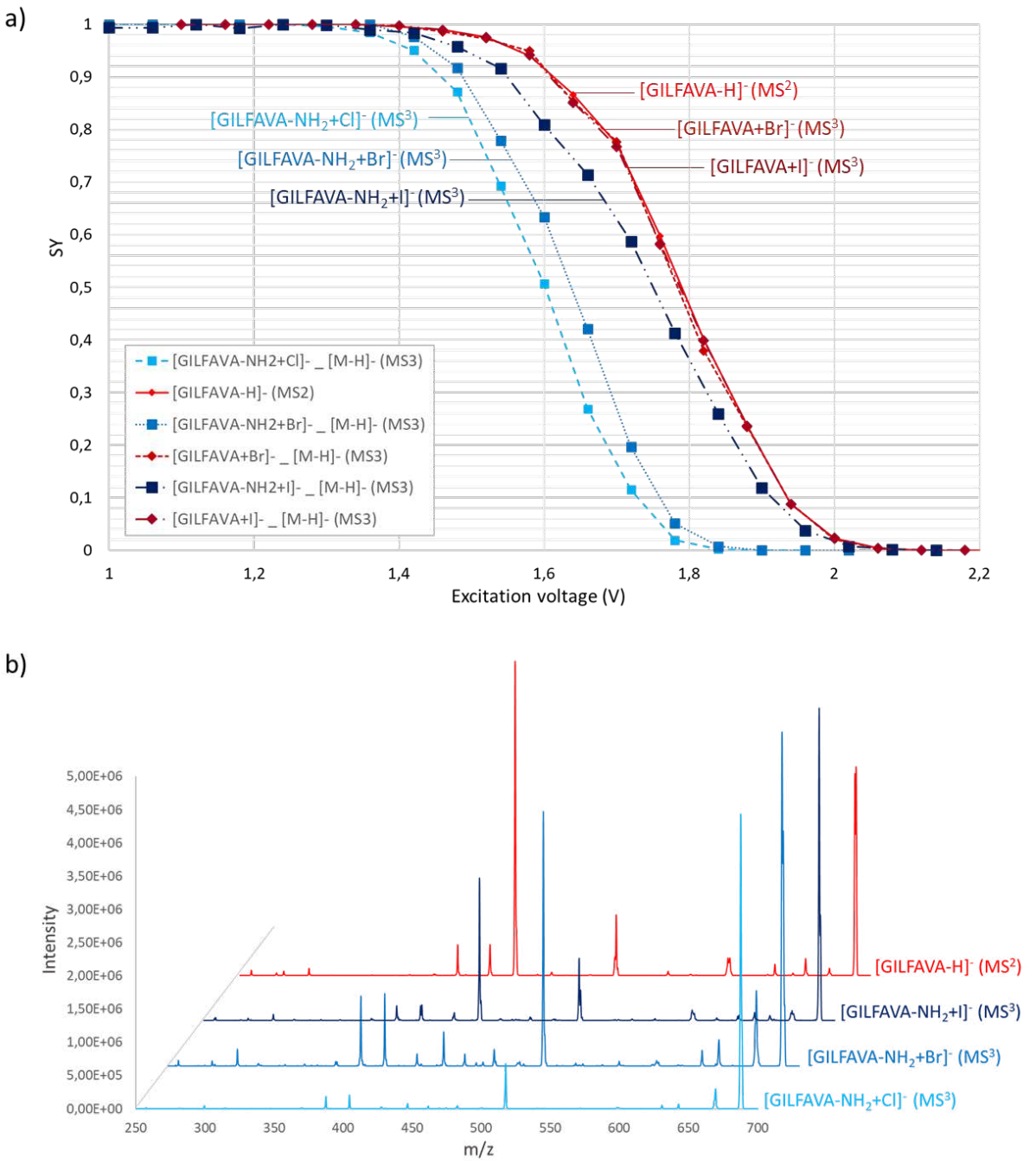


Figures S11: Protocols in the negative mode

The negative mode was explored aiming to plot more helpful SY curves as depicted in the workflow of Figure 2. Due to the point that amidated peptides cannot be as easily deprotonated as C-terminal carboxylated sequences which bear a carboxylic acidic function, ionization was undertaken with halogens (noted X) such as chlorine (Cl^-), bromine (Br^-) and iodine (I^-).

As a matter of fact, the interaction of these anions with the peptides can proceed either by a proton abstraction leading to $[M-H]^-$ molecular ion or by the halogen fixation onto the molecule giving the $[M+X]^-$ adduct [Q. Dumont, M. Bárcenas, H. Dossmann, I. Bailloux, C. Buisson, N. Mechin, A. Molina, F. Lasne, N.S. Rannulu, R.B. Cole, Improved Steroids Detection and Evidence for Their Regiospecific Decompositions Using Anion Attachment Mass Spectrometry, Anal. Chem. 88 (2016) 3585–3591]. As expected, amidated peptides which do not present an acidic proton did not release HCl, HBr or HI but provided abundant anionized molecular ions with all tested halogens ($[M+Cl]^-$, $[M+Br]^-$ and $[M+I]^-$). Concerning the studied carboxylated peptides, the nature of the halogen was found to greatly impact the ionization output. Indeed, chlorine failed to produce any anionized ion for all studied native sequences, whereas bromine and iodine always produced the targeted Br^- and I^- adducts. Similarly, C-terminal amidated peptide containing aspartic or glutamic acid presenting a carboxylic acid function on their side-chain couldn't be ionized by chlorine (peptides n°12 to 17 in Table 1, p. 144). The carboxylic acid seemed to be the sole function responsible for such behavior since amidated peptide containing serine or threonine (lateral hydroxyl function with a less acidic proton) were ionized by this halogen. Upon CID dissociation, all detected halogenated adducts fragmented by the loss of HX (X=Cl, Br or I) to form the deprotonated peptide ion. As a result, MS^3 experiments were then conducted on these deprotonated peptide ions. Curves obtained from MS^3 experiments issued from $[M-H]^-$ produced from $MCl^-/MBr^-/MI^-$ of amidated chains and from MBr^-/MI^- of carboxylated ones were compared. Additionally, the SY curve acquired from the same $[M-H]^-$ ion but produced at the intermediate MS^2 stage for the carboxylated peptides was also plotted.

The SY curves are displayed in Fig 11.a; the MS^2 and MS^3 spectra are illustrated in figure 11.b (data recorded in MS^3 for the carboxylated sequence are not shown since they are overlapping with the MS^2 data).

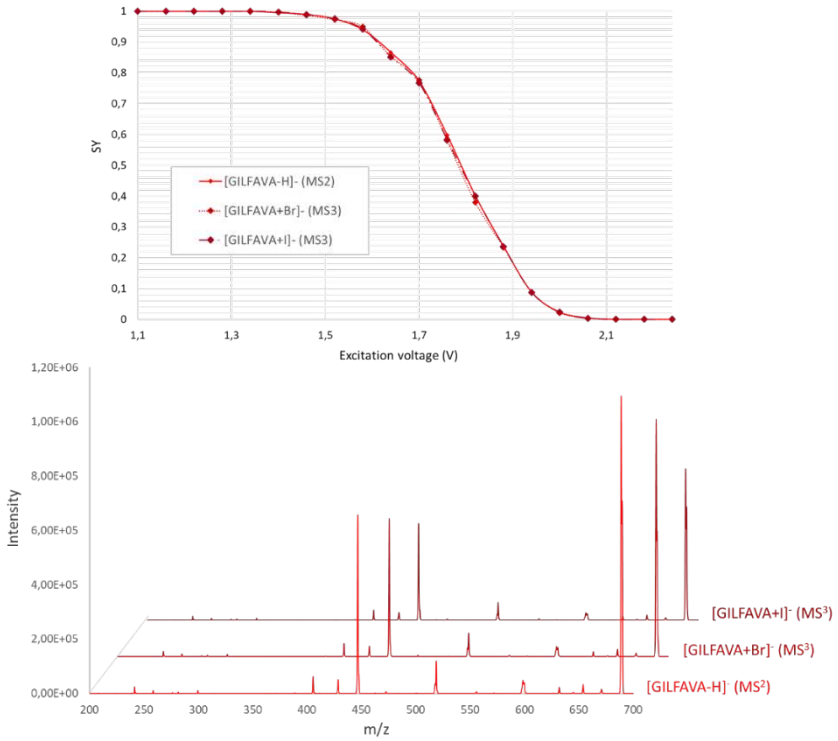


When a peptide was ionized by a chloride ion, it can be assigned as the C-terminal amidated sequence. In the case of failed ionization with chlorine indicating the presence of a carboxylic acid, two possibilities can be envisaged depending on the position of such function. Either the peptide was in its native form with a C-terminal carboxylic acid or in its amidated version but bearing an aspartic or glutamic acid residue within its sequence. To discriminate these two situations, ionization with bromide and iodine was thereafter conducted conjointly. If the recorded SY curves recorded from MS^3 of $[M-H]^-$ issued from both MBr^- and MI^- were overlapping, the peptide chain was C-terminated by a carboxylic acid function and thus no C-terminal amidated peptide was present (or unless in low quantity not detectable by the described methodology). On the other hand, if the SY curves from bromine and iodine ionization were separated, the selected peptide contained an amide function at the C-terminal position together with aspartic acid or glutamic acid residue within the sequence.

More spectra and SY curves comparison of C-terminal carboxylated and amidated peptides deprotonated molecular ions issued of MS^2 or MS^3 experiments are presented below:

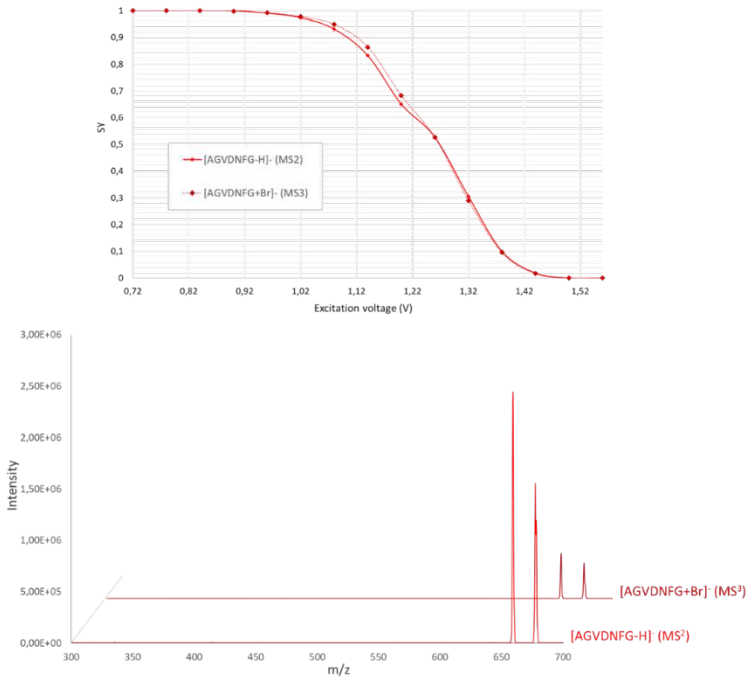
c) Carboxylated peptides

GILFAVA peptide ($[M-H]^-$ / $[M+Br]^-$ / $[M+I]^-$) (n°2 in Table 1)



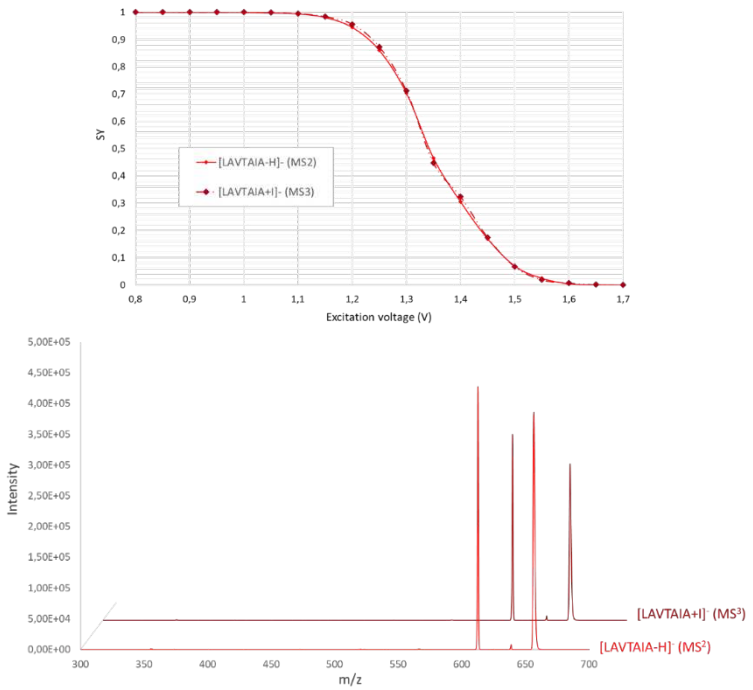
Spectra obtained at an energy collision of 1.76V

AGVDNFG peptide ($[M-H]^-$ / $[M+Br]^-$) (n°15 in Table 1)



Spectra obtained at an energy collision of 1.26V

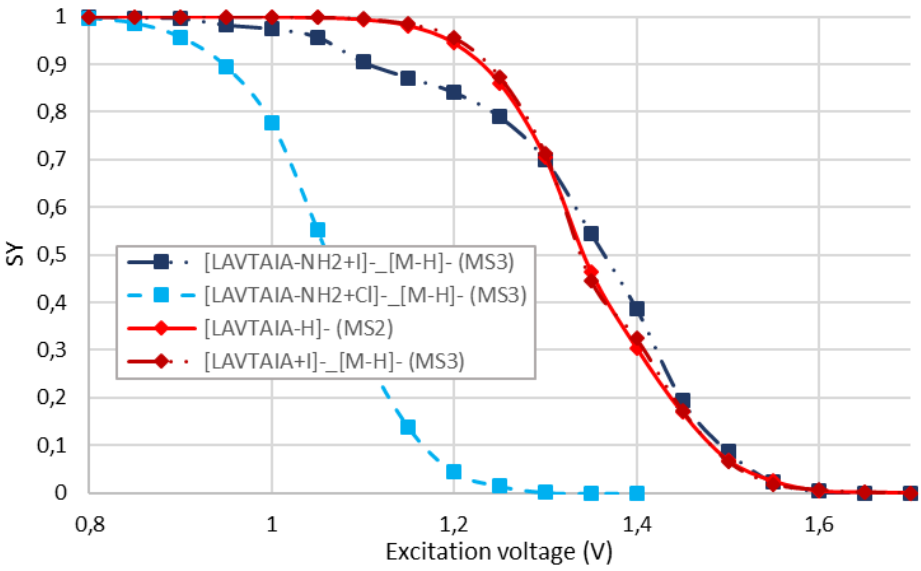
LAVTAIA peptide ([M-H]$^-$ / [M+I]$^-$) (n°11 in Table 1)



Spectra obtained at an energy collision of 1.35V

d) Amidated peptides

LAVTAIA-NH_2 peptide (n°11 in Table 1) ([M+Cl]$^-$ / [M+I]$^-$)



APIAGFV-NH_2 peptide (n°1 in Table 1) ($[M+Cl]^-$ / $[M+Br]^-$)

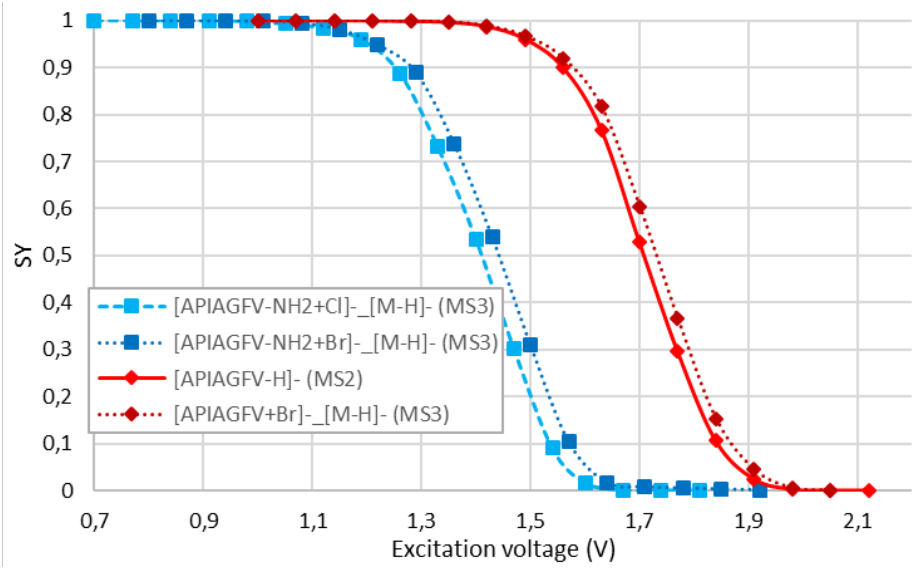
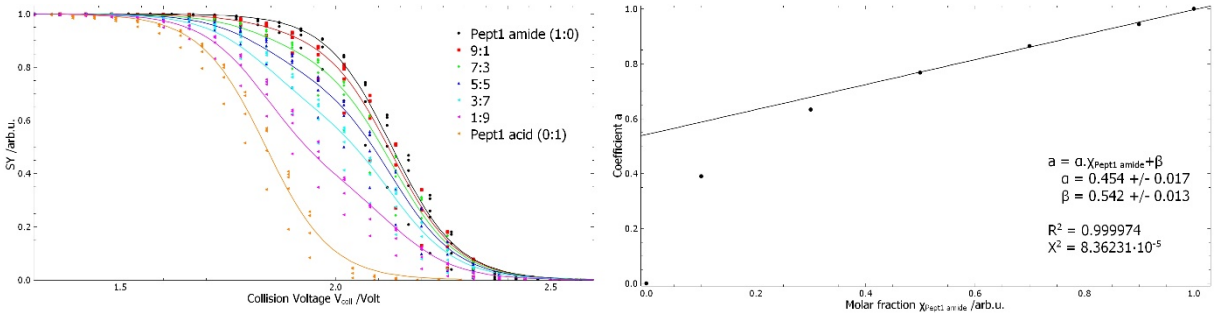
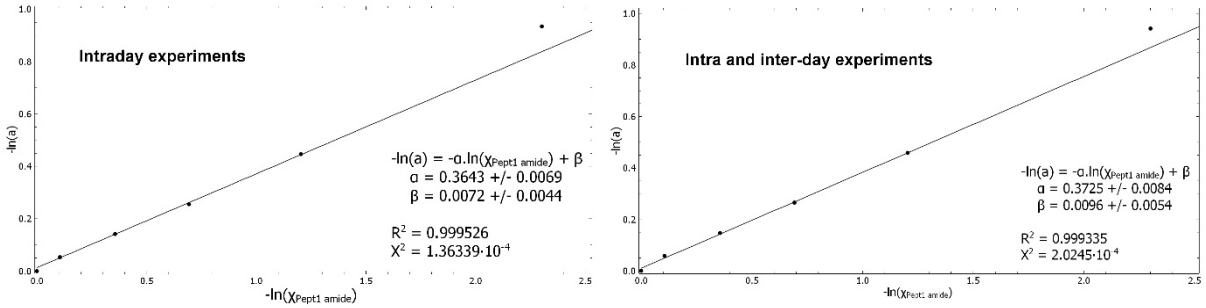


Figure S12: Left hand-side: SY curves obtained for different mixtures of Pept1 amide/Pept1 acid for intra- and inter-day data. Data were fitted with linear combinations of SY curves fitted for pure compounds to obtain the coefficient a. Right hand-side: the coefficient a obtained from the optimal fitting of SY data points (diagram on the left) are plotted as a function of molar ratio of Pept1 amide above 0.5 for the prepared solutions.



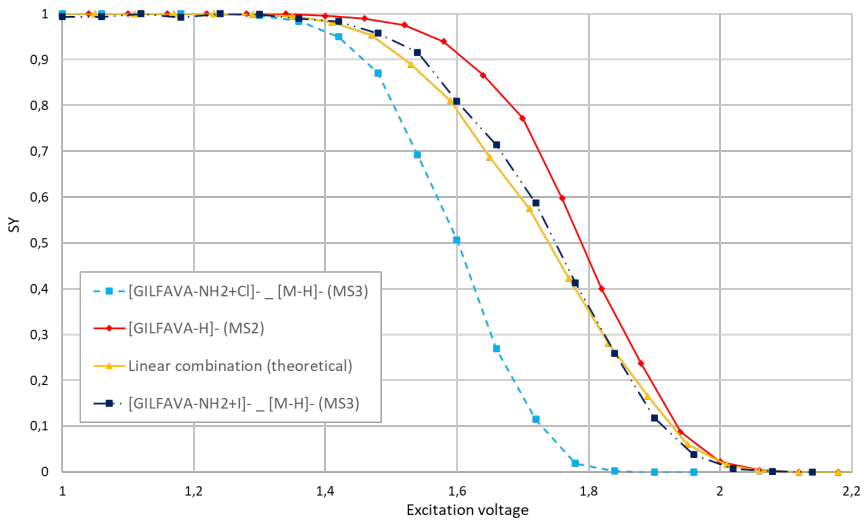
SY curves for different mixtures of Pept1 amide/acid that were obtained during a single day (repeated 3 times), were also measured once a week during 3 weeks. All data were collected and gathered in Figure S12 left-hand-side. Following the procedure explained in the main body of this work (see "Quantification trials" section of the paper), curves were fitted with a linear combination of Boltzmann-type functions obtained from the fitting of SY curves obtained with pure compounds (1:0 and 0:1). The parameter a obtained was then plotted as a function of the molar fraction of the peptide1 amide form (right-hand-side diagram in Figure S12). Similar to intra-day experiments (cf. Figure 5), a linear regression can be used with very good performance to interpolate data points as long as the amide form is predominant in the mixture.

Figure S13: Logarithmic plots for the numerically determined "a" molar fraction of Pept1 amide as a function of the natural logarithm of experimental molar fraction of the prepared solutions. Intra-day experiments are presented on the left hand-side while the whole set of data are presented on the right hand-side diagram. Linear regression models are also presented on the diagrams together with their related performances indicators



Quantification was also evaluated by using logarithmic plots from right hand-side diagrams in figures 5 and S12. The left diagram in Figure S13 above, demonstrate an excellent linear correlation between the natural logarithms of the proportion of the native amide Pept1 (peptide 1 in Table 1) determined numerically, namely parameter "a" above-mentioned, and its molar fraction in the prepared solution, namely χ_amide. The linear regression is validated when considering data points ranging from 100% down to 30% of the amide peptide molar fraction; eventually, extrapolation to lower fractions of the amide form may be acceptable according to the low difference of the χ_amide = 0.9 data point as compared with the linear model. This observation is confirmed with measurements repeated over different weeks (diagram on the right hand-side, same Figure) although with a slightly lower performance due to the dispersion of data points (see Figure S12). However, it must be mentioned the drawback of logarithmic plots is the increase in the error of prediction for the linear model obtained when larger values of the independent variable are considered (in this case, when the molar fraction of the amide form is decreased).

Figure S14: Linear mixture curve of GILFAVA-NH_2 and GILFAVA peptides (n°2 in Table 1)



Linear curve of 0.3:0.7 mixture of GILFAVA-NH_2 and GILFAVA respectively.

2) Cationisation au magnésium

La dissociation des peptides amide et acide par la technique des ions survivants a également été étudiée par une cationisation au magnésium. En effet, les deux ions Na^+ et Mg^{2+} ont pratiquement le même rayon atomique (respectivement 1.8 et 1.5 Å), assurant ainsi une interaction de l'ion avec le peptide pour le magnésium. De plus, ces deux ions présentent deux états de charge différents, pouvant potentiellement induire des conformations différentes en phase gazeuse générant ainsi des comportements de fragmentation différents.

Les peptides sélectionnés pour réaliser ces expériences ont été choisis en fonction des résultats obtenus lorsqu'ils étaient cationisés par un ion sodium, afin de voir si l'ion magnésium permet ou non de générer des comportements différents. Le premier couple sélectionné a été dissocié par la technique des ions survivants (peptides n°1 dans la publication précédente, LM25 et LM25A) tandis que le second ne l'a pas été (peptides n°13 dans la publication précédente, LM93 et LM93A).

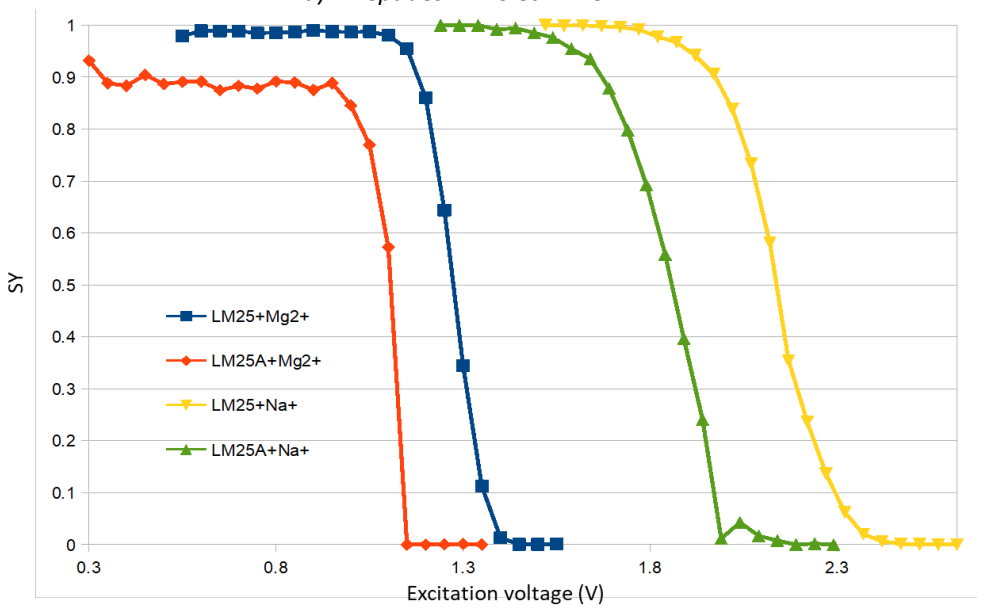
Les courbes réalisées à partir de la cationisation des peptides par le magnésium ont été générées en parallèle de celles issues de la cationisation par le sodium sur deux couples de peptides (voir Tableau 1 et Figure 1).

Tableau 1 : Séquences et masses des peptides amide et acide cationisés par un ion sodium ou magnésium.

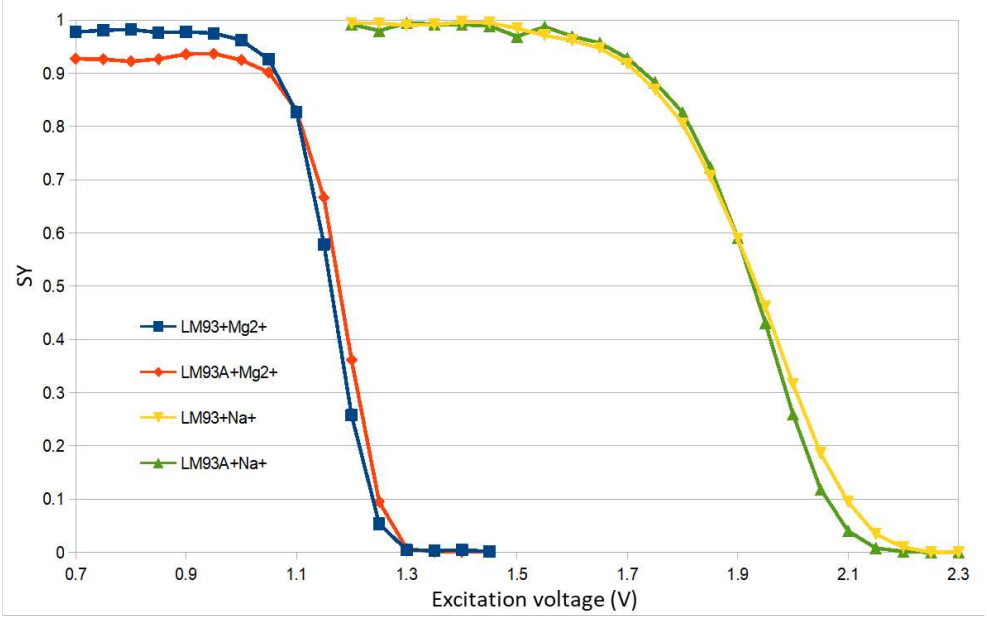
Nom	Séquence	Fonction C-ter	$[M+Na]^+$	$[M+Mg]^{2+}$
LM25	APIAGFV	$-NH_2$	695.3851	348.3502
LM25A		-OH	696.3691	348.8422
LM93	LAVGIAE	$-NH_2$	693.3906	347.3529
LM93A		-OH	694.3746	347.8449

Figure 1 : Courbes SY de peptides amide et acide obtenues suite à une cationisation par un ion magnésium comparées à celles obtenues par un ion sodium

a) Peptides LM25 et LM25A



b) Peptides LM93 et LM93A



Comme le montre la Figure 1, les énergies de collision nécessaires à la dissociation des peptides cationisés par un ion magnésium sont inférieures à celles nécessaires aux peptides sodés. Cela s'explique simplement par l'état de charge des ions précurseurs : les ions dichargés se dissocient à des énergies moins élevées par rapport à des ions monochargés.

Cependant, la cationisation des peptides amide et acide par un ion magnésium ne semble pas permettre d'obtenir de résultats différents de ceux obtenus lorsqu'ils sont sodés. Cela pourrait être dû au fait que les peptides ne soient pas assez grands pour générer des conformations différentes en phase gazeuse.

3) Impact de certains résidus

Comme vu précédemment, il est également possible d'observer un écart de 0.984 Da entre les résidus qui possèdent sur leur chaine latérale une fonction acide carboxylique (Asp et Glu) et ceux présentant une fonction amide (Asn et Gln). Pour étudier l'influence de la régiosélectivité de la déamidation de la fonction C-terminale ou de la chaine latérale sur les résultats des courbes SY obtenues, des peptides supplémentaires ont été synthétisés sous forme amide et acide (synthèses décrites en introduction).

Les séquences peptidiques ont été conçues stratégiquement pour observer exclusivement l'effet des résidus étudiés, en ajoutant uniquement des résidus aliphatiques (L, A, V, G, I) n'ayant pas d'impact sur la fragmentation peptidique. Les couples de résidus (D/N et E/Q) ont été placés en position C-terminale de la séquence peptidique ou en son sein dans le but d'observer une possible influence de la position du résidu sur le comportement de fragmentation (voir Tableau 2).

Tableau 2 : Séquences des peptides synthétisés en version amide et acide.

	-NH_2	$[M+Na]^+$	-OH	$[M+Na]^+$
LAVGIAN	EL1	678.3909	EL1A	679.3749
LAVGIAD	EL2	679.3749	EL2A	680.3589
LAVNIAG	EL3	678.3909	EL3A	679.3749
LAVDIAG	EL4	679.3749	EL4A	680.3589
LAVGIAQ	EL5	692.4065	EL5A	693.3906
LAVGIAE	EL6	693.3906	EL6A	694.3746
LAVQIAG	EL7	692.4065	EL7A	693.3906
LAVEIAG	EL8	693.3906	EL8A	694.3746

Les effets de chaque résidu seront tout d'abord étudiés individuellement sur la séparation des courbes SY, selon leur position dans la séquence peptidique. Il est également possible d'observer des différences de comportement de fragmentation en fonction de la longueur de la chaine carbonée de la chaine latérale des résidus (pour Asp/Asn : un carbone entre le carbone alpha et la fonction de la chaine latérale ; pour Glu/Gln : deux carbones).

Comme indiqué dans le Tableau 2 par les cellules grisées, les peptides amides de même séquence contenant un résidu acide D ou E et leurs versions acides contenant un résidu amide N ou Q sont des structures isomères (même formule élémentaire). Des courbes SY seront donc tracées pour voir s'il est possible par cette méthode de différencier une déamidation sur la fonction C-terminale d'un peptide amide, et une déamidation sur une chaine latérale d'un résidu amide.

a) Effets des résidus amides et acides

Résidus amides (N et Q)

La présence d'un résidu amide dans la séquence de peptides acides et amides ne semble pas générer des différences de fragmentation entre les deux formes lorsqu'ils sont protonés (voir **Annexe 2-3.1**). De plus, comme vu précédemment, la nature de la fonction C-terminale n'influe pas sur la

fragmentation des peptides protonés. Les résidus N et Q n'étant pas connus pour influencer la fragmentation des peptides protonés, il est peu probable que l'application des courbes SY sur cet état d'ionisation puisse séparer les courbes obtenues. De ce fait, les courbes SY ont directement été réalisées à partir de la fragmentation des peptides amides et acides sodés (voir Figure 2).

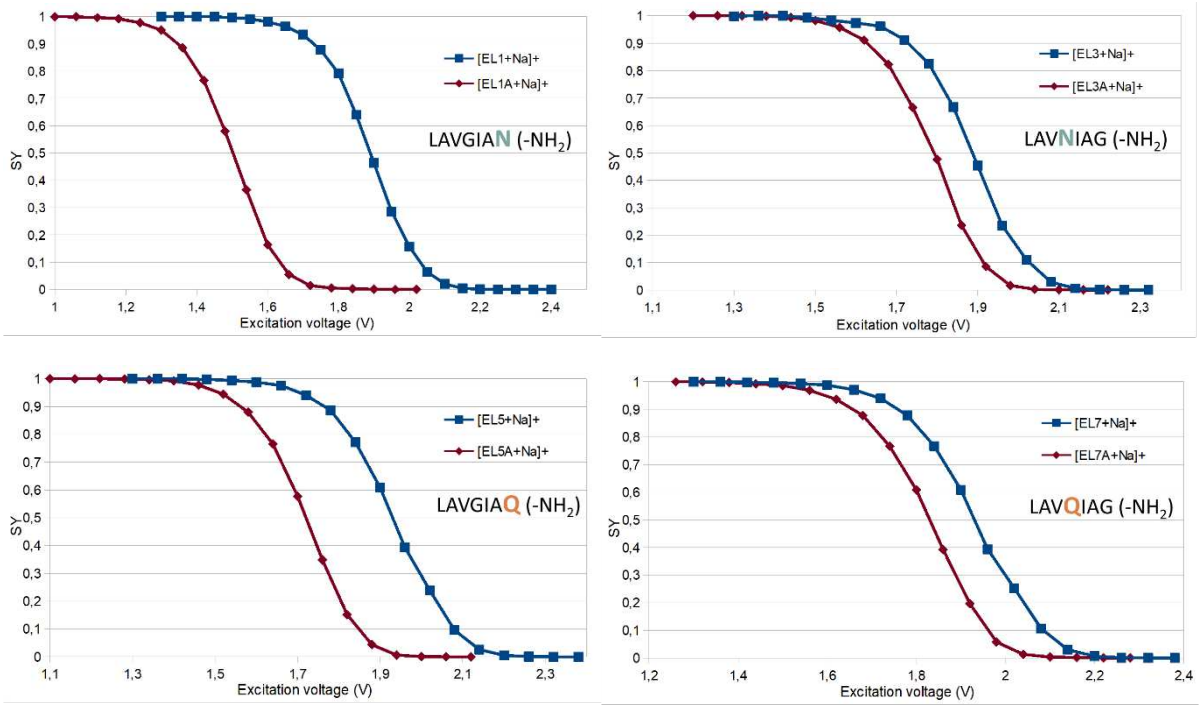


Figure 2 : Courbes SY de peptides contenant un résidu amide en position C-terminale ou en milieu de séquence

La position du résidu amide (N ou Q) dans la séquence peptidique semble influencer la fragmentation des peptides, et donc par conséquent la séparation des courbes SY. Lorsque le résidu se trouve en position C-terminale, les courbes SY sont bien dissociées. Cela peut être expliqué par les fragmentations des peptides acides et amides nettement différentes (voir les spectres MS/MS correspondant en **Annexe 2-3.2**). Par rapport aux peptides acides, les peptides amides se fragmentent pour donner une plus grande proportion d'ions de séquence (ions de type y, b et a). La dissociation majoritaire observée dans le cas des peptides acides correspond à une perte d'ammoniac issue de la fonction amide de la chaine latérale des résidus N ou Q.

Au contraire, si le résidu amide se trouve au milieu de la séquence du peptide dissocié, les spectres MS/MS des formes acides et amides obtenus semblent similaires en apparence : les mêmes types d'ions sont retrouvés (voir **Annexe 2-3.3**). Cependant, les courbes SY issues de la dissociation des deux formes sont séparées, démontrant ainsi des comportements de fragmentation différents entre les deux peptides. Dans le cas des peptides acides, la formation de l'ion $[b_6+Na+OH]^+$ obtenu par exclusion du résidu C-terminal est prédominante. Les peptides amides quant à eux semblent produire des ions de type a et y plus intenses et plus nombreux que pour la forme acide correspondante. Toutefois, au vu de la séparation des courbes, ces différences de comportement de fragmentation entre les peptides acides et amides étudiés semblent moins marquées que lorsque le résidu se trouve en position C-terminale.

Résidus (D et E)

Comme dans le cas des peptides amides et acides contenant un résidu amide dans leur séquence, la présence d'un résidu acide ne permet pas de générer des différences de fragmentation entre les deux formes (voir **Annexe 2-3.4**). Comme il a pu être montré auparavant, la présence d'un résidu acide dans la séquence de peptides ne permet pas de séparer les formes acides et amides par la technique des ions survivants. De ce fait, les courbes SY ont été générées à partir de la dissociation des peptides cationisés par un ion sodium (voir Figure 3).

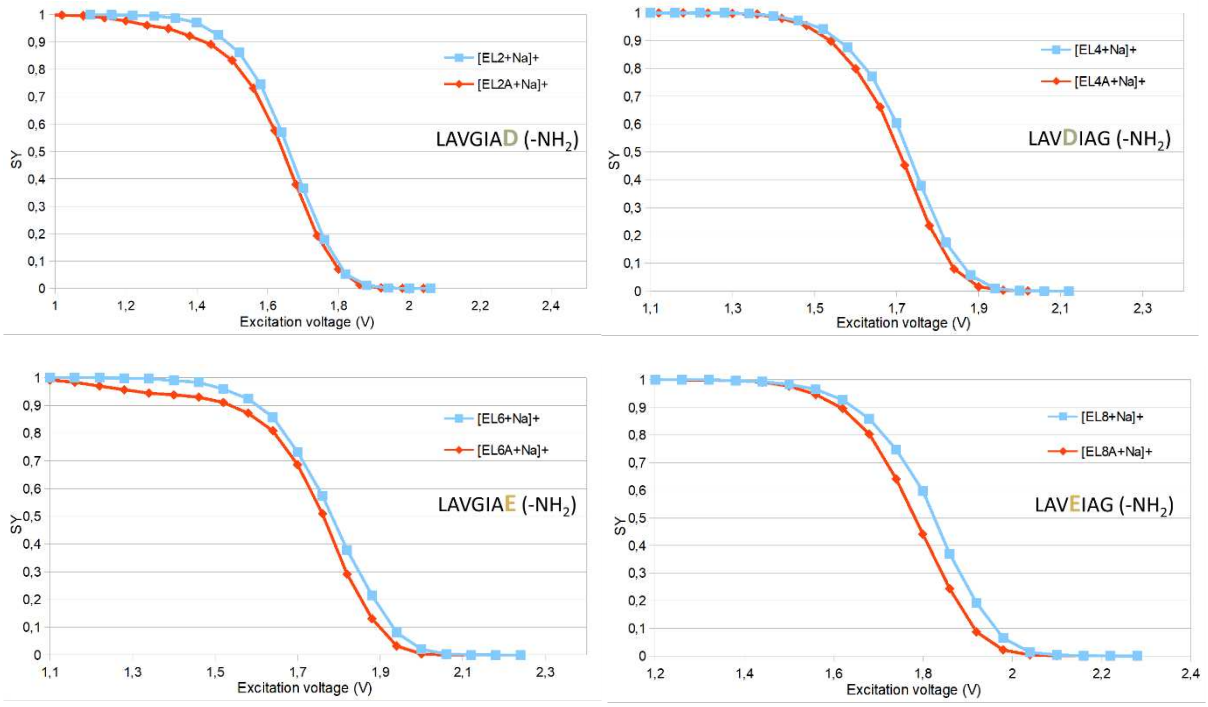


Figure 3 : Courbes SY de peptides contenant un résidu acide en position C-terminale ou en milieu de séquence

A l'opposé des résidus amides (N et Q), la position du résidu acide (D ou E) ne semble avoir aucune influence sur la séparation des courbes. Lorsque le résidu se trouve en position C-terminale de la séquence peptidique, l'ion majoritaire observé pour la dissociation du peptide amide correspond à une perte d'ammoniac. Pour le peptide acide, il s'agit de l'ion $[b_6+Na+OH]^+$ (voir **Annexe 2-3.5**).

Lorsque le résidu acide se trouve en milieu de séquence, l'effet de la fonction acide carboxylique de la chaine latérale prend le dessus sur toutes les autres voies de fragmentation et génère un ion $[b_4-H+Na]^+$ (voir **Annexe 2-3.6**).

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment, démontrant que le mode MS^3 sur les ions de type y est essentiel pour la séparation des peptides contenant un résidu acide. Sous forme protoné, l'effet acide aspartique/glutamique est également observé. La réalisation des courbes SY à partir de cet état d'ionisation ne permettrait pas d'obtenir une meilleure séparation de courbes.

b) Etude de la régiosélectivité (chaine latérale vs squelette)

Afin de savoir s'il est possible de pouvoir différencier deux ions isomères possédant une déamidation sur une chaine latérale d'un résidu ou sur la fonction C-terminale du squelette d'un peptide amide, les courbes SY comparées sur un même graphe ont été enregistrées le même jour afin de pouvoir comparer les énergies de façon fiable (voir Figure 4).

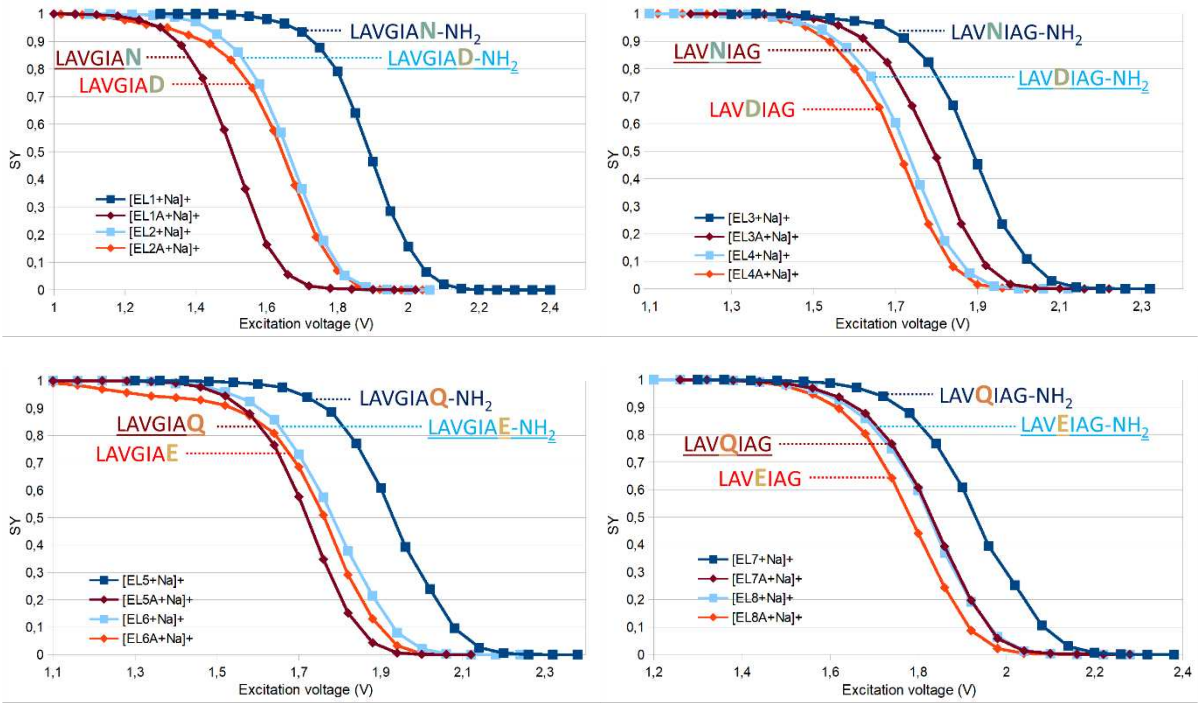


Figure 4 : Comparaison de courbes SY issues de la fragmentation de peptides isomères (séquences soulignées)

Comme visualisé par les courbes SY ci-dessus, la position ainsi que la longueur de la chaine latérale du résidu qui porte la fonction acide ou amide a un impact sur la séparation des ions isomères par la technique des ions survivants.

Il semble plus facile de pouvoir différencier ces ions lorsque le résidu amide d'un peptide acide et le résidu acide d'un peptide amide d'une même séquence se trouve en position C-terminale (LAVGIAD-NH_2/LAVGIAN ou LAVGIAE-NH_2/LAVGIAQ). En effet, la dissociation des peptides contenant un résidu D ou N, différant par la position de ce dernier, sont distinctes comme le démontre la Figure 4. Lorsque le résidu se trouve en position C-terminale, il existe peu de différence de fragmentation : les deux peptides sodés forment un ion $[b_{n-1}+Na+OH]^+$, l'exclusion du résidu C-terminal pouvant être générée soit à partir de la fonction acide carboxylique C-terminale du peptide acide, soit par la fonction acide de la chaine latérale du résidu D en position C-terminale du peptide amide (voir Figure 5). On peut ainsi supposer que la génération d'ions issus de l'exclusion du résidu C-terminal nécessite plus d'énergie pour un peptide amide que pour un peptide acide, permettant ainsi de différencier les deux courbes SY issus de ces deux peptides.

Cependant, lorsque le résidu se situe au milieu de la séquence peptidique, l'effet de l'acide aspartique prend le dessus sur les autres voies de fragmentation (voire Figure 5). De ce fait, les courbes SY de chaque peptide sont basées sur des voies de fragmentation complètement différentes, avec des énergies de dissociation propres à chacun. Par conséquent, l'activation du peptide amide génère plus d'ions séquences que le peptide acide (le résidu N ne semble pas influencer la fragmentation

peptidique), expliquant alors le rapprochement des deux courbes SY par rapport à celles obtenues lorsque le résidu se trouve en position C-terminal de la séquence peptidique.

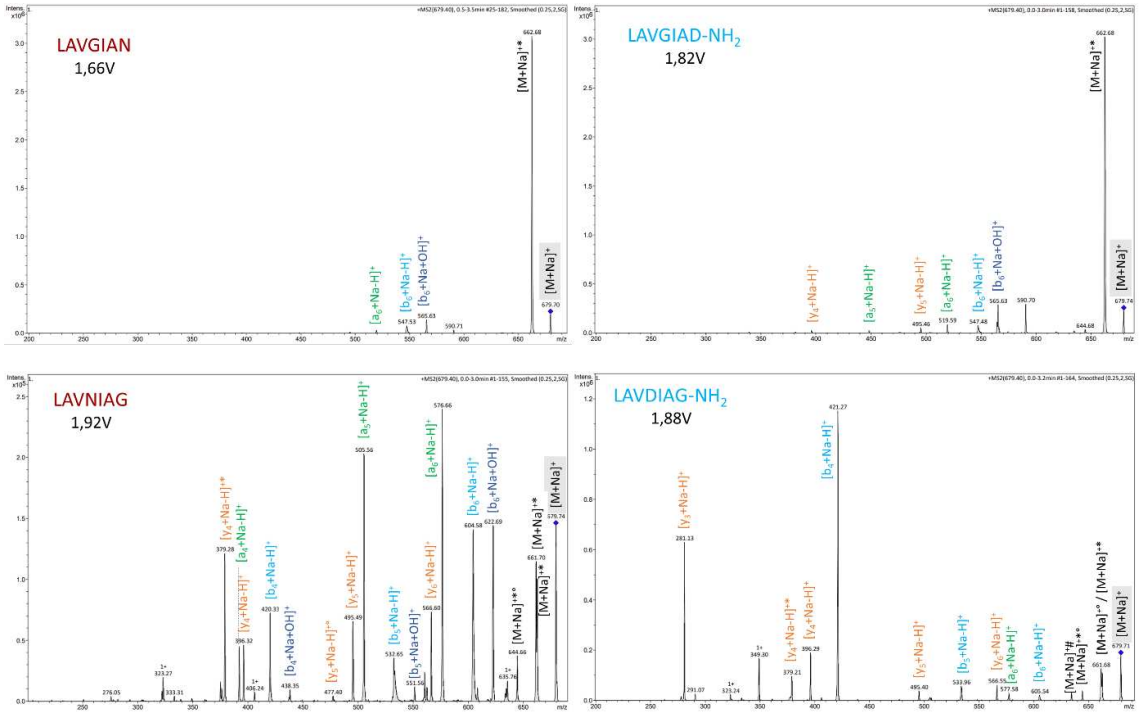


Figure 5 : Comparaison des spectres MS/MS obtenus lorsque le résidu N ou D respectivement présent dans la séquence d'un peptide acide ou amide, en position C-terminale ou en milieu de séquence (SY ≃ 1)

Les mêmes comparaisons ont été réalisées pour les séquences similaires avec les résidus E et Q (voir Figure 6).

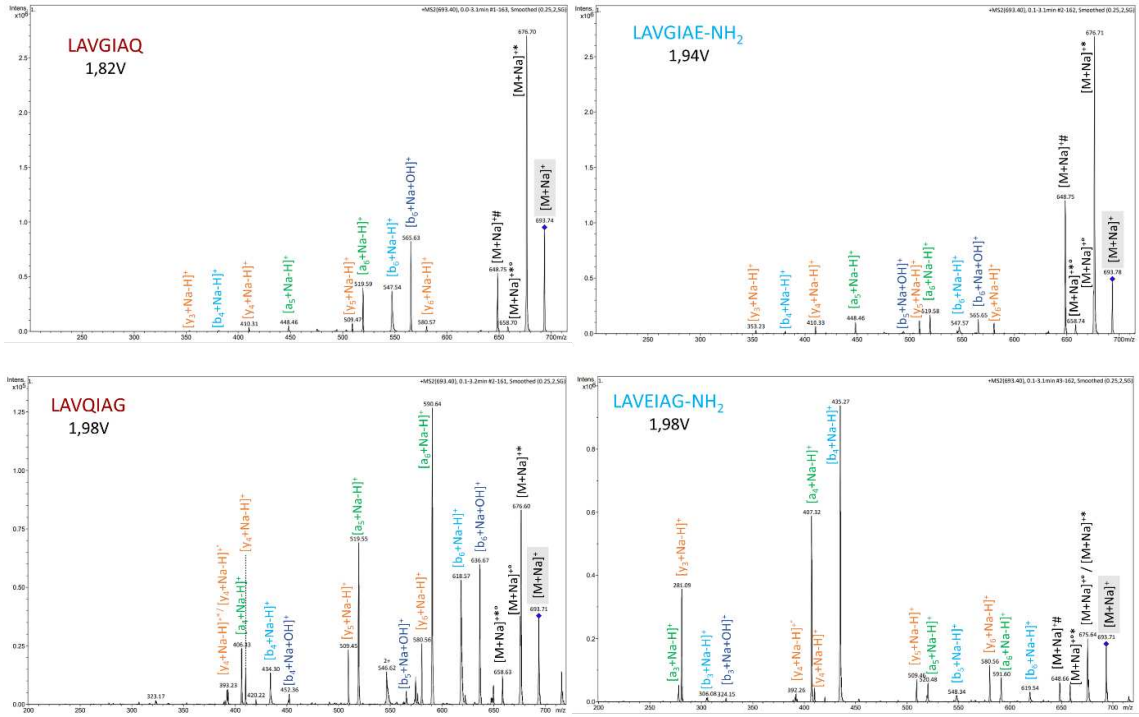


Figure 6 : Comparaison des spectres MS/MS obtenus lorsque le résidu Q ou E respectivement présent dans la séquence d'un peptide acide ou amide, en position C-terminale ou en milieu de séquence (SY ≃ 1)

La différence d'un carbone dans la chaine latérale de ces résidus semble atténuer les différences de fragmentation entre les peptides acides et amides, peu importe la position du résidu dans la séquence. Cela pourrait s'expliquer par des intermédiaires de réaction. Pour expliquer la formation des ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ à partir de la fonction acide carboxylique C-terminale d'un peptide acide sodé, Renner et Spiteller ont proposé un mécanisme réactionnel qui se résume en une attaque nucléophile du carboxylate C-terminal sur le carbonyle du résidu précédent, permettant ainsi la libération du résidu C-terminal [25] (voir Figure 7).

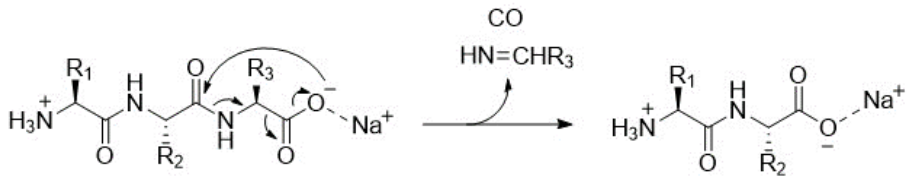


Figure 7 : Mécanisme proposé par Renner et Spiteller pour expliquer la formation d'ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$

Si ce mécanisme est adapté à un peptide amide contenant un acide aspartique, cela reviendrait à passer par un cycle intermédiaire de 6 chainons à partir de l'attaque nucléophile du carboxylate de la chaine latérale, formé par la présence de l'ion sodium sur le carbonyle du résidu C-terminal précédent. Appliqué à l'acide glutamique, cela reviendrait à former un cycle à 7 chainons, qui est énergétiquement moins favorable qu'un cycle à 6. Il est alors possible de comprendre pourquoi d'autres voies de fragmentation sont favorisées expliquant la présence d'autres ions de séquence sur les spectres MS/MS lorsque le résidu se trouve en position C-terminale. De ce fait, les dissociations des peptides amides et acides deviennent très similaires, expliquant alors la perte de séparation des courbes SY.

Lorsque le résidu E se trouve en milieu de séquence, l'effet acide aspartique est retrouvé. Cet effet permet d'expliquer le rapprochement des courbes SY des peptides amides et acides, comme vu précédemment.

Pour conclure, les courbes SY permettent de répondre de manière partielle à la problématique de régiosélectivité de la position acide/amide (chaine latérale vs squelette). En effet, la séparation de peptides isomères (peptide amide contenant un résidu acide (D/E) vs peptide acide contenant un résidu amide (N/Q)) dépend de la nature du résidu ainsi que de sa position dans la séquence. Il se trouve que lorsque ces résidus se trouvent en position C-terminale, la différenciation des isomères est plus aisée à partir des courbes SY que lorsqu'ils sont positionnés en milieu de séquence. De plus, la longueur de la chaine carbonée de la chaine latérale qui sépare le squelette peptidique de la fonction du résidu impacte également cette distinction. Ainsi, il est plus aisé de séparer les isomères lorsqu'il s'agit du couple D/N que E/Q : la chaine latérale plus courte donne lieu à des comportements de fragmentation différents entre les peptides acide et amide.

Cependant, malgré une meilleure séparation, les spectres MS/MS ne permettent pas de répondre à une problématique de séquençage *de novo* avec uniquement à disposition cette expérience MS^2. Comme vu sur la Figure 6, la voie de fragmentation générant la formation d'ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ est largement favorisée, diminuant alors la richesse d'information de séquence qui peut être obtenue lors de dissociation en MS^2. Cela peut être corrigé par l'ajout d'expériences MS^n complémentaires, demandant alors un peu plus de temps d'analyse. Toutefois, malgré ces expériences additionnelles, seule la partie N-terminale des peptides sera plus enrichie en information. On peut uniquement se

baser sur la présence ou non d'ions de type y pour supposer la présence d'une fonction amide C-terminale. Les résultats obtenus avec les résidus E et Q sont donc à contrebalancer avec cet aspect dans le cadre d'un séquençage *de novo*.

4) Peptides dichargés

Uniquement des peptides ayant une masse molaire inférieure à 1000 g.mol^{-1} ont été utilisés pour développer la méthode des ions survivants, générant ainsi majoritairement des espèces monochargées suite à une ionisation ESI. Deux peptides de même séquence, différant par leur fonction C-terminale, d'environ 2000 g.mol^{-1} (voir Tableau 3) ont alors été sélectionnés pour vérifier la faisabilité de la méthode à partir d'ions dichargés. L'état d'ionisation $[M+Na+H]^{2+}$ a été choisi pour conserver des voies de fragmentation générées par l'ajout d'un ion sodium, qui ont permis de différencier les peptides amides et acides monochargés. Les dissociations de ces peptides dichargés ont donné les courbes SY visualisées en Figure 8.

Tableau 3 : Séquences et masses des peptides sélectionnés de poids moléculaires supérieurs à 1000 g.mol^{-1}

Nom	Séquence	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+Na+H]^{2+}$
NS16	VLHDFAFAMVGPLAEYK-NH_2	1906.9884	1928.9703	964.9891
NS16A	VLHDFAFAMVGPLAEYK	1907.9724	1929.9543	965.4811

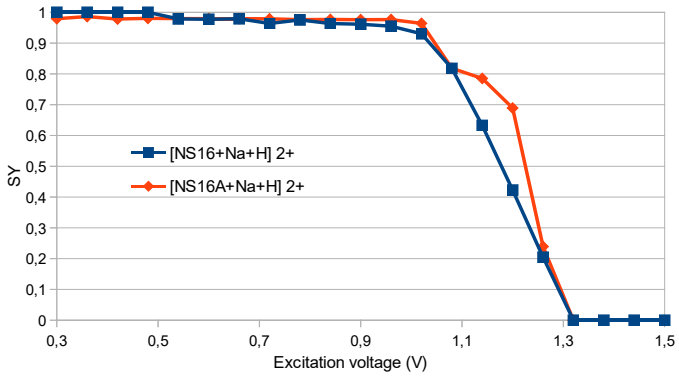


Figure 8 : Courbes SY obtenues à partir de peptides dichargés

Par rapport aux spectres MS/MS d'ions monochargés, le bruit de fond enregistré lors de la dissociation d'ions dichargés est plus intense, affectant alors le calcul d'ions survivants (voir **Annexe 2-4.1**). De ce fait, pour pouvoir tracer ces courbes commençant avec un SY=1, seuls les ions issus de la dissociation des peptides ont été triés manuellement pour réaliser le calcul du taux d'ions survivants.

Les ions retrouvés sur les spectres MS/MS sont majoritairement sous forme monochargés : ions b protonés et ions y sodés. Ce mélange d'états d'ionisation ne semble pas permettre la différenciation des peptides amides et acides par la technique des ions survivants comme le démontre la Figure 8. Une possibilité pour optimiser la méthode sur ces peptides multichargés serait alors de sélectionner l'état d'ionisation $[M+2Na]^{2+}$ afin de générer uniquement des voies de dissociation spécifiques aux adduits sodium.

En l'état de nos investigations et des résultats qui ont été obtenus, la technique des ions survivants ne semble pas appropriée pour distinguer les formes acides et amides de peptides de tailles moyennes au-delà d'une dizaine de résidus.

5) Application à des peptides naturels isolés et caractérisés

Afin de vérifier la faisabilité de la technique des ions survivants pour des peptides naturels, des peptides amides et acides cycliques (présence d'un pont disulfure) issus d'un escargot de mer venimeux Conus Miliaris ont été fournis par S. Dutertre. Ces peptides ont été tout d'abord isolés et caractérisés, puis synthétisés pour confirmation de structure par S. Dutertre et ses collaborateurs. Deux peptides cycliques sous formes acide et amide ont été étudiés, les séquences linéaires avant formation du pont disulfure sont données à titre indicatif (voir Tableau 4).

Tableau 4 : Séquences et masses monoisotopiques des peptides cycliques étudiés

Peptide	**Sequence**	**$[M+H]^+$**	**$[M+Na]^+$**	**$[M-H+2Na]^+$**
	Peptides cyclisés			
TPU-11	**C**FPGN**C**PDS-NH_2	936.3339	958.3158	980.2977
TPU-10	**C**FPGN**C**PDS	937.3179	959.2998	981.2817
	Peptides non cyclisés			
TPU-11$_{nc}$	**C**FPGN**C**PDS-NH_2	938.3495	960.3314	982.3133
TPU-10$_{nc}$	**C**FPGN**C**PDS	939.3335	961.3154	983.2973

La technique des ions survivants a tout d'abord été testée sur la dissociation des peptides protonés, comme montré en Figure 9 ci-dessous :

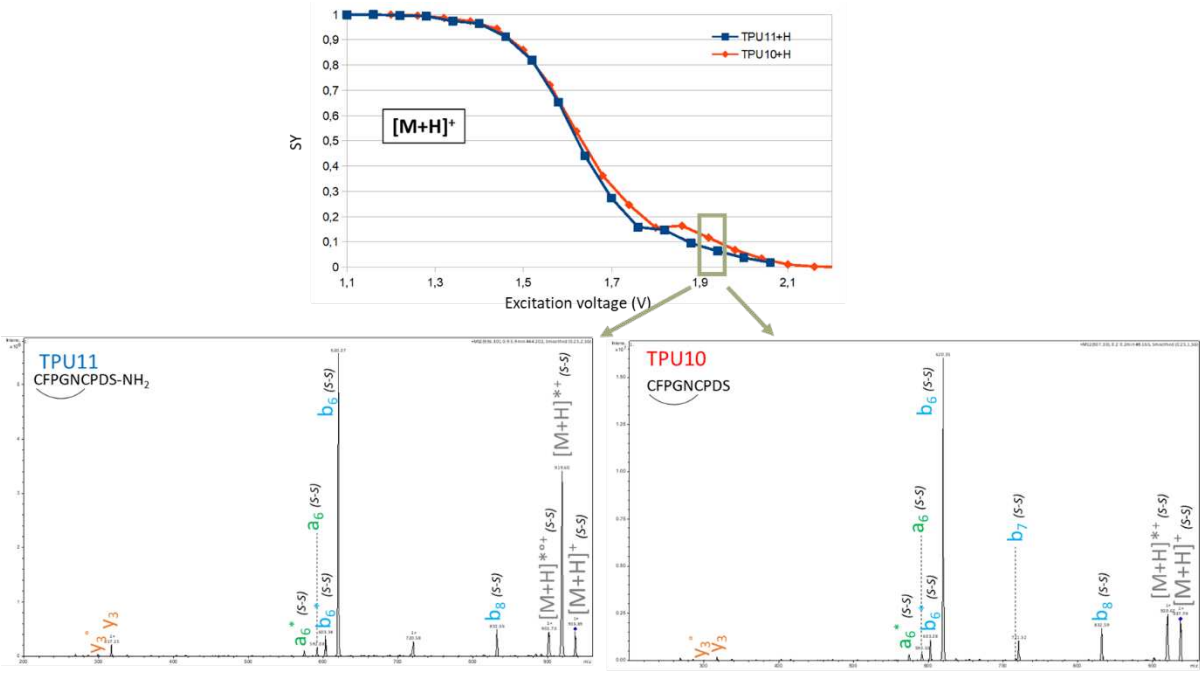


Figure 9 : Courbes SY des peptides cyclisés protonés avec les spectres MS/MS des peptides correspondant

Les peptides protonés amides et acides ne présentent pas de différences de fragmentation, qu'ils soient linéaires ou cycliques. Pour ces derniers, la présence du pont disulfure ne permet pas la fragmentation du squelette peptidique qui se trouve à l'intérieur du cycle.

La méthode est alors appliquée aux peptides cyclisés cationisés par un ion sodium. Deux états d'ionisation monochargés sont alors étudiés, $[M+Na]^+$ et $[M-H+2Na]^+$, dans le but de casser le pont disulfure et de générer des voies de fragmentation spécifiques aux deux peptides amide et acide.

[M+Na]⁺

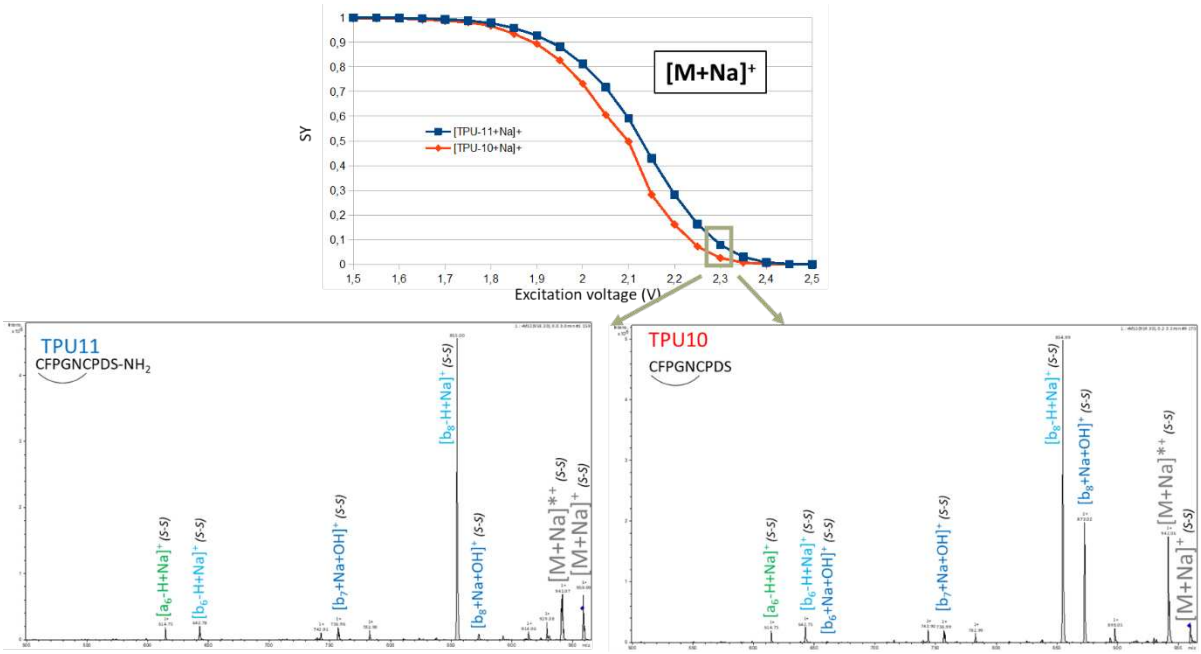


Figure 10 : Courbes SY des peptides cyclisés sodés sous forme $[M+Na]^+$ avec les spectres MS/MS des peptides correspondant

Tout comme pour les ions moléculaires protonés, la présence du pont disulfure empêche la fragmentation complète du squelette peptidique par l'agent d'ionisation sodium. De ce fait, aucun ion de type y n'est produit et le couple de peptides amide/acide n'est pas clairement séparé par la technique des ions survivants (les ions sodés renseignant la partie N-terminale ne permettent pas de séparer les peptides amide et acide). Il est à noter que l'ionisation par le sodium annihile l'effet proline (fragmentation favorisée en N-terminal de ce résidu imino acide dans le cas de la dissociation de peptides protonés).

Afin d'être sûr que l'agent d'ionisation sodium ne permet pas de casser le pont disulfure pour obtenir des ions supplémentaires de séquence, des expériences MS^3 ont été engagées sur l'ion $[b_8+Na+OH]^+$ (ion caractéristique de la fragmentation des peptides sodés qui est présent sur chaque spectre MS^2, comme le montre la Figure 10). Les courbes SY présentées dans la Figure 11 ont été réalisées dans cette condition. L'ion sélectionné étant moins intense dans le cas de la fragmentation du peptide amide TPU11 (voir spectre MS^2), la courbe générée par les expériences de spectrométrie de masse résolue en énergie est moins bien définie par rapport à celle du peptide acide.

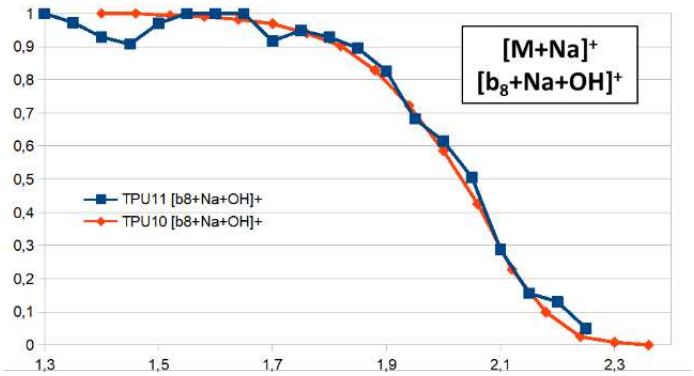


Figure 11 : Courbes SY issues d'expériences MS³ sur les ions $[b_8+Na+OH]^+$ produits par les peptides amides et acides cyclisés

Au vu des résultats obtenus en MS^2 et MS^3, la cationisation par un ion sodium ne semble pas permettre la rupture du pont disulfure des peptides, nécessaire pour générer des comportements de fragmentation différents entre les peptides amides et acides.

L'ionisation par un métal alcalin divalent tel que le magnésium permettrait, selon la publication de Kim et Beauchamp [26], de générer d'autres mécanismes de fragmentation qui pourraient potentiellement rompre le pont disulfure (entraînant la perte de S_2H_2) et ainsi produire d'autres ions de séquence, condition nécessaire pour séparer les peptides acides et amides avec la technique des ions survivants.

A ce titre, les expériences impliquant les fragmentations induites par le magnésium décrites dans le chapitre 1 ont montré des différences entre les peptides amides et acides, mais dans une mesure qui semble assez limitée pour espérer obtenir une meilleure séparation des courbes par rapport à la cationisation au sodium. Nous avons donc choisi de ne pas poursuivre dans cette voie sachant qu'il est toujours possible de réduire chimiquement le pont disulfure en amont de l'analyse (traitement de l'échantillon) pour revenir sur des séquences linéaires plus à même d'être séparées par l'intermédiaire des courbes SY comme explicité en chapitre 1.

Cependant, bien que le tracé des courbes SY n'ait pas été concluant pour la séquence étudiée, on peut se demander comme précédemment si cette cationisation au magnésium pourrait améliorer le recouvrement de séquence des peptides cyclisés par pont disulfure. Cela permettrait de séquencer ce type de peptide sans passer par des étapes de traitement d'échantillon (réduction/alkylation). De ce fait, le spectre MS^3 de l'ion $[b_8+Na+OH]^+$ issu du peptide acide a été interprété (voir Figure 12) (l'ion issu du peptide amide n'étant pas assez intense pour être étudié).

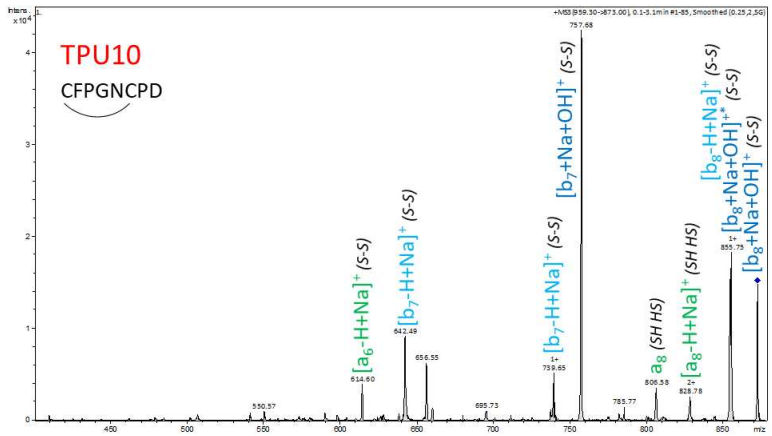


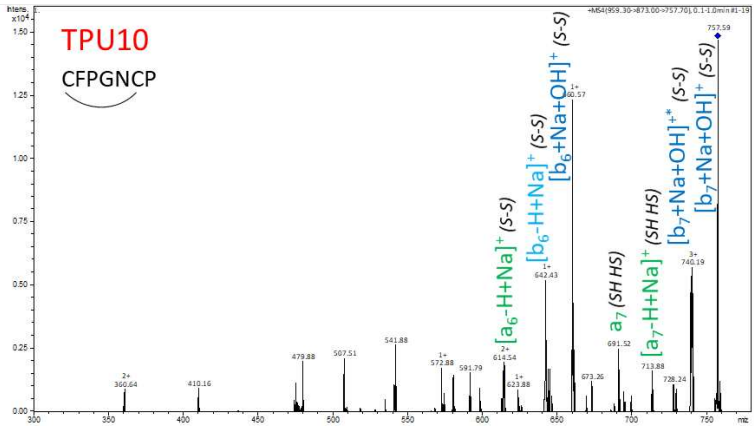
Figure 12 : Spectre MS^3 obtenu pour la fragmentation de l'ion $[b_8+Na+OH]^+$ du peptide acide TPU10 à une tension de 2,18V

La dissociation de l'ion $[b_8+Na+OH]^+$ issu de l'exclusion du résidu en position C-terminale semble générer des ions de type a provenant du peptide non cyclisé ($[a_8-H+Na]^+$ avec rupture du pont disulfure). Cependant, cet ion potentiellement informatif n'a pas pu être sélectionné pour réaliser des expériences MS^n ultérieures en raison de la trop faible intensité du signal.

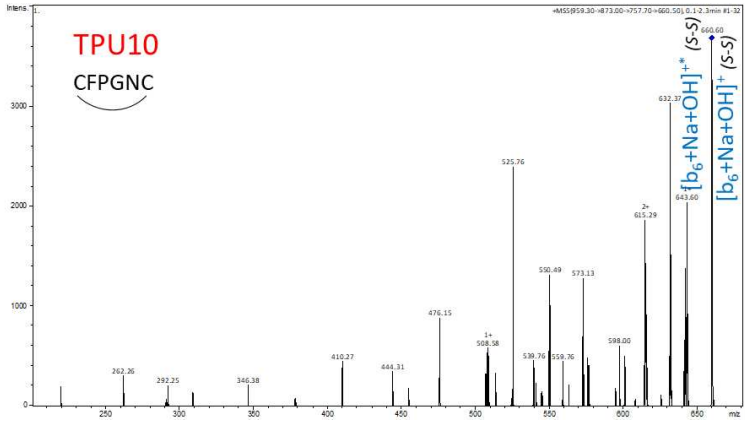
D'autres expériences MS/MS itératives ont donc été menées sur les ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ issus de la dissociation de l'ion $[b_8+Na+OH]^+$ afin de voir d'une part, si le phénomène se répète (production d'ion de type a avec rupture du pont disulfure) et d'autre part, s'il est possible d'augmenter le recouvrement de séquence en générant d'autres ions (voir Figure 13).

Figure 13 : Spectres MS^n sur les ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$

a) *Spectre MS^4 obtenu pour la fragmentation de l'ion $[b_7+Na+OH]^+$ du peptide acide TPU10 à une tension de 1,95V :*



b) *Spectre MS^5 obtenu pour la fragmentation de l'ion $[b_6+Na+OH]^+$ du peptide acide TPU10 à une tension de 1,80V :*



Du fait de la perte d'intensité des ions précurseurs sélectionnés, et sûrement dû à la présence du pont disulfure, il n'est pas possible de retrouver la séquence du peptide par l'intermédiaire de ces ions. De plus, on n'observe plus d'ions a issus de la rupture du pont disulfure sur le spectre MS^5 de l'ion $[b_6+Na+OH]^+$.

En résumé, la cationisation de peptides amide et acide cyclisés par un ion sodium sous forme $[M+Na]^+$ ne permet pas leur séparation par la technique des ions survivants dû à la présence du pont disulfure qui empêche la génération d'ion y. Il est probable que si certains résidus C-terminaux ne sont

pas inclus dans un cycle, des ions de type y soient générés permettant ainsi la séparation des deux formes de peptides en spectrométrie de masse résolue en énergie.

Concernant le recouvrement de séquence, la présence de l'agent d'ionisation sodium semble permettre de générer des ions a appartenant au peptide non cyclisé, résultant donc d'une rupture du pont disulfure. Cependant, la sensibilité du spectromètre de masse basse résolution utilisé ne permet pas de réaliser d'expériences MS^n ultérieures dû à la faible intensité de ces ions. Réaliser ces expériences sur des pièges à ions plus sensibles tel que l'Orbitrap™ pourrait potentiellement permettre de remonter la séquence du peptide cyclique d'intérêt.

[M-H+2Na]⁺

Il est possible d'obtenir un autre état d'ionisation tout en restant sur un ion monochargé en cationisant avec un ion sodium : $[M-H+2Na]^+$. Les mêmes expériences MS^2 et tracés des courbes SY ont été menées sur cet adduit (voir Figure 14).

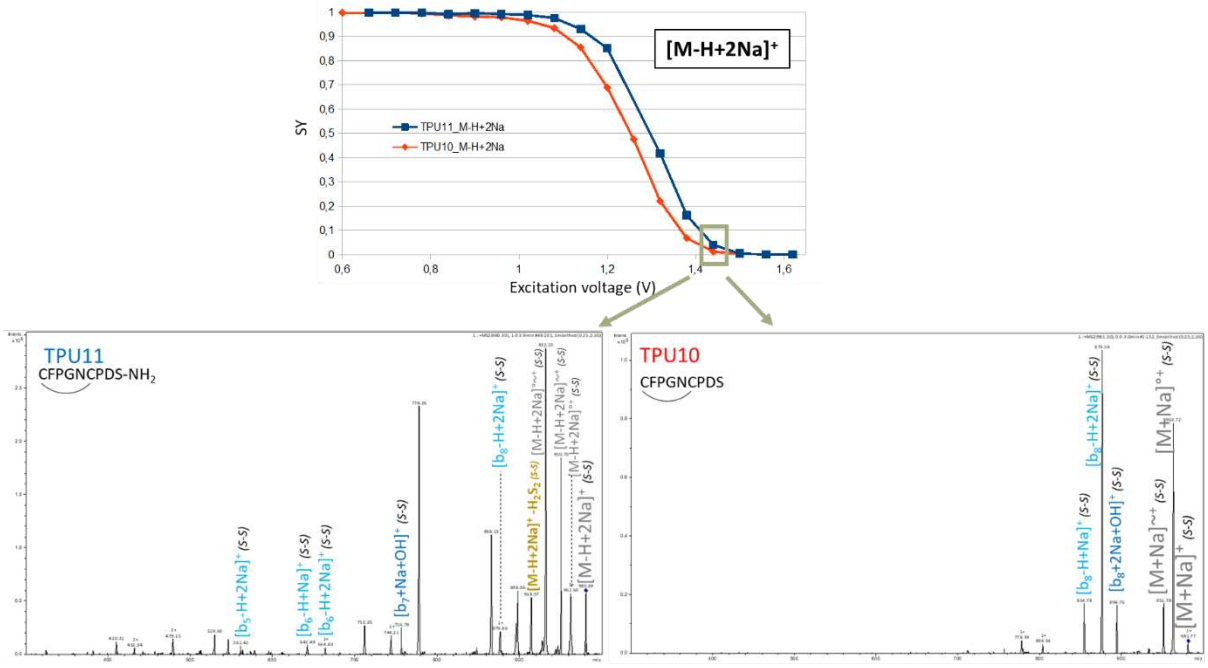


Figure 14 : Courbes SY des peptides cyclisés sodés sous forme $[M-H+2Na]^+$ avec les spectres MS/MS des peptides correspondant

Malgré les différences de fragmentation observées (voir spectres de la Figure 14), les courbes SY obtenues ne sont pas assez différenciées pour pouvoir dissocier le peptide amide sans fragmenter le peptide acide si celui-ci est présent. Contrairement aux résultats décrits dans la bibliographie [26], l'état d'ionisation $[M-H+2Na]^+$ n'a pas permis de fragmenter le pont disulfure du peptide acide. Cependant, une perte de S_2H_2 à partir de l'ion moléculaire du peptide amide est observée sur le spectre MS^2. On peut donc supposer que le pont disulfure a été cassé lors de la fragmentation de ce peptide amidé doublement sodé et de charge unitaire (z=+1) ouvrant la possibilité de conduire des expériences de MS itérative. Ainsi, une expérience MS^3 sur un piège à ions plus sensible pourrait être réalisée à

partir de l'ion issu de la perte de neutre (S_2H_2) pour sonder une amélioration de recouvrement de séquence de la forme amide.

6) Application à un mélange naturel complexe

L'analyse d'échantillons naturels nécessite l'usage d'une technique séparative comme la chromatographie liquide en amont du spectromètre de masse afin de pouvoir séparer tous les composants du mélange. Au vu de la complexité de ces derniers, il est possible que des peptides acide et amide, retrouvés par exemple dans le venin de l'escargot de mer Conus Textile [27], co-éluent en chromatographie liquide en raison de leurs propriétés physico-chimiques similaires. De ce fait, la caractérisation du peptide amide d'intérêt ne sera pas spécifique (superposition des massifs isotopiques des deux peptides). Cependant, la méthode des ions survivants précédemment développée pour répondre à cette problématique a été optimisée à partir d'infusions directes de peptides synthétiques dans la source du spectromètre de masse (amaZon Speed, Bruker) par l'intermédiaire d'un pousse-seringue. De ce fait, pour pouvoir réellement appliquer la technique des ions survivants à un mélange naturel complexe, la méthode a été ensuite adaptée et modifiée pour réaliser un couplage LC-MS/MS.

Pour cela, une méthode LC a tout d'abord été développée à partir d'un gradient linéaire usuellement utilisé pour l'analyse de venin [28–30], afin de séparer un couple de peptide amide et acide connu. Cette étape permet de s'assurer qu'il est possible de réaliser les courbes SY en configuration de couplage sur des peptides isolés. Puis, la méthode MS a été modifiée pour pouvoir répondre aux contraintes de temps d'élution qui sont réduits dû à l'utilisation d'une LC en amont. Une fois ces paramètres optimisés, le couplage a été réalisé pour tracer des courbes SY des peptides lorsqu'ils sont séparés en LC puis lorsqu'ils co-éluent (cas le plus probable en conditions d'analyses vénomiques). Chacune de ces dernières expériences a été effectuée avec les peptides dilués dans un mélange H_2O/ACN 50/50 (v/v), puis ajoutés artificiellement dans le venin Conus Textile.

a) Matériel et Méthode

Les deux peptides synthétiques utilisés pour réaliser ce développement de méthode sont repris dans le Tableau 5 :

Tableau 5 : Séquences et masses des peptides utilisés pour développer la méthode LC-MS des ions survivants

Nom	Séquence	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$
EL10	LAVGIAW-NH_2	728.4454	750.4273
EL10A	LAVGIAW	729.4294	751.7113

Ces peptides ont été choisis à partir des bons résultats obtenus au pousse-seringue (voir **Annexe 2-6.1**). Les peptides ont été dilués dans un mélange H_2O/ACN 50/50 (v/v) à une concentration de 5.10^{-5}M avec un ajout de NaCl (ratio molaire 1:1).

Les solvants utilisés en chromatographie liquide sont composés d'eau supplémentée de 0.1% d'acide formique (AF) pour la phase A et d'acétonitrile avec 0.1% AF pour la phase B. Le développement de la

méthode LC a été réalisé sur une colonne Luna® Omega 5µm PS C18 100Å 250*4.6mm (Phenomenex). Les peptides ont été détectés en UV à 214 nm.

Le venin utilisé pour mimer un échantillon naturel complexe a été dilué dans de l'eau à une concentration de 5 $mg.mL^{-1}$. Les peptides EL10 et EL10A ont été ajoutés artificiellement dans le mélange à une concentration de 5.10^{-5}M pour obtenir des absorbances similaires aux autres composés du venin (voir **Annexe 2-6.2**).

b) Développement d'une méthode LC

La première étape a consisté à développer un gradient permettant de séparer les peptides acide et amide, dans l'optique de générer des courbes SY par spectrométrie de masse par la suite. Pour ce faire, il a été nécessaire de réduire la résolution des pics du chromatogramme UV afin de gagner en temps d'acquisition. En effet, la méthode développée au pousse-seringue repose sur l'acquisition de 15 points par courbe au minimum, avec un temps d'acquisition de 3 minutes par point. Pour conserver une bonne résolution, des acquisitions de 3-4 secondes par point seraient requises, ce qui n'est pas suffisant pour obtenir des spectres MS^2 assez intenses pour tracer les courbes SY. En diminuant la résolution, les largeurs des pics du chromatogramme sont accrues et il devient alors possible d'augmenter les temps d'acquisition des spectres MS^2. Le gradient a donc été optimisé à partir d'un gradient linéaire pour séparer les peptides EL10 et EL10A afin de vérifier la faisabilité du couplage avant de passer sur un chromatogramme où les deux pics co-éluent (voir Figure 15).

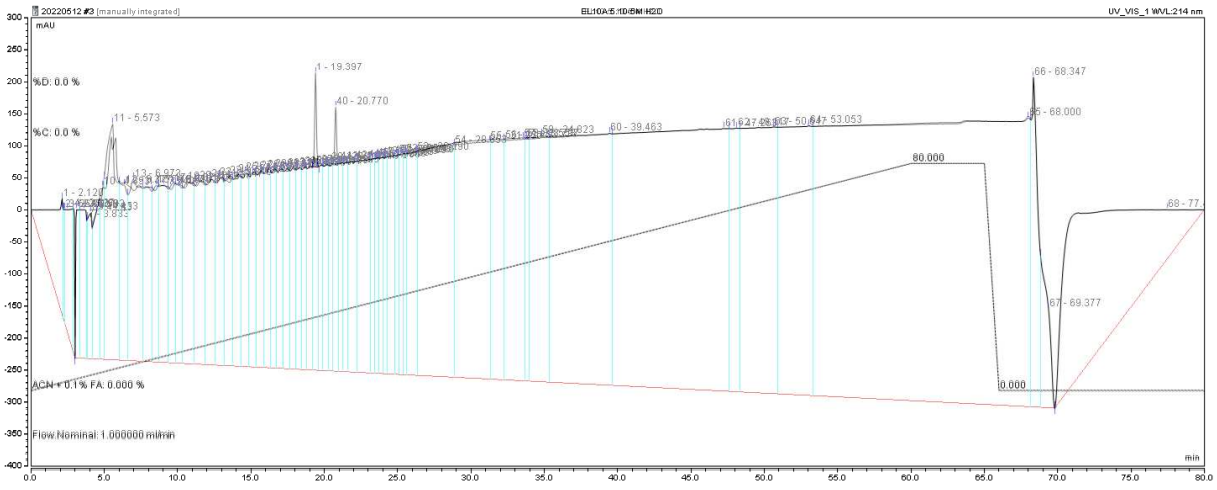


Figure 15 : Chromatogramme des peptides EL10 et EL10A avec un débit de 1 $mL.min^{-1}$.

La méthode LC a été par la suite développée sur le peptide acide seul. Tout d'abord, un plateau à 25% d'ACN correspondant au pourcentage de sortie du peptide a été établi afin d'élargir le pic chromatographique (voir **Annexe 2-6.3**). Le débit a été également réduit de 1 $mL.min^{-1}$ à 0.1 $mL.min^{-1}$ au temps d'entrée du peptide dans la cellule UV de l'instrument de chromatographie liquide, toujours dans le même objectif (voir **Annexe 2-6.4**). En réalisant ces modifications, le temps d'acquisition pour chaque point du chromatogramme masse est passé de 3 à 8 secondes.

Pour continuer d'optimiser ce temps, la tubulure située entre la sortie de colonne et la cellule UV a été modifiée en augmentant le diamètre de celle-ci : tubulure initiale : 0.15 mm^2 x 350 mm ; nouvelle

tubulure : 0.5 mm² x 1000 mm. En réalisant cela, la base du pic a été élargie (voir **Annexe 2-6.5**). Avec cette configuration, et toujours dans l'objectif de diminuer la résolution du pic chromatographique, la chute du débit de 1 mL.min^{-1} à 0.1 mL.min^{-1} a été déplacée au temps de sortie de la colonne et non plus au temps d'entrée de la cellule UV afin que les peptides puissent diffuser dans la tubulure de plus grand diamètre. Ces modifications ont permis d'obtenir des pics assez larges autorisant les acquisitions de spectres MS/MS de 10 secondes (voir **Annexe 2-6.6**).

L'application de cette méthode LC au mélange des deux peptides a permis d'obtenir le chromatogramme suivant :

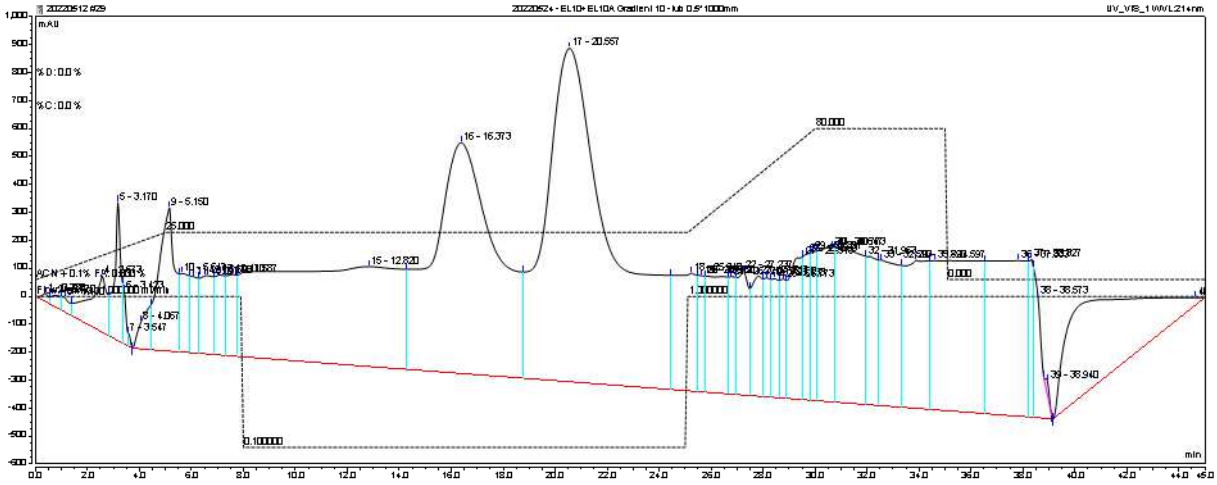


Figure 16 : Chromatogramme des peptides EL10 et EL10A avec le gradient optimisé

c) Modification de la méthode MS^2

En couplant le spectromètre de masse à une chromatographie liquide en amont, les temps d'acquisition de 3 minutes sont réduits à 10 secondes environ (les courbes SY correspondantes sont montrées en **Annexe 2-6.7**). En diminuant cette durée, le risque principal est de perdre en intensité d'ions et donc en qualité de courbe, pouvant potentiellement diminuer la capacité de séparer les peptides amide et acide. De ce fait, les paramètres du spectromètre de masse doivent être à nouveau optimisés au pousse-seringue. A ce stade, il est possible de jouer sur plusieurs paramètres : le Delay Time, le Fragmentation Time, la fenêtre d'isolation de l'ion précurseur (Width) ainsi que le mode de résolution du spectromètre de masse comme discuté en introduction.

Tout d'abord, le temps de délai des ions dans le piège (Delay Time) a été diminué afin d'accumuler plus d'ions sur le même temps d'acquisition. Cependant, cela a eu comme impact de diminuer l'amplitude de la séparation des courbes (voir **Annexe 2-6.8**). L'inverse a donc été réalisé, l'idée étant de diminuer le nombre d'ions accumulés en espérant augmenter leur intensité relative. Dans ce cas, une meilleure séparation des courbes SY a été observée (voir **Annexe 2-6.9**). Le temps de fragmentation (Fragmentation Time) a également été modifié en fonction du temps de délai appliqué dans chacun des deux cas.

Toujours dans l'optique d'augmenter l'intensité des ions sur les spectres MS^2 obtenus, la fenêtre d'isolation du peptide sodé (Width) a été élargie de 2.0 Da à 5.0 Da (voir **Annexe 2-6.10**), et la résolution a été diminuée (voir **Annexe 2-6.11**). Cependant, aucune de ces deux pistes d'investigation

n'a permis d'obtenir de résultats satisfaisants au niveau de la séparation des peptides amide et acide par la technique des ions survivants.

Les meilleurs résultats pour la séparation de courbe SY résultent d'un temps de délai de 300 ms, un temps de fragmentation de 100 ms avec une fenêtre de sélection de l'adduit sodium de 2.0 Da, avec le mode de résolution UltraScan (Speed : 32 500 *m/z*/sec) (voir Figure 17).

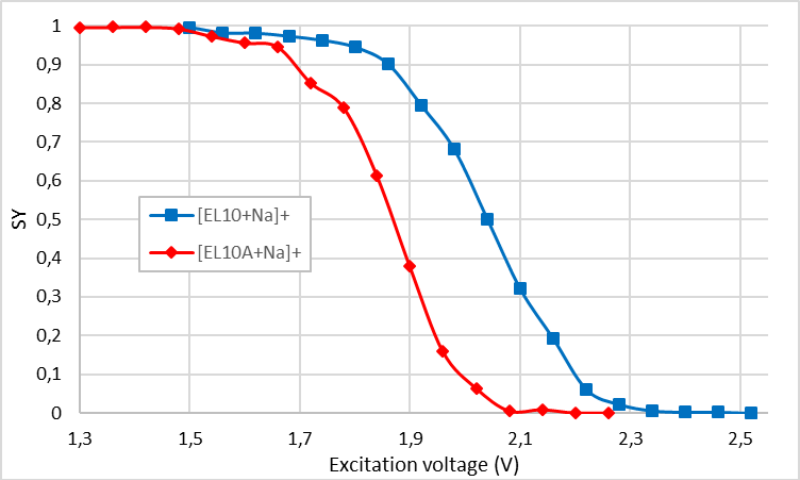


Figure 17 : Courbes SY des peptides EL10 et EL10A à 5.10^{-5}M injectés individuellement au pousse-seringue dans les conditions MS optimisées pour le couplage LC-MS

d) Couplage LC-MS/MS

Le couplage LC-MS a présenté une première difficulté : l'adduit sodium n'était plus présent sur le spectre MS, malgré l'ajout artificiel de NaCl dans l'échantillon. Le gradient LC commençant à 100% d'eau, le sel présent a été élué en tout début de gradient, ne permettant pas de former les adduits sodium nécessaires aux expériences en spectrométrie de masse.

De ce fait, un montage a été réalisé permettant d'ajouter du NaCl 10^{-2} M au temps de rétention des peptides, en aval de la cellule UV et en amont de la source du spectromètre de masse par l'intermédiaire d'un pousse-seringue (voir Figure 18).

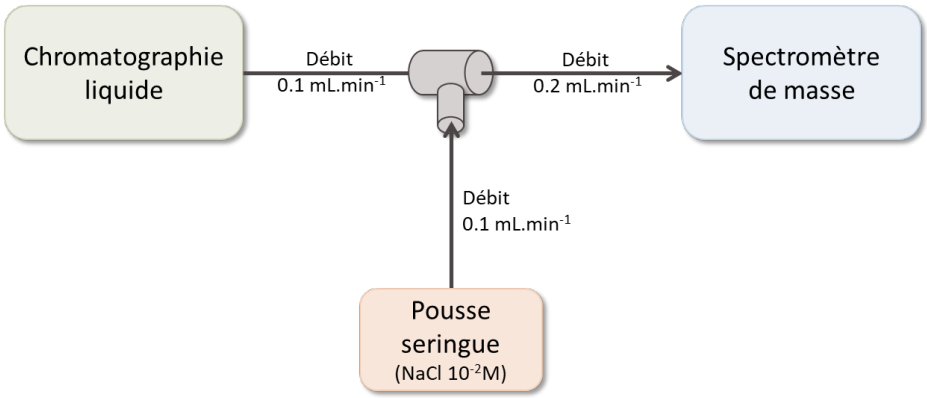


Figure 18 : Montage LC-MS permettant l'ajout de NaCl en amont de la source du spectromètre de masse

Une fois le montage réalisé, un mélange des peptides EL10 et EL10A (ratio molaire 1:1, dans H_2O/ACN 50/50 (v/v)) a été injecté pour combiner la méthode LC et la méthode MS/MS développées auparavant. L'ajout de sodium au pousse-seringue en amont de la source a permis d'obtenir des adduits assez intenses pour pouvoir les sélectionner et réaliser les expériences MS^2. Les courbes SY obtenues (voir **Annexe 2-6.12**) se sont révélées satisfaisantes, permettant de séparer le peptide amide du peptide acide. Le couplage avec une chromatographie liquide ne semble donc pas interférer sur la capacité de la technique des ions survivants à répondre à la problématique étudiée.

Ces résultats confirmant la possibilité de coupler la chromatographie liquide à un spectromètre de masse pour enregistrer des courbes SY informatives, les peptides ont été ajoutés artificiellement dans le venin afin de vérifier si des interactions pourraient exister entre les molécules présentes dans l'échantillon. Pour cela, une première méthode LC séparant les deux peptides a été utilisée, puis une méthode permettant la co-élution des deux biomolécules.

i. Ajout des peptides dans du venin du *Conus Textile* : peptides séparés en LC

Afin de vérifier la faisabilité de la méthode dans un mélange complexe, la méthode LC permettant la séparation des peptides amides et acides est mise en œuvre.

Les énergies nécessaires à la fragmentation complète de chaque peptide ont été déterminées en amont au pousse-seringue. Ainsi, 15 méthodes MS^2 ont été créées avec chacune un voltage différent entre deux temps donnés compris dans le temps de rétention du pic chromatographique d'intérêt. Les résultats suivants ont été obtenus :

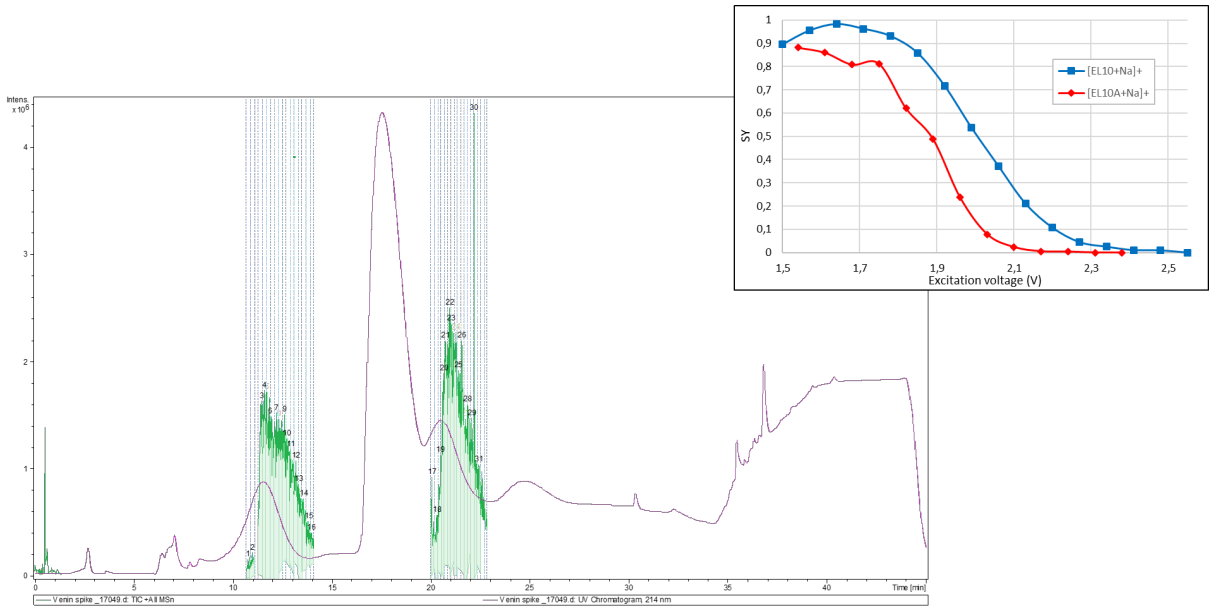


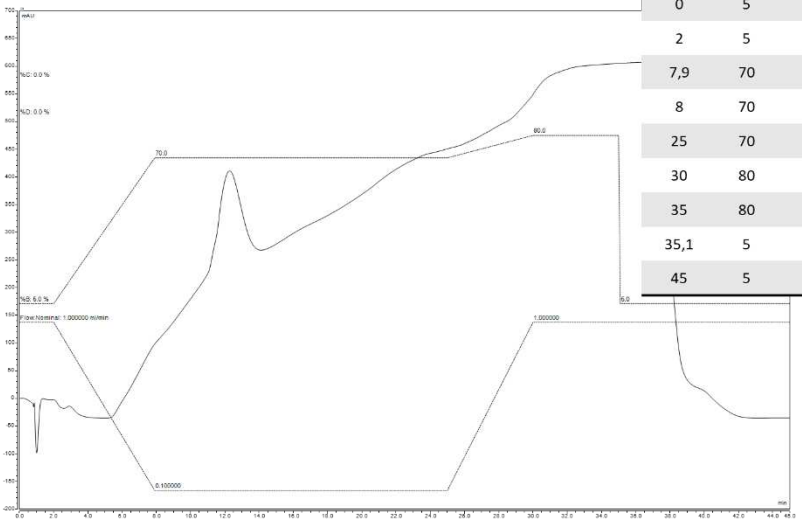
Figure 19 : Chromatogramme du venin avec ajout artificiel des peptides EL10 et EL10A, à partir de la méthode LC développée avec visualisation des acquisitions MS^2 appliquées avec les courbes SY obtenues des peptides EL10 et EL10A ajoutés artificiellement dans le venin

Même en présence d'autres composés, il reste possible de séparer les peptides amide et acide par la technique des ions survivants. On peut constater que les courbes SY ne commencent pas à SY=1. Cela peut justement s'expliquer par la présence d'autres composés sous le pic chromatographique, qui ne

sont pas issus de la dissociation du peptide mais qui sont compris dans le calcul du taux d'ions survivants. Cela peut également s'expliquer par le fait que l'acquisition des spectres MS^2 commence tandis que le peptide n'a pas encore atteint le spectromètre de masse.

ii. Ajout des peptides dans du venin Conotextile : peptides co-élués

Au vu des bons résultats obtenus à partir des peptides qui ne co-éluent pas en chromatographie liquide, une méthode LC permettant la co-élution des deux peptides est utilisée pour appliquer la méthode MS^2 développée (voir Figure 20). La colonne utilisée est une Luna Omega 1.6 µm PS C18, 100 x 2.1 mm.



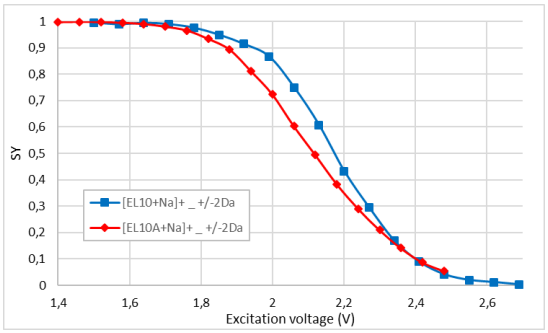
Temps (min)	% B	Débit ($mL.min^{-1}$)
0	5	1
2	5	1
7,9	70	0,1
8	70	0,1
25	70	0,1
30	80	1
35	80	1
35,1	5	1
45	5	1

Figure 20 : Chromatogramme des peptides EL10 et EL10A co-élués

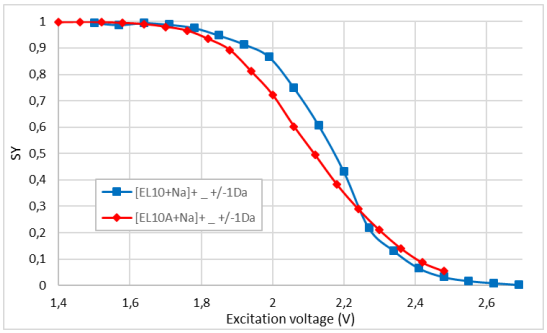
Les peptides EL10 et EL10A n'ont pas pu être fragmentés en spectrométrie de masse suite à leur co-élution en chromatographie liquide en raison d'un dysfonctionnement instrumental de cette dernière qui n'a pas pu être résolu rapidement. Il a été démontré précédemment que la chromatographie liquide n'influe pas sur les résultats obtenus en spectrométrie de masse pour l'acquisition des courbes SY. Ainsi, pour pallier le problème technique, les peptides EL10 et EL10A en mélange (ratio molaire 1:1) ont été injectés au pousse-seringue pour simuler une co-élution des peptides en chromatographie liquide (voir Figure 21).

<u>Figure 21 :</u> Courbes SY des peptides EL10 et EL10A en mélange (ratio molaire 1:1) injectés au pousse-seringue, issues de différentes méthodes de traitement de données en modifiant la fenêtre de sélection de l'ion précurseur nécessaire au calcul du taux d'ions survivants :

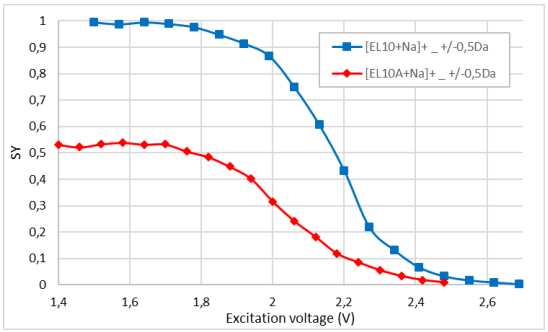
a) +/- 2 Da



b) +/- 1 Da



c) +/- 0.5 Da



A partir de la Figure 21.1a), on peut comprendre l'importance des traitements de données. En effet, les données des courbes SY des peptides en mélange sont traitées de la même manière que lorsque les peptides amide et acide sont séparés (fenêtre de sélection de l'ion précurseur de +/-2 Da pour le calcul du taux d'ions survivants), les courbes des deux peptides se superposent. Le peptide amide étant contenu dans cette fenêtre de sélection et se fragmentant à des énergies de collision plus élevées, l'intensité de cet ion sera comptée pour le calcul du taux d'ions survivants alors que le peptide acide sera complètement fragmenté. De ce fait, la courbe SY du peptide acide sera déplacée vers celle du peptide amide.

Pour contourner cette difficulté et obtenir une séparation des courbes, la fenêtre de sélection de l'ion précurseur pour calculer le taux d'ions survivants est diminuée afin d'exclure le peptide amide de la fenêtre de sélection du peptide acide, et inversement. Sur la Figure 21.b), on observe qu'une fenêtre de sélection de +/- 1 Da n'est toujours pas suffisante pour pouvoir séparer les deux courbes. Cela n'est pas étonnant puisque les deux peptides se séparent de 0.98 Da. De ce fait, la fenêtre de sélection a été réduite à +/- 0.5 Da comme on peut l'observer sur la Figure 21.c). Malgré des imperfections observées, cette sélection permet de séparer les deux courbes, et d'envisager une caractérisation spécifique du peptide amide. On peut observer en particulier que le taux SY du peptide acide ne commence pas à 1. En effet, le peptide amide qui est dorénavant considéré comme un ion fragment va diviser le taux SY grossièrement par deux puisque les deux peptides s'ionisent de façon similaire.

A ce stade des travaux menés en fin de thèse, il reste encore à déterminer d'une part la concentration limite des peptides permettant de réaliser ces courbes SY par rapport au composé de l'échantillon le plus concentré, ainsi que d'autre part la limite de détection du peptide acide par rapport au peptide amide. Il est à noter que pour pouvoir savoir si un peptide amide ou acide est présent dans l'échantillon, en plus d'expériences MS/MS menées sur les adduits sodium des peptides, une courbe référence est nécessaire pour observer un décalage ou une superposition des courbes qui permettrait d'identifier la nature de la fonction C-terminale.

7) Références

1. Menachery SPM, Laprévote O, Nguyen TP, Aravind UK, Gopinathan P, Aravindakumar CT. Identification of position isomers by energy-resolved mass spectrometry: Position isomers by ERMS. *J Mass Spectrom*. 2015;50(7):944-950. doi:10.1002/jms.3607

2. Laprévote O, Ducrot P, Thal C, Serani L, Das BC. Stereochemistry of Electrosprayed Ions. Indoloquinolizidine Derivatives. *J Mass Spectrom*. 1996;31(10):1149-1155. doi:10.1002/(SICI)1096-9888(199610)31:10<1149::AID-JMS408>3.0.CO;2-I

3. Lemaire D, Serani L, Laprévote O, Ovcharenko V, Pihlaja K, Stájer G. Energy-resolved electrospray mass spectrometry of diexo- norbornane and norbornene derivatives containing a fused, phenyl-substituted, 1,3-oxazine ring: competitive retro-Diels–Alder fragmentation processes. *Eur J Mass Spectrom*. 1999;5(1):253. doi:10.1255/ejms.281

4. Harrison AG. Energy-resolved mass spectrometry: a comparison of quadrupole cell and cone-voltage collision-induced dissociation. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13(16):1663-70. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19990830)13:16<1663::AID-RCM695>3.0.CO;2-T.

5. Douglas DJ. Mechanism of the collision-induced dissociation of polyatomic ions studied by triple quadrupole mass spectrometry. *The Journal of Physical Chemistry.*1982;86(2):185-191. doi: 10.1021/j100391a011.

6. Dawson PH. A study of the collision-induced dissociation of $C_2H_5OH_2^+$ using various target gases. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics.* 1983;50(3):287-297. doi: 10.1016/0020-7381(83)87006-5.

7. Nacson S, Harrison AG. Energy transfer in collisional activation. Energy dependence of the fragmentation of n-alkylbenzene molecular ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* 1985;63(2-3):325-337. doi: 10.1016/0168-1176(85)80034-3.

8. Zwinselman JJ, Nacson S, Harrison AG. A comparison of charge-exchange, energy-resolved and angle-resolved mass spectrometric methods for studying the energy dependence of ionic fragmentation reactions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* 1985;67(1):93-108. doi: 10.1016/0168-1176(85)83040-8.

9. Fetterolf DD, Yost RA. Energy-resolved collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics.* 1982;44(1-2):37-50. doi: 10.1016/0020-7381(82)80037-5.

10. Menicatti M, Guandalini L, Dei S, et al. Energy Resolved Tandem Mass Spectrometry Experiments for Resolution of Isobaric Compounds: A Case of *Cis* / *Trans* Isomerism. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*. 2016;22(5):235-243. doi:10.1255/ejms.1446.

11. Crotti S, Menicatti M, Pallecchi M, Bartolucci G. Tandem mass spectrometry approaches for recognition of isomeric compounds mixtures. *Mass Spectrometry Reviews*. 2021;e21757. doi:10.1002/mas.21757.

12. Fitzgerald CCJ, Bowen C, Elbourne M, Cawley A, McLeod MD. Energy-Resolved Fragmentation Aiding the Structure Elucidation of Steroid Biomarkers. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2022;33(7):1276-1281. doi: 10.1021/jasms.2c00092.

13. Suzuki K, Daikoku S, Ako T, Shioiri Y, Kurimoto A, Ohtake A, Sarkar SK, Kanie O. High-Yielding and Controlled Dissociation of Glycosides Producing B- and C-Ion Species under Collision-Induced Dissociation MS/MS Conditions and Use in Structural Determination. *Anal Chem.* 2007;79(23):9022-9029. doi: 10.1021/ac701686n.

14. Murakami T, Iwamuro Y, Ishimaru R, et al. Energy-resolved mass spectrometry for differentiation of the fluorine substitution position on the phenyl ring of fluoromethcathinones. *J Mass Spectrom*. 2019;54(3):205-212. doi:10.1002/jms.4316

15. Daikoku S, Widmalm G, Kanie O. Analysis of a series of isomeric oligosaccharides by energy-resolved mass spectrometry: a challenge on homobranched trisaccharides: Analysis of structural isomers of branched trisaccharides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009;23(23):3713-3719. doi:10.1002/rcm.4303

16. Kurimoto A, Daikoku S, Mutsuga S, Kanie O. Analysis of Energy-Resolved Mass Spectra at MS^n in a Pursuit To Characterize Structural Isomers of Oligosaccharides. *Anal Chem*. 2006;78(10):3461-3466. doi:10.1021/ac0601361

17. Daikoku S, Pendrill R, Kanie Y, Ito Y, Widmalm G, Kanie O. Synthesis and structural investigation of a series of mannose-containing oligosaccharides using mass spectrometry. *Org Biomol Chem*. 2018;16(2):228-238. doi:10.1039/C7OB02723K

18. Hoffmann W, Hofmann J, Pagel K. Energy-Resolved Ion Mobility-Mass Spectrometry—A Concept to Improve the Separation of Isomeric Carbohydrates. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2014;25(3):471-479. doi:10.1007/s13361-013-0780-0

19. Crittenden CM, Akin LD, Morrison LJ, Trent MS, Brodbelt JS. Characterization of Lipid A Variants by Energy-Resolved Mass Spectrometry: Impact of Acyl Chains. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017;28(6):1118-1126. doi:10.1007/s13361-016-1542-6

20. Menicatti M, Guandalini L, Dei S, et al. The power of energy-resolved tandem mass spectrometry experiments for resolution of isomers: the case of drug plasma stability investigation of multidrug resistance inhibitors: Liquid chromatography/energy-resolved MS/MS for resolution of isomers. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2016;30(3):423-432. doi:10.1002/rcm.7453

21. Memboeuf A, Jullien L, Lartia R, Brasme B, Gimbert Y. Tandem Mass Spectrometric Analysis of a Mixture of Isobars Using the Survival Yield Technique. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011;22(10):s13361-011-0195-0198. doi:10.1007/s13361-011-0195-8

22. Derwa F, de Pauw E, Natalis P. New basis for a method for the estimation fo seconary ion internal energy distribution in 'soft' ionization techniques. *Org Mass Spectrom*. 1991;26(2):117-118. doi:10.1002/oms.1210260215

23. Collette C, Drahos L, Pauw ED, Vékey K. Comparison of the internal energy distributions of ions produced by different electrospray sources. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1998;12(22):1673-1678. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19981130)12:22<1673::AID-RCM385>3.0.CO;2-A

24. Collette C, De Pauw E. Calibration of the internal energy distribution of ions produced by electrospray. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1998;12(4):165-170. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19980227)12:4<165::AID-RCM140>3.0.CO;2-1

25. Renner D, Spiteller G. Linked scan investigation of peptide degradation initiated by liquid secondary ion mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*. 1988;15(2):75-77. doi:10.1002/bms.1200150204

26. Kim HI, Beauchamp JL. Identifying the Presence of a Disulfide Linkage in Peptides by the Selective Elimination of Hydrogen Disulfide from Collisionally Activated Alkali and Alkaline Earth Metal Complexes. *J Am Chem Soc*. 2008;130(4):1245-1257. doi:10.1021/ja075698w

27. Bhatia S, Kil YJ, Ueberheide B, et al. Constrained De Novo Sequencing of Conotoxins. *J Proteome Res*. 2012;11(8):4191-4200. doi:10.1021/pr300312h

28. Tayo LL, Lu B, Cruz LJ, Yates JR. Proteomic Analysis Provides Insights on Venom Processing in *Conus textile*. *J Proteome Res*. 2010;9(5):2292-2301. doi:10.1021/pr901032r

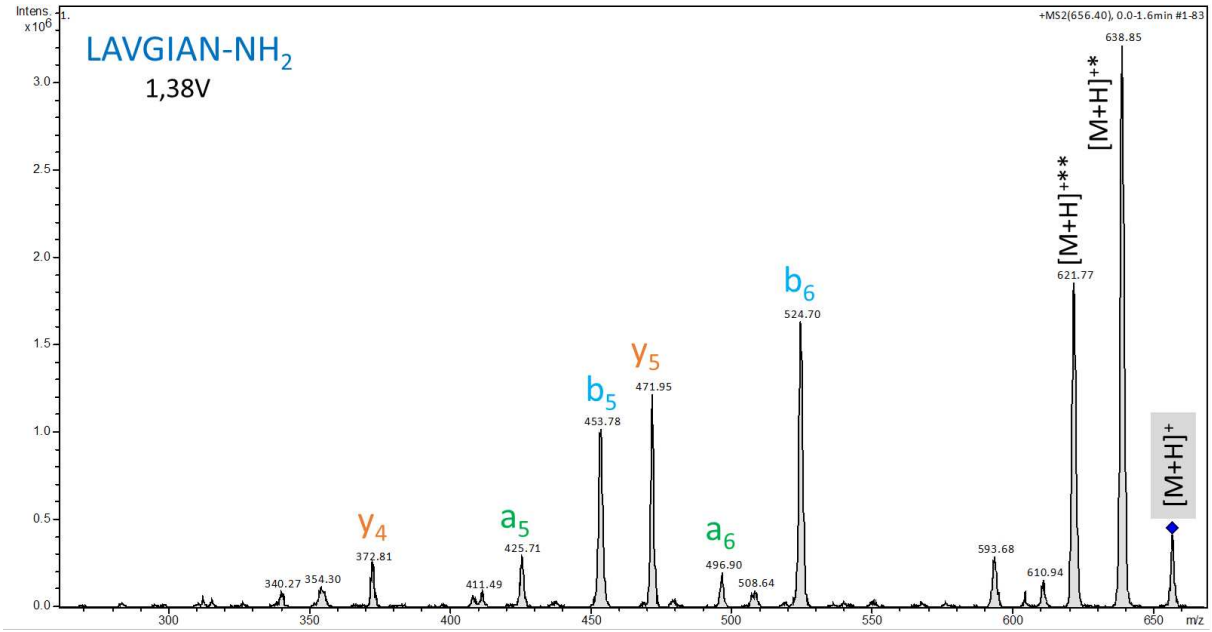
29. Vianna Braga MC, Konno K, Portaro FCV, et al. Mass spectrometric and high performance liquid chromatography profiling of the venom of the Brazilian vermivorous mollusk Conus regius: feeding behavior and identification of one novel conotoxin. *Toxicon*. 2005;45(1):113-122. doi:10.1016/j.toxicon.2004.09.018

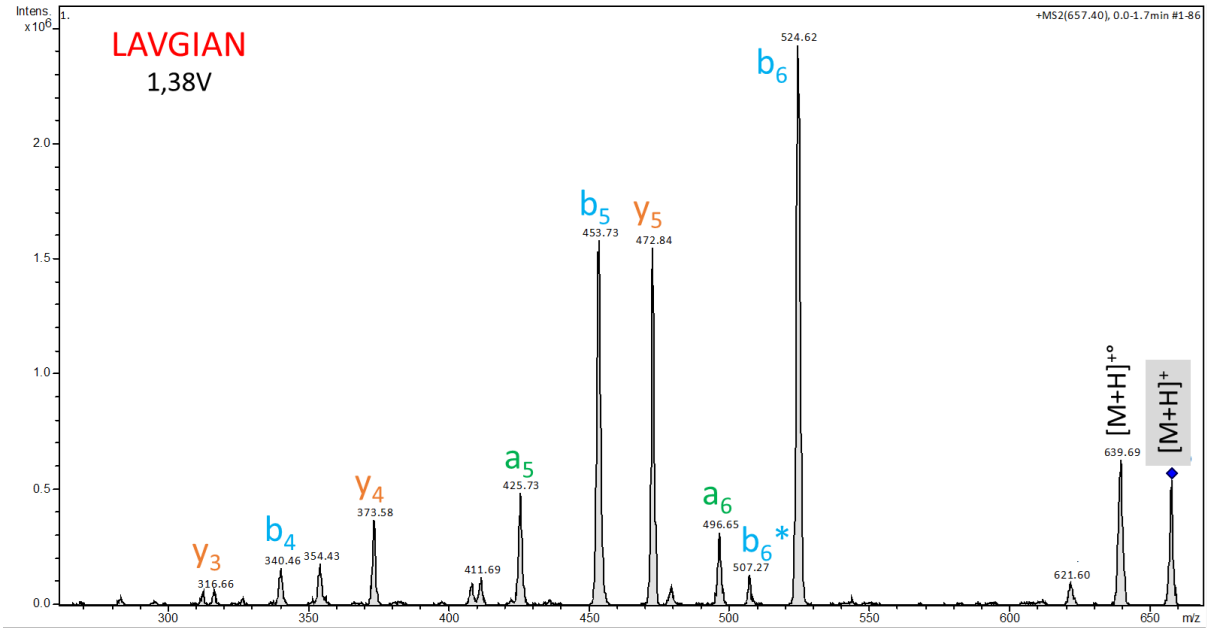
30. Zhang H, Fu Y, Wang L, Liang A, Chen S, Xu A. Identifying novel conopepetides from the venom ducts of Conus litteratus through integrating transcriptomics and proteomics. *Journal of Proteomics*. 2019;192:346-357. doi:10.1016/j.jprot.2018.09.015

8) Annexes

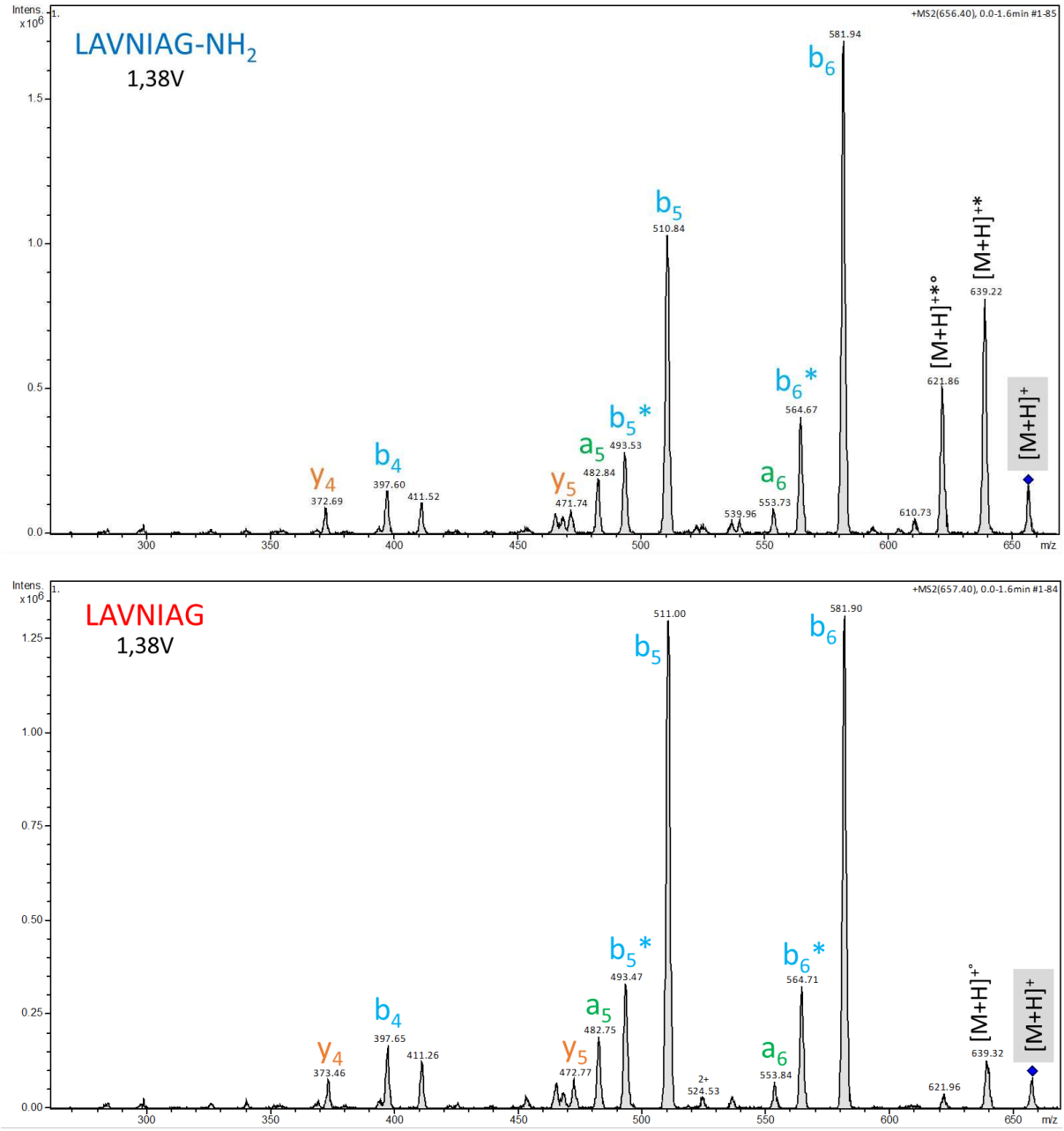
Annexe 2-3.1 : Comparaison de spectres MS/MS issus de peptides amides et acides protonés contenant un résidu amide en position C-terminale ou en milieu de séquence

Résidu N en position C-terminale

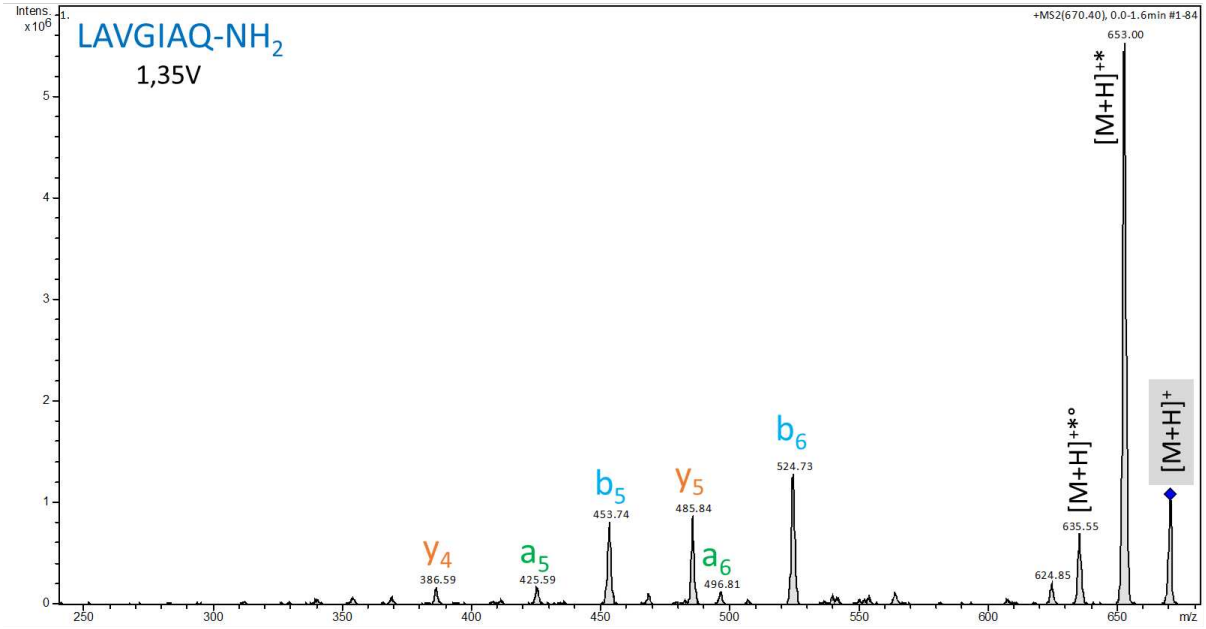


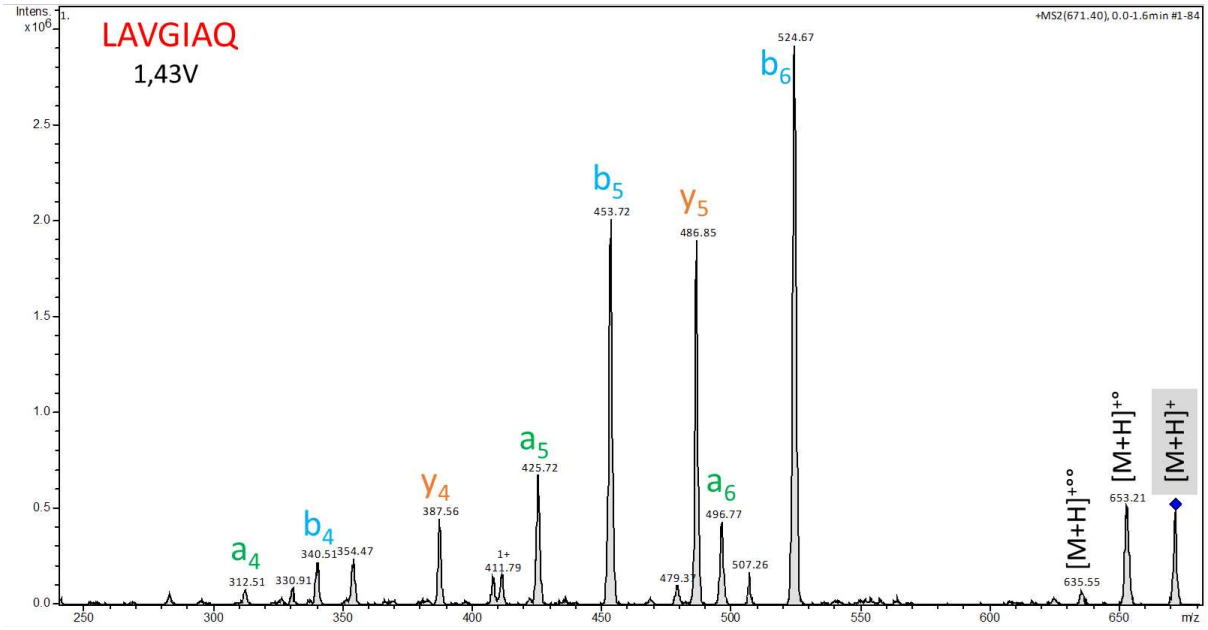


Résidu N en milieu de séquence

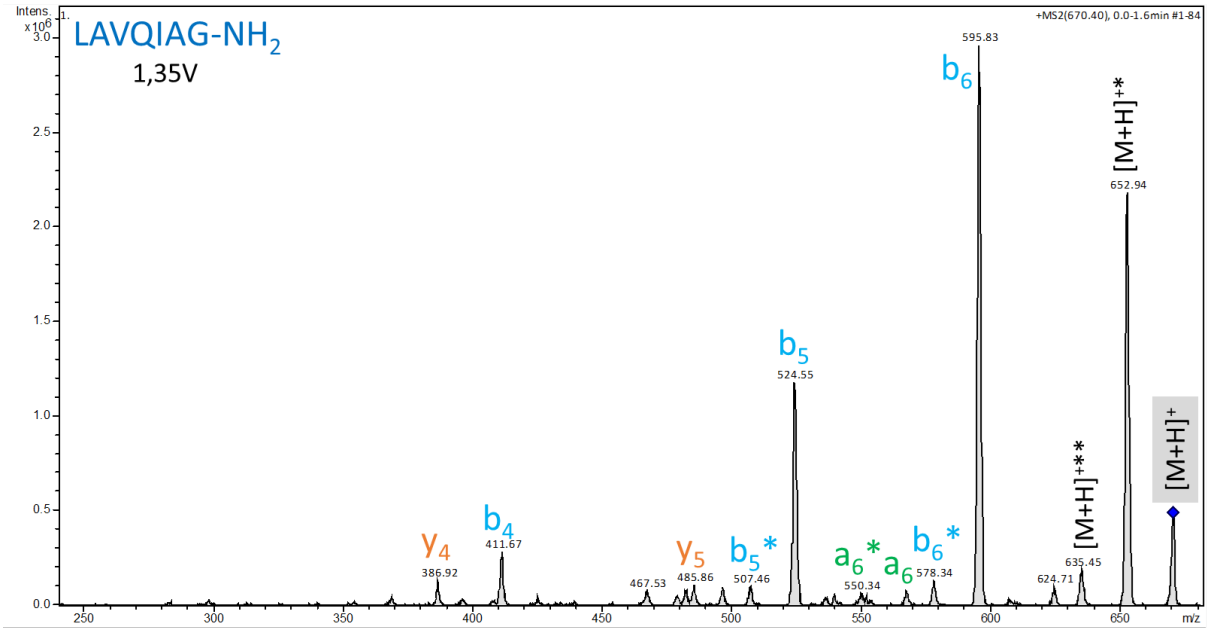


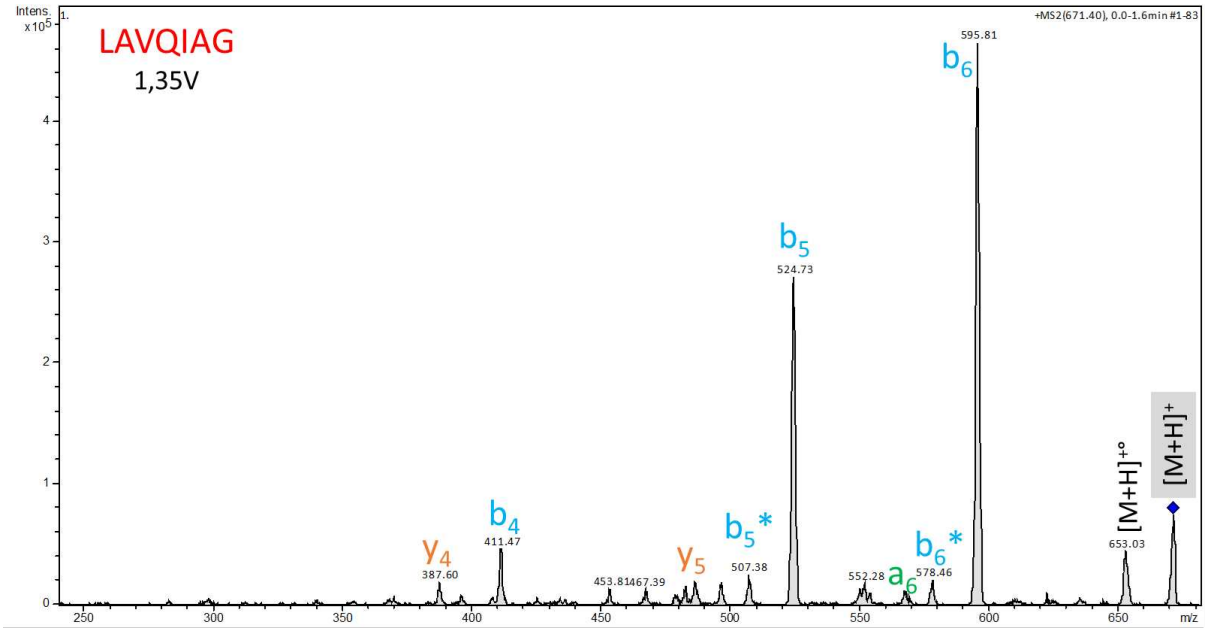
Résidu Q en position C-terminale





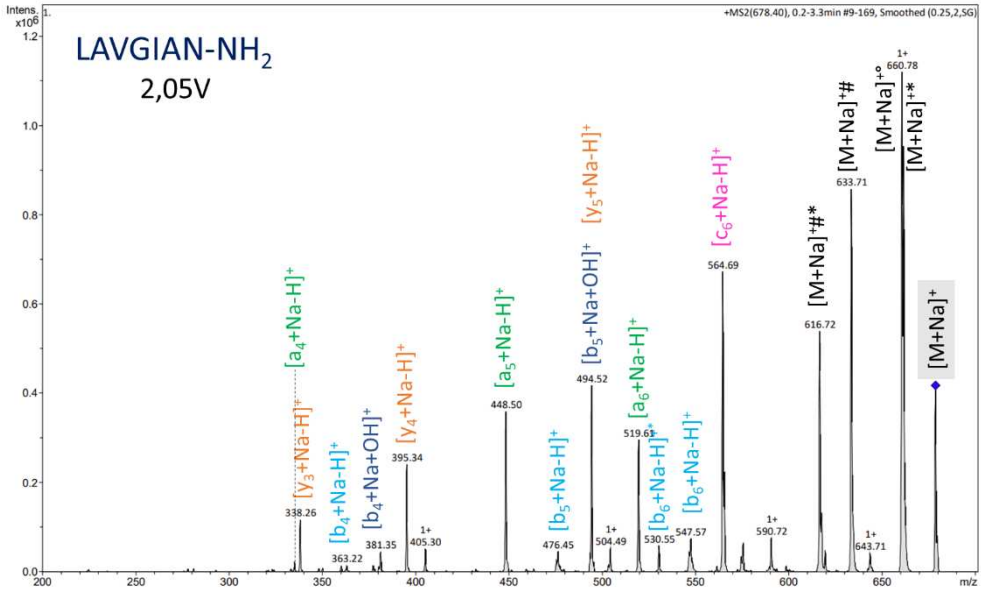
Résidu Q en milieu de séquence

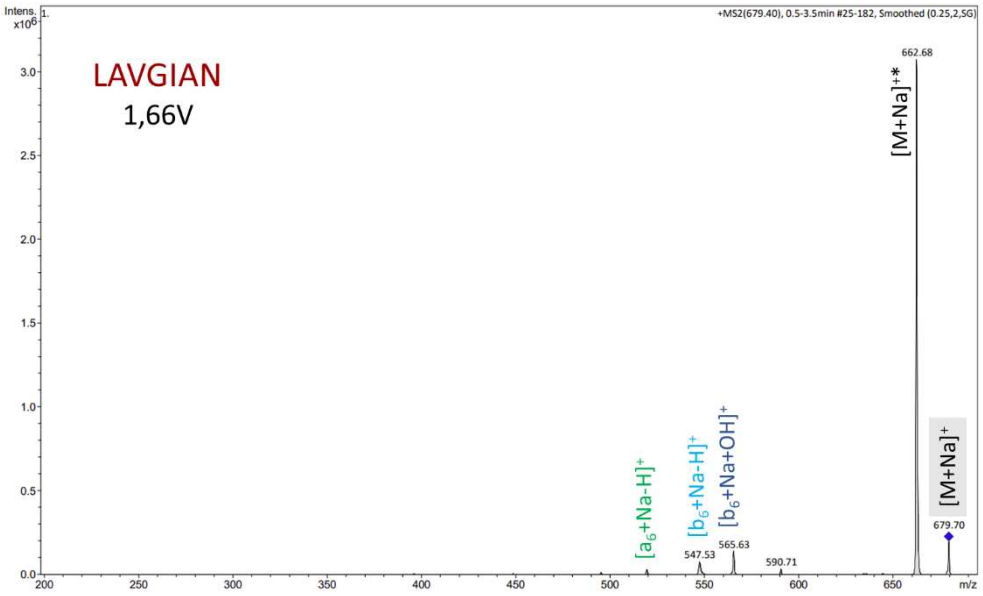




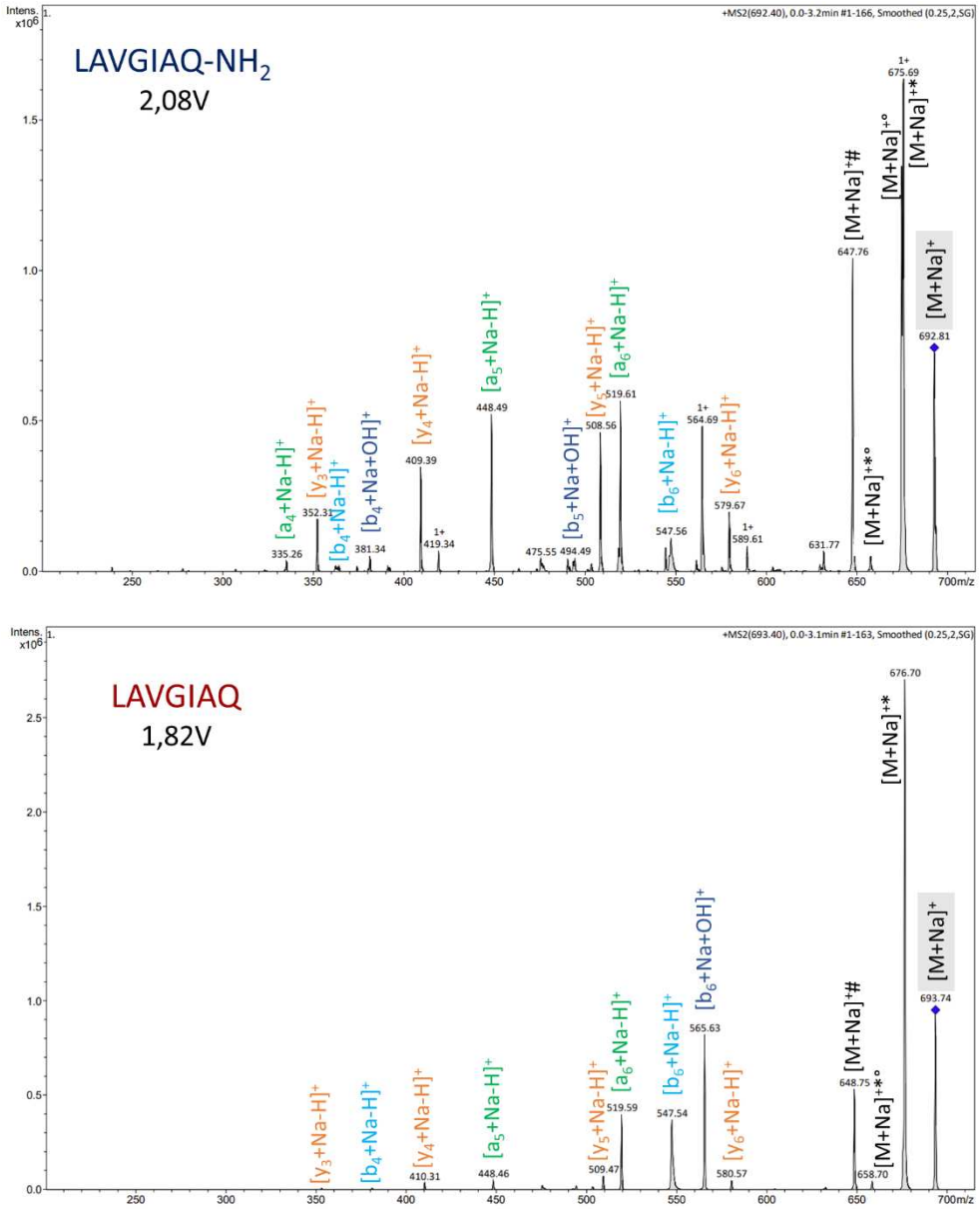
Annexe 2-3.2 : Spectres MS/MS issus de peptides amides et acides sodés contenant un résidu amide en position C-terminale

Résidu N en position C-terminale



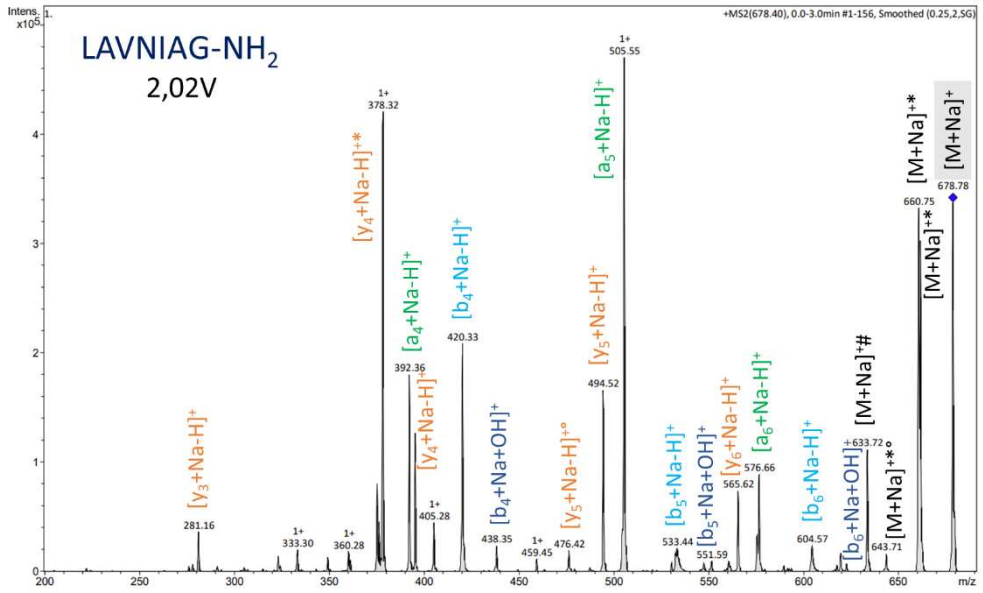


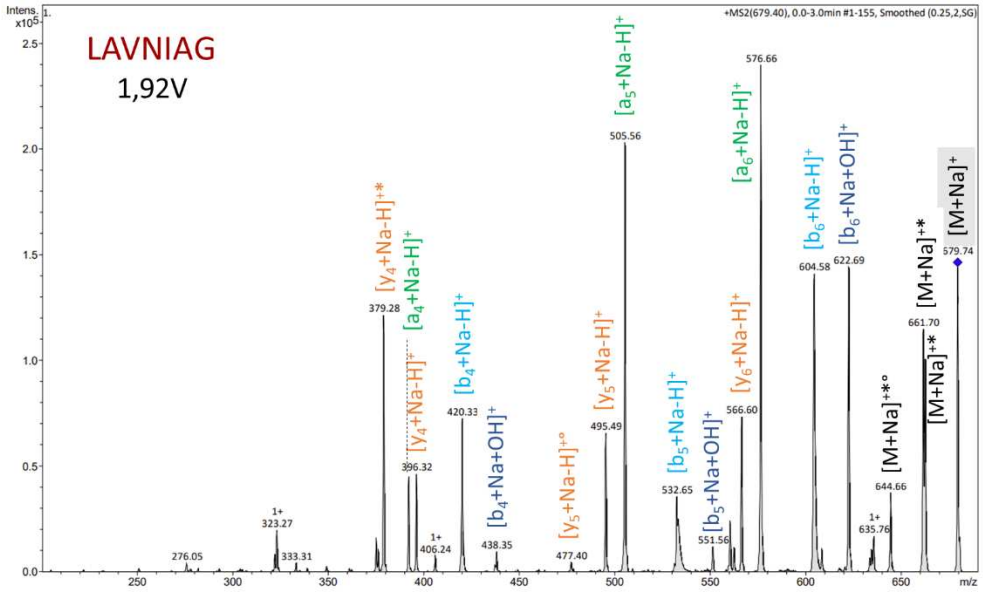
Résidu Q en position C-terminale



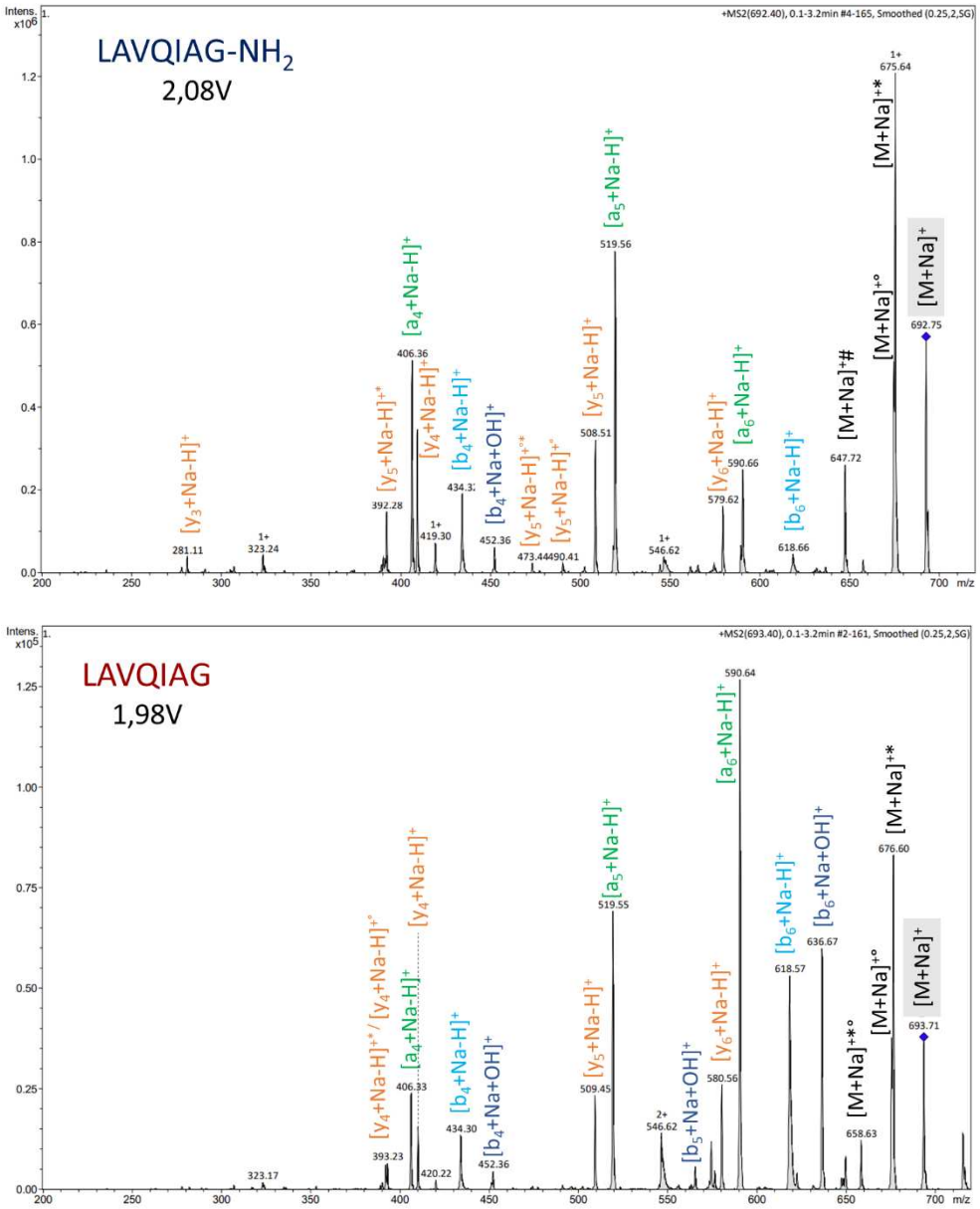
Annexe 2-3.3 : Spectres MS/MS issus de peptides amides et acides sodés contenant un résidu amide en milieu de séquence

Résidu N en milieu de séquence



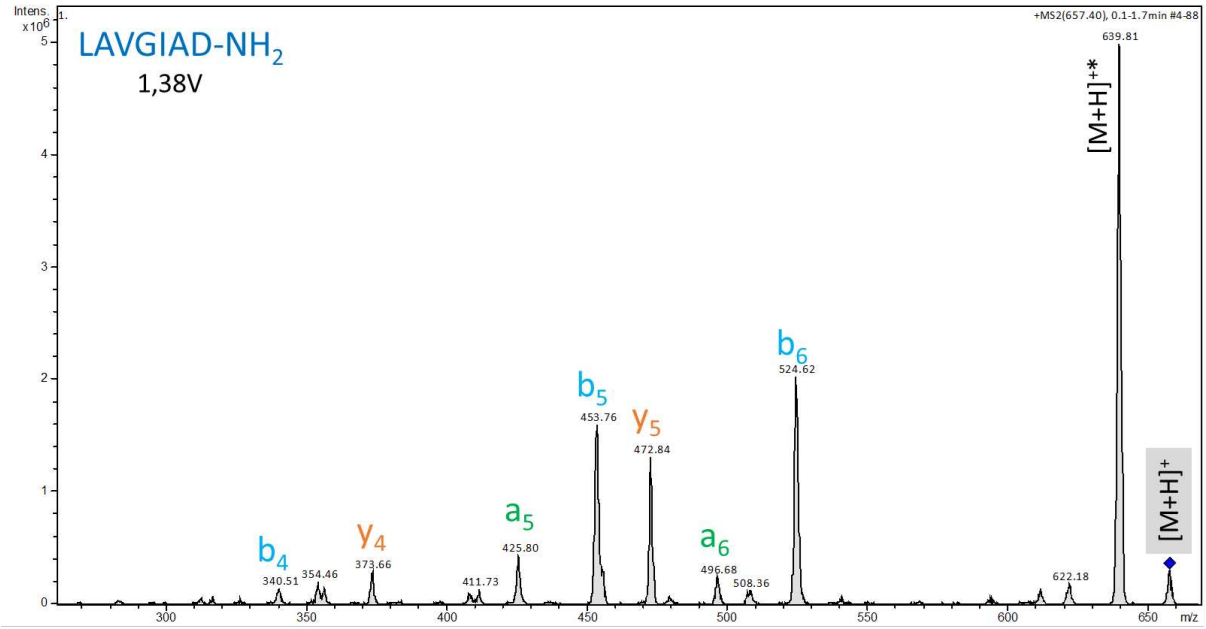


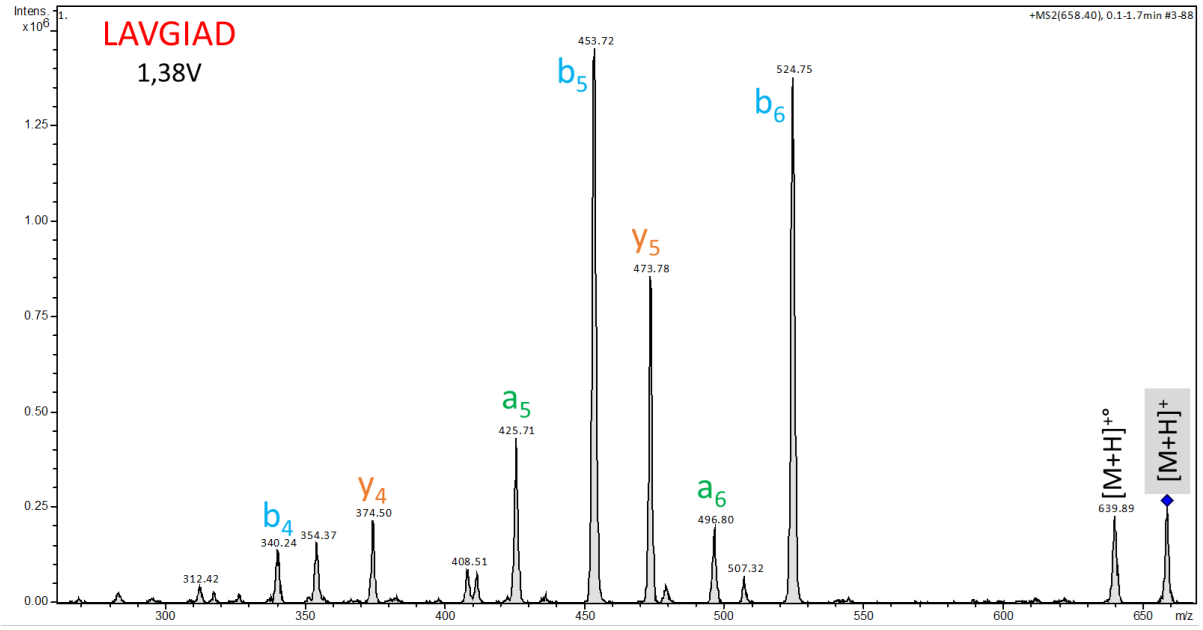
Résidu Q en milieu de séquence



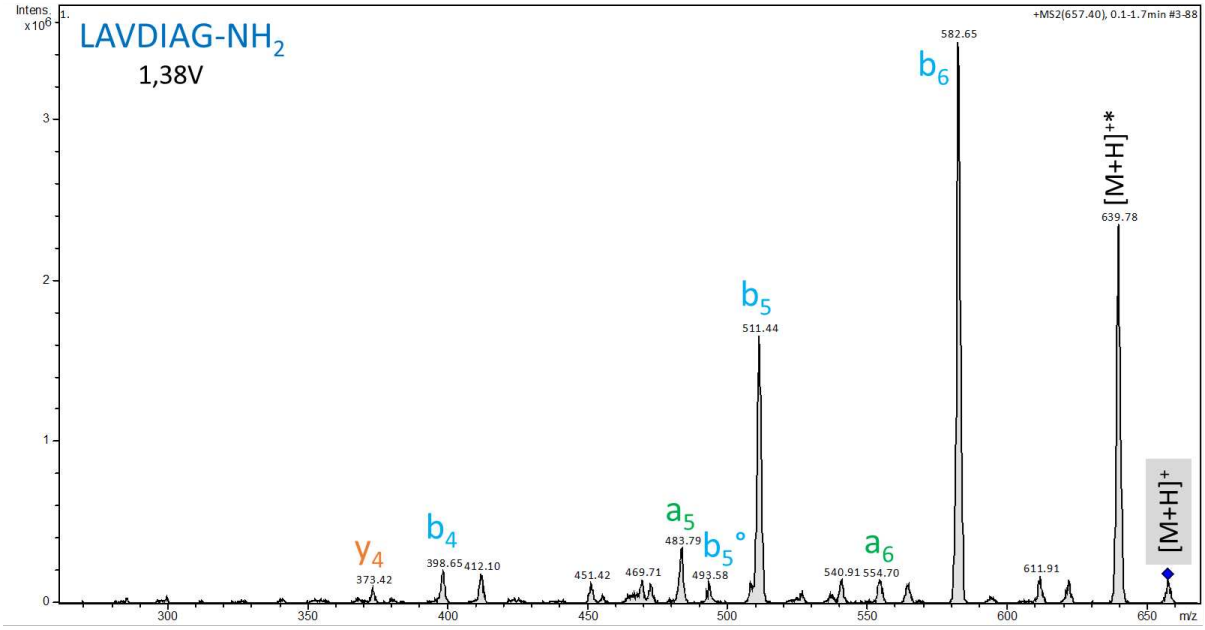
Annexe 2-3.4 : Comparaison de spectres MS/MS issus de peptides amides et acides protonés contenant un résidu acide en position C-terminale ou en milieu de séquence

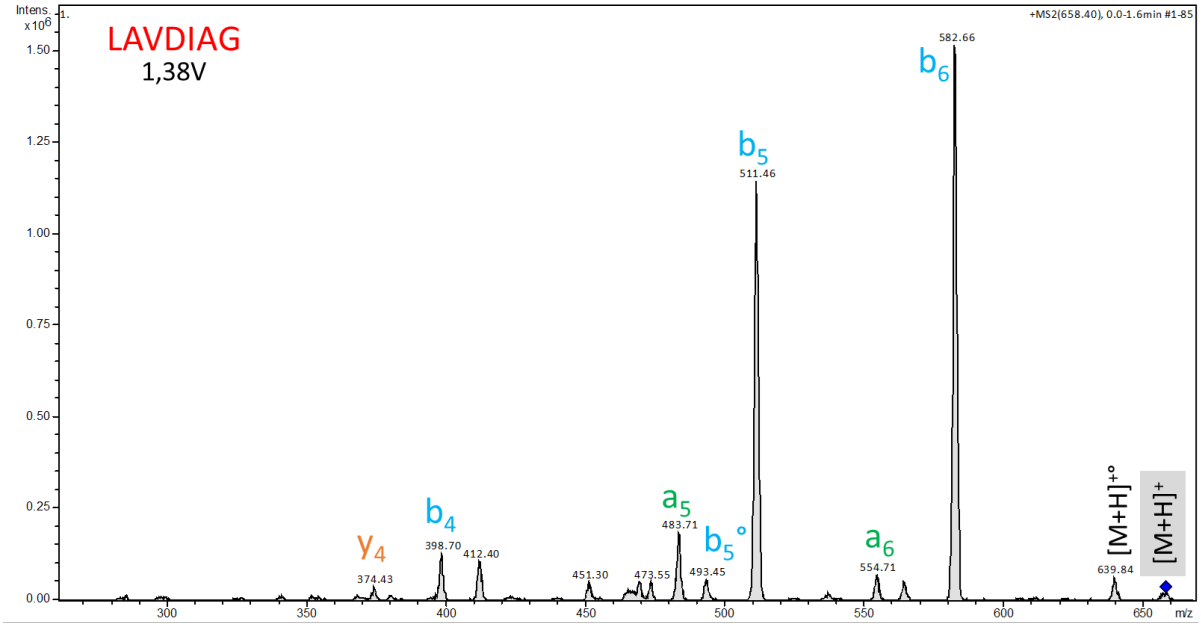
Résidu D en position C-terminale



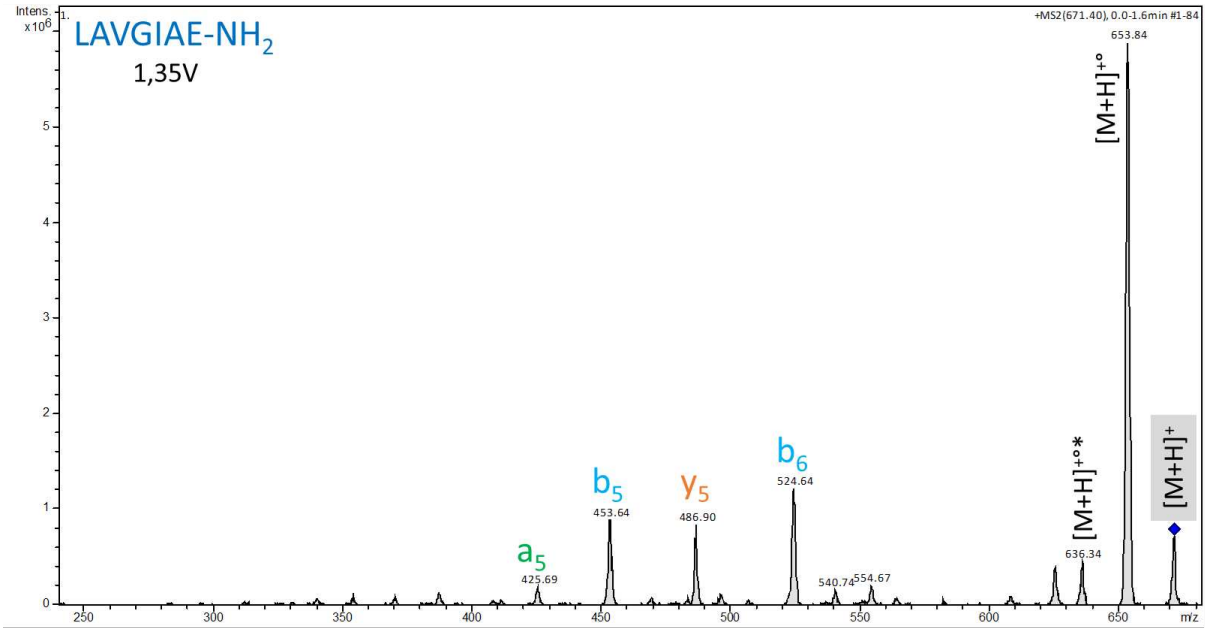


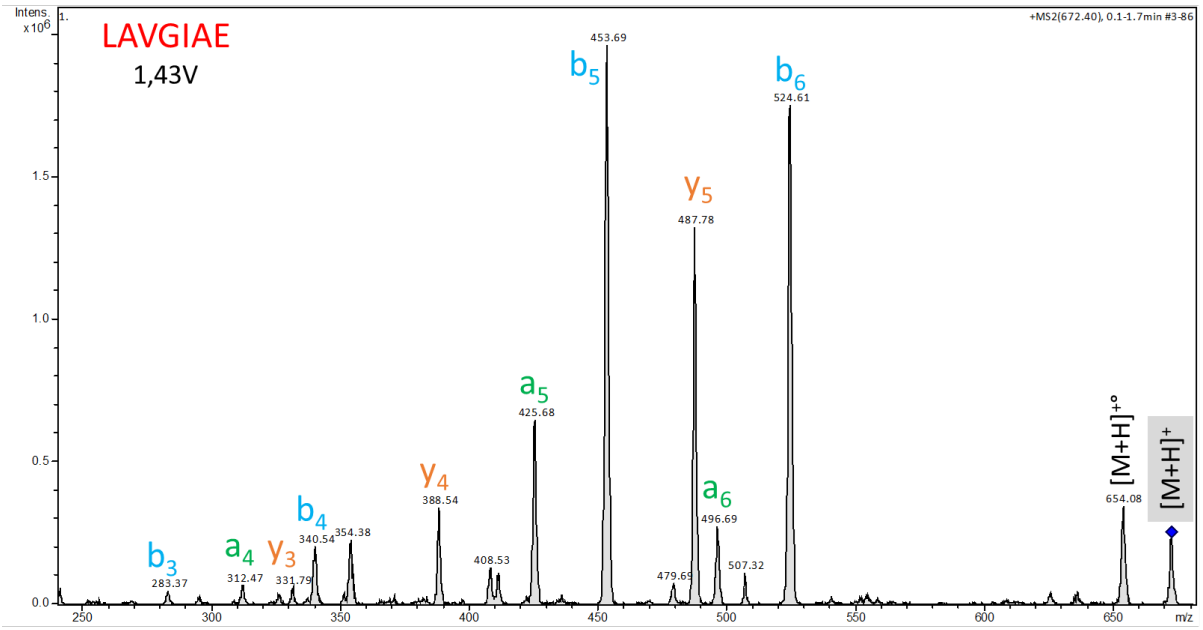
Résidu D en milieu de séquence



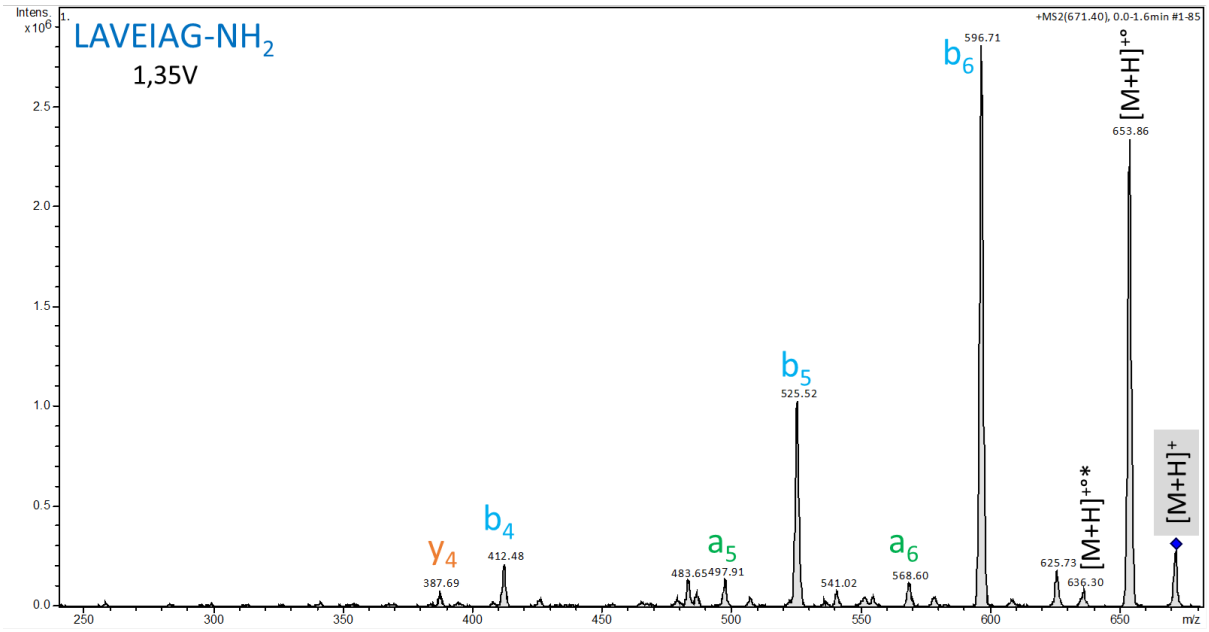


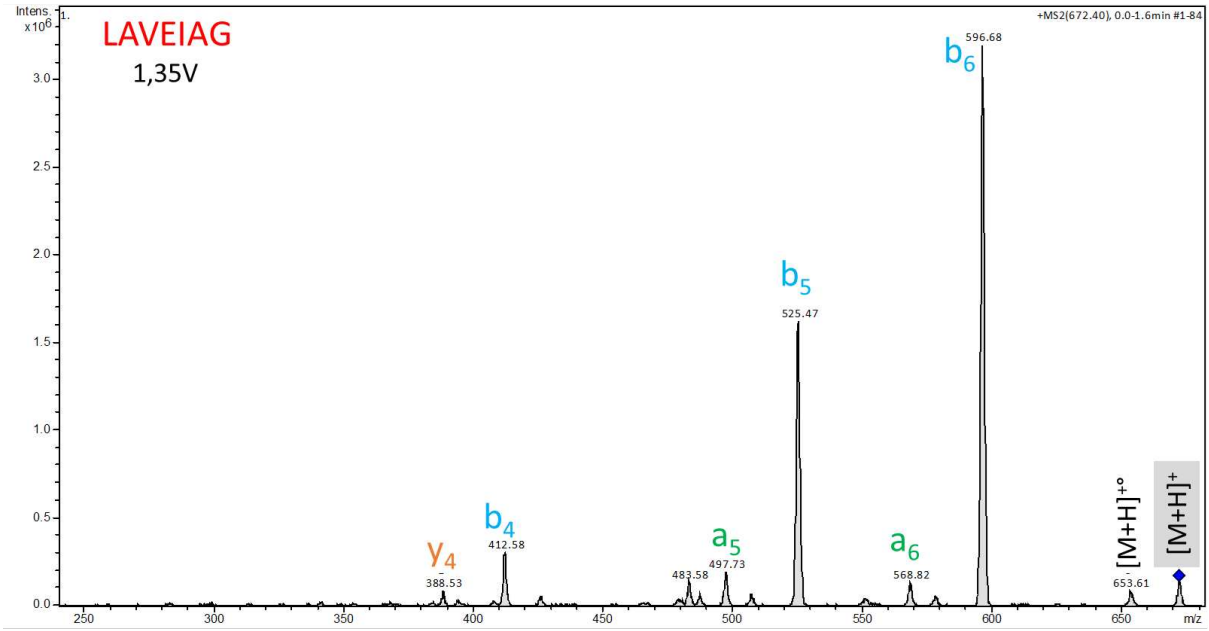
Résidu E en position C-terminale





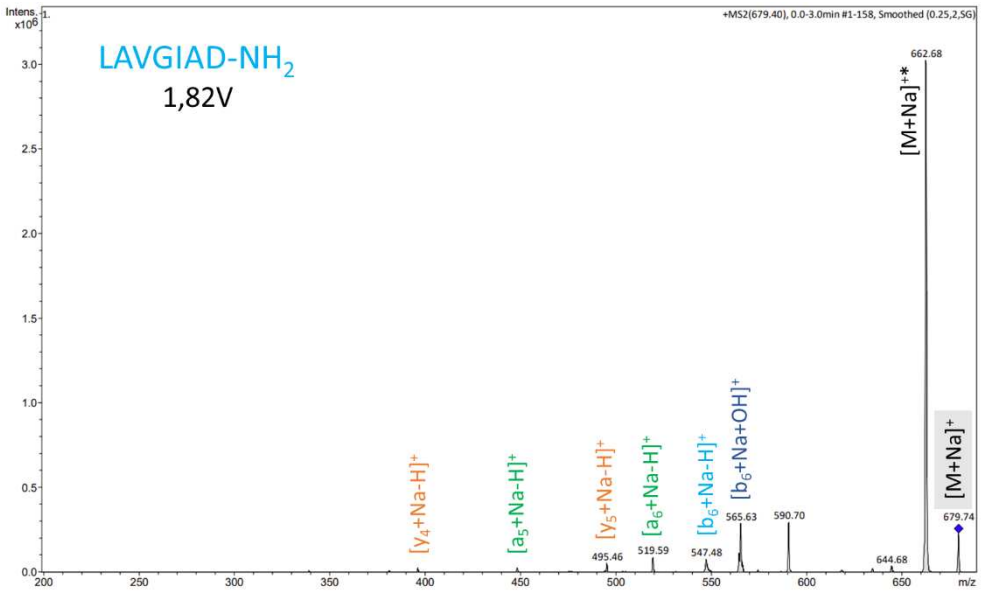
Résidu E en milieu de séquence

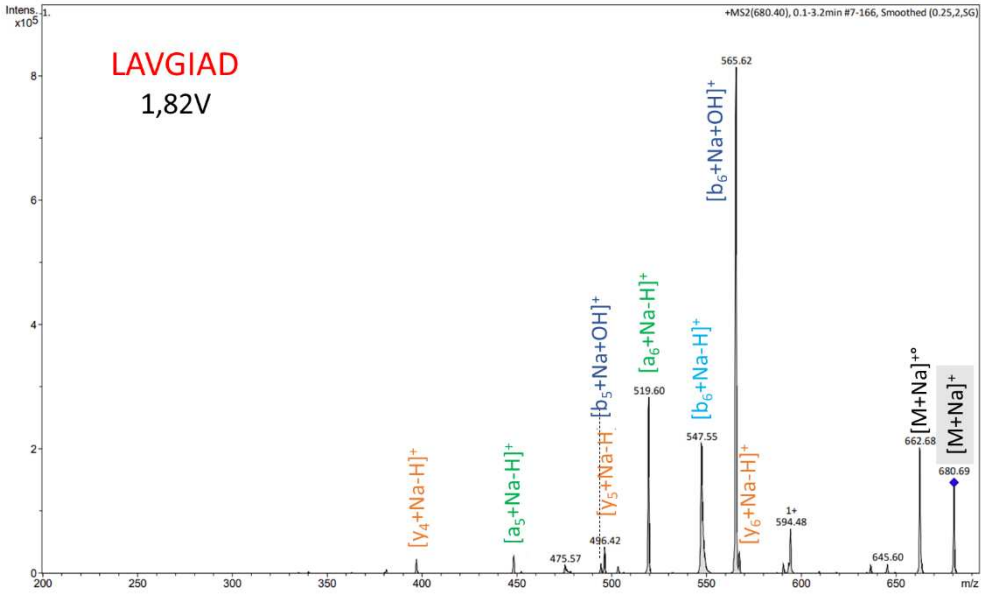




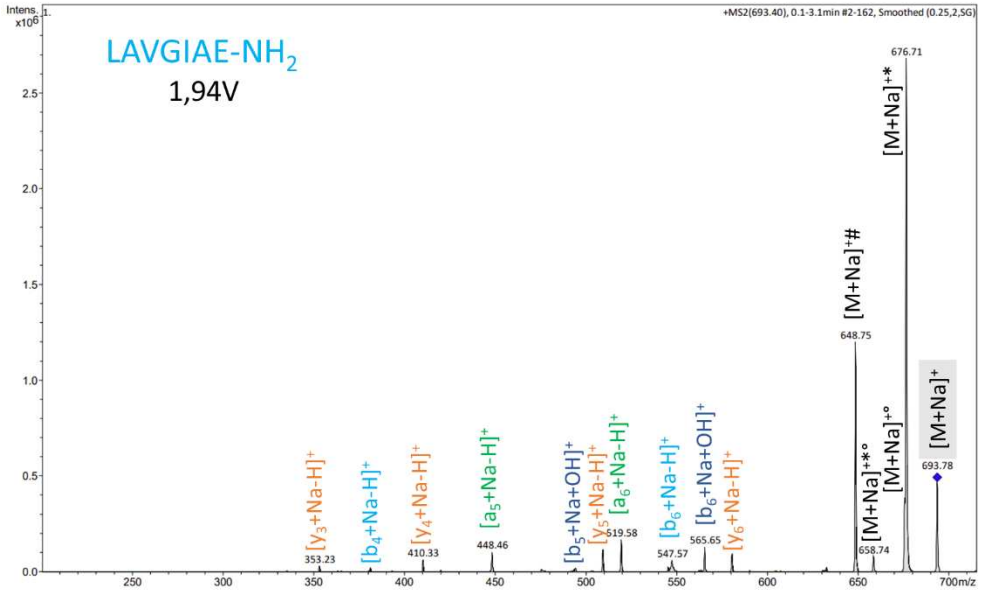
Annexe 2-3.5 : Spectres MS/MS issus de peptides amides et acides sodés contenant un résidu acide en position C-terminale

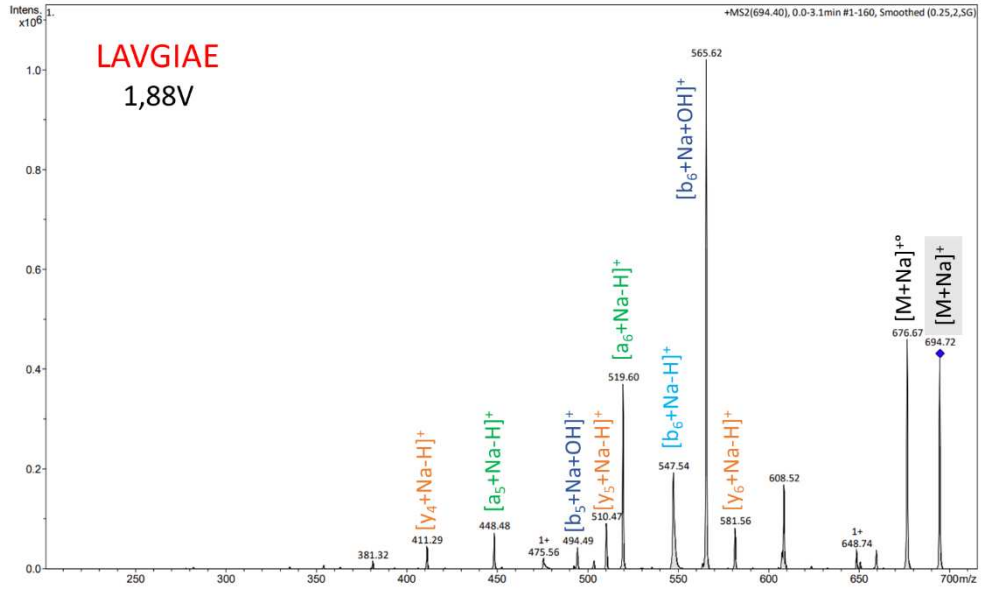
Résidu D en position C-terminale





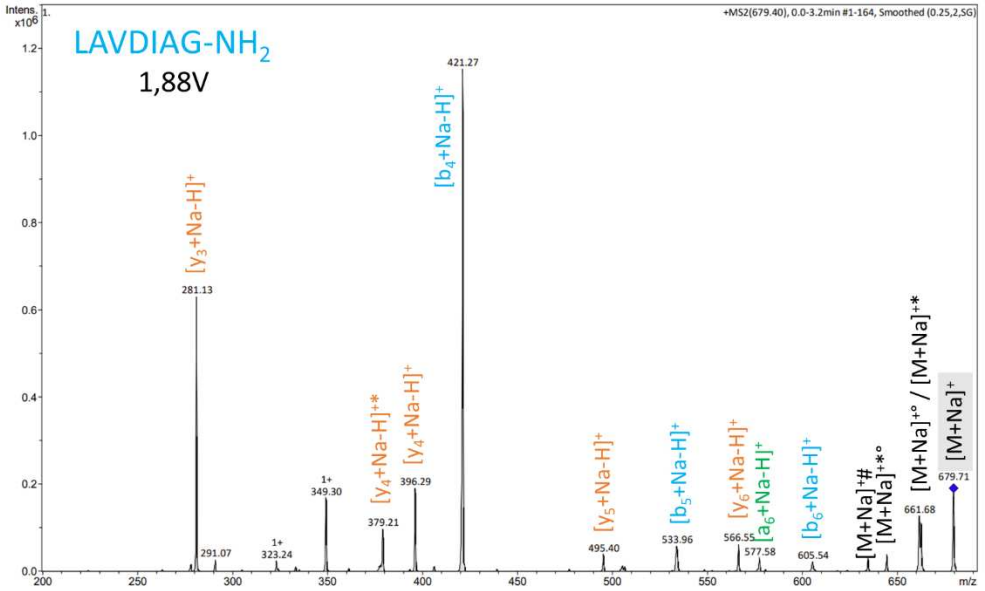
Résidu E en position C-terminale

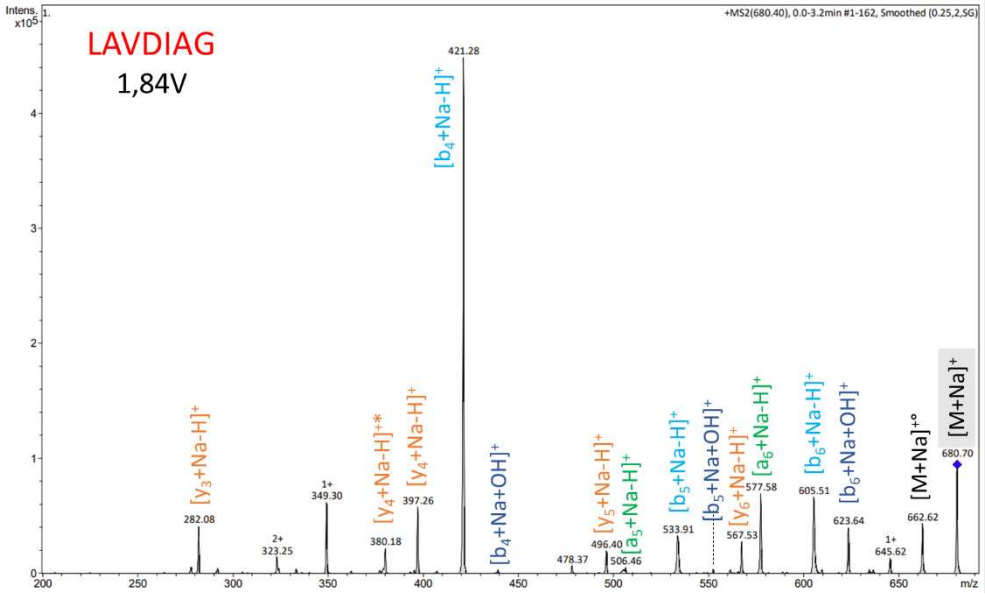




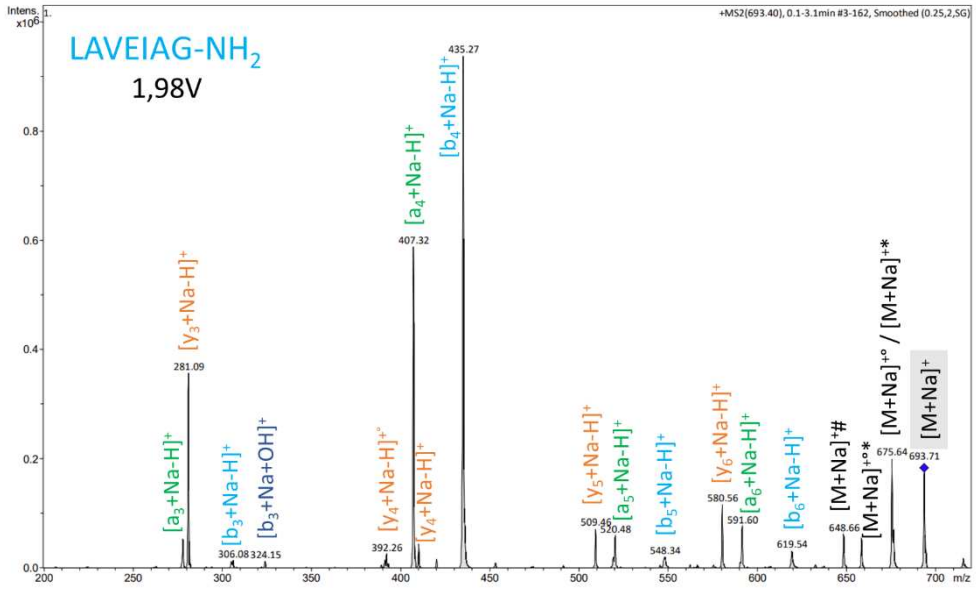
Annexe 2-3.6 : Spectres MS/MS issus de peptides amides et acides sodés contenant un résidu acide en milieu de séquence

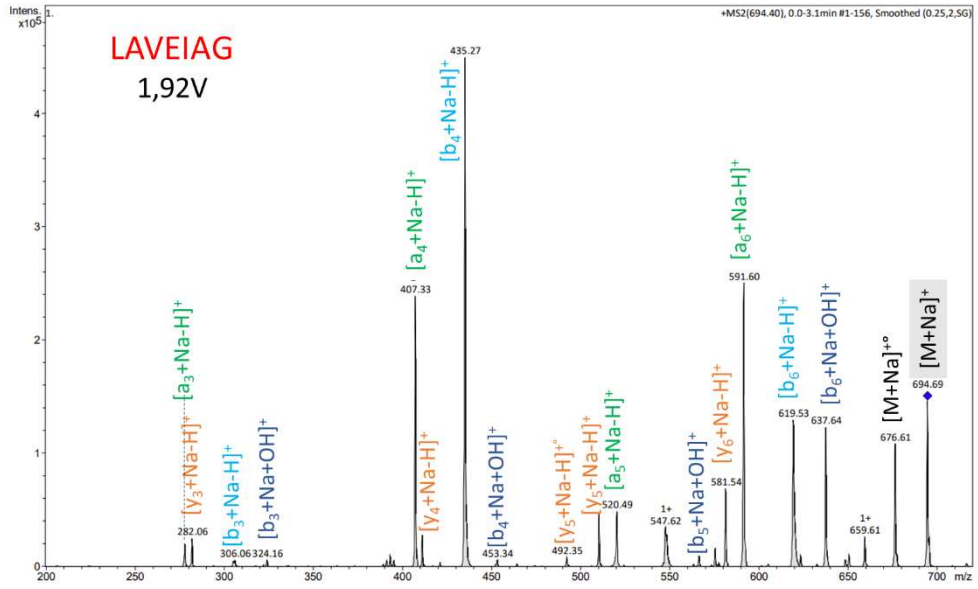
Résidu D en milieu de séquence



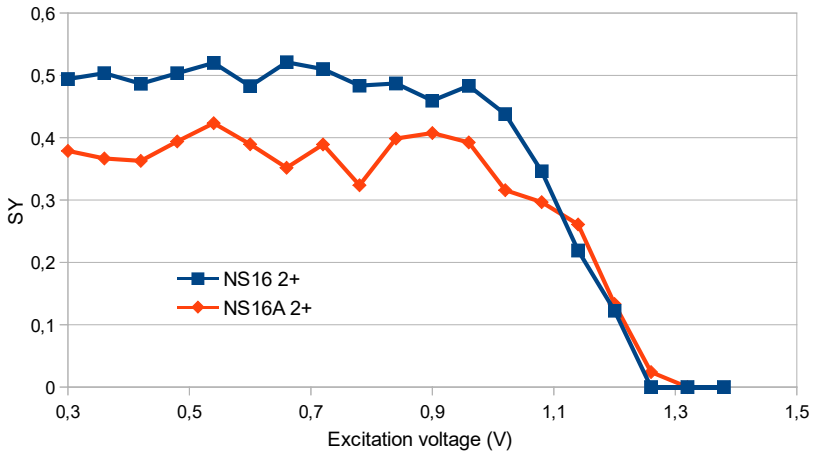


Résidu E en milieu de séquence

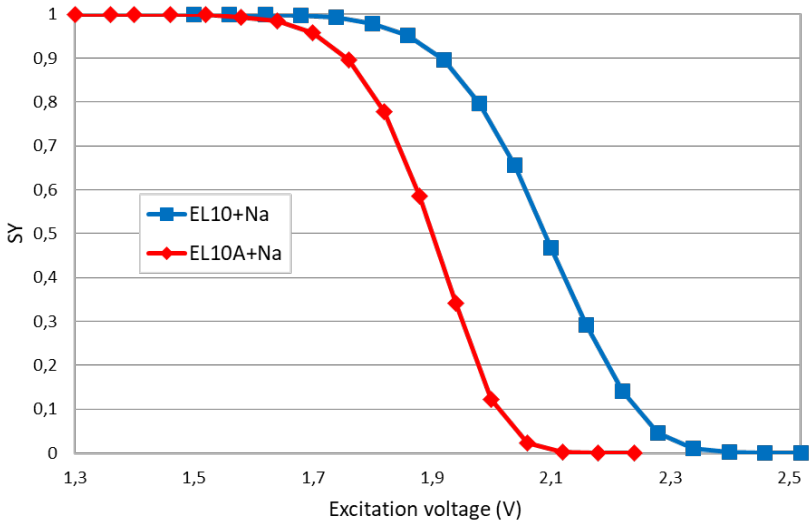




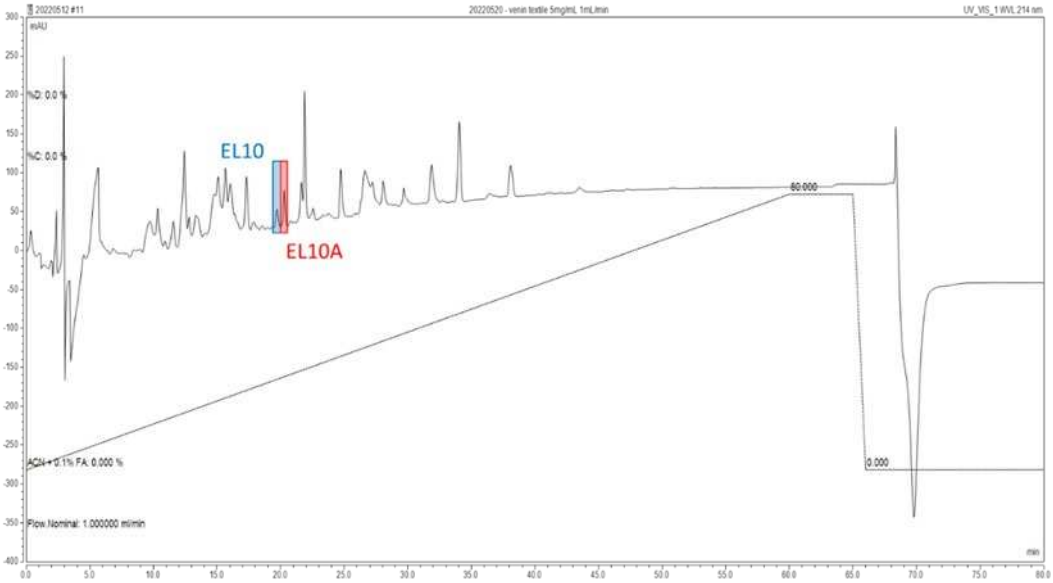
Annexe 2-4.1 : Courbes SY de peptides dichargés – Taux d'ions survivants calculés avec le bruit de fond (seuil de détection d'ions fixé à 5000)



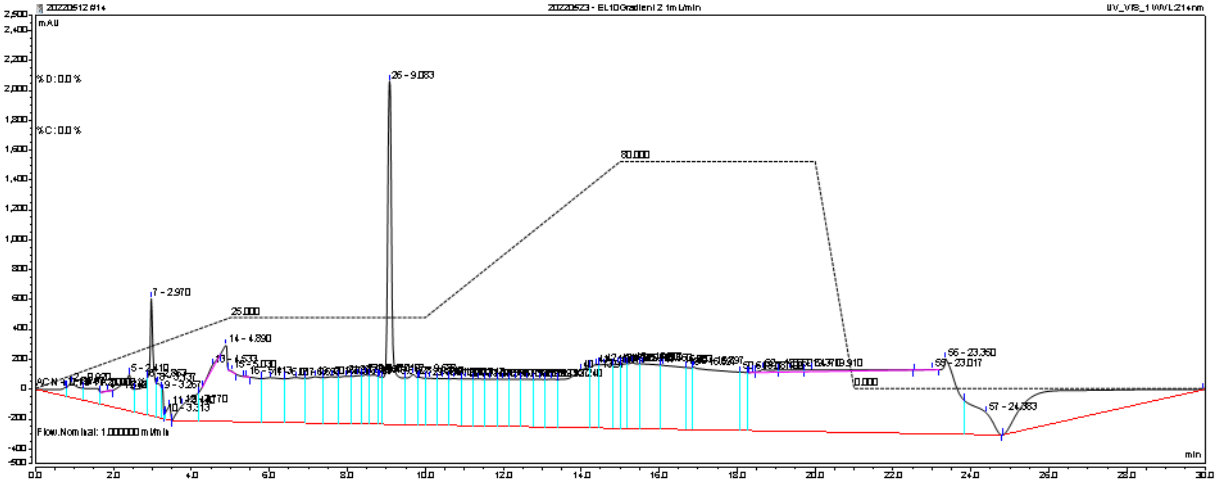
Annexe 2-6.1 : Courbes SY des peptides EL10 / EL10A, cationisés par un ion sodium, obtenues par injection directe au pousse-seringue



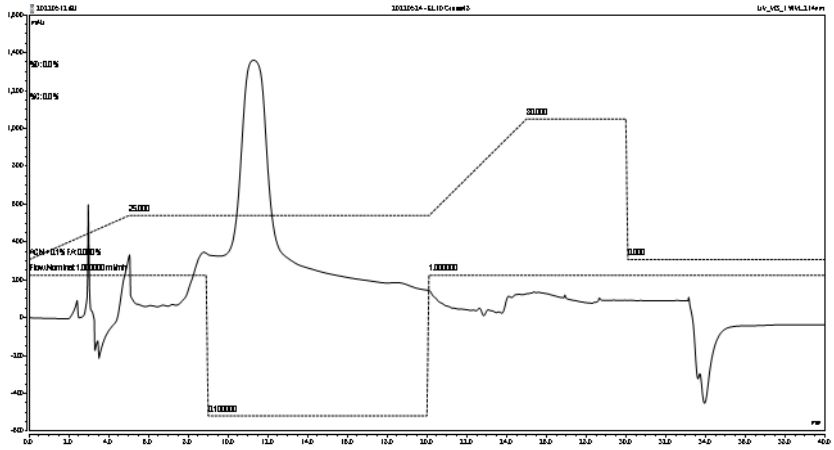
Annexe 2-6.2 : Chromatogramme du venin Conus Textile (5 mg.mL^{-1}) avec ajout artificiel des peptides EL10 et EL10A à 5.10^{-5}M



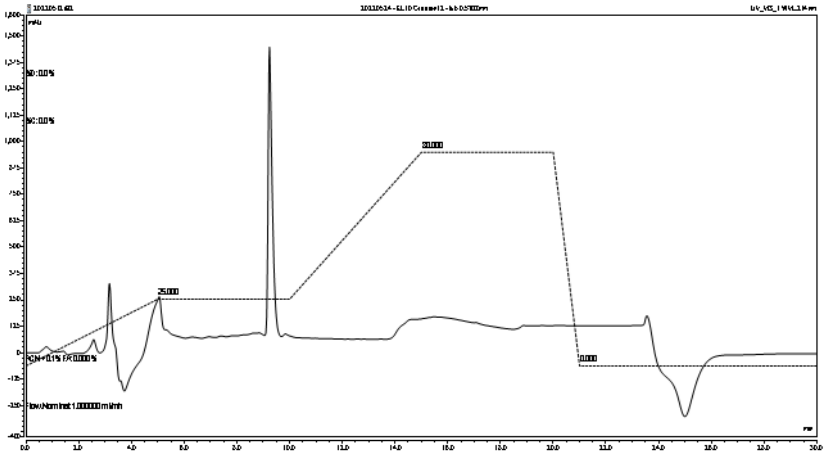
Annexe 2-6.3 : Chromatogramme UV du peptide EL10A avec un plateau à 25% d'ACN



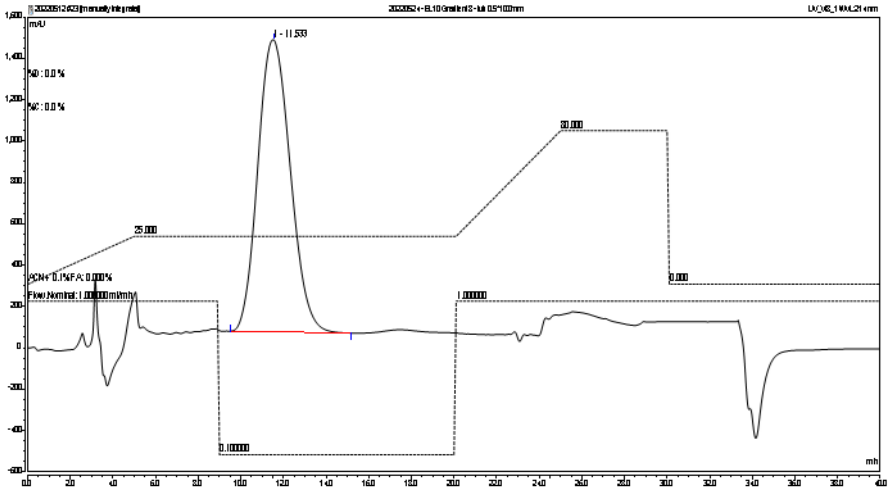
Annexe 2-6.4 : Chromatogramme UV du peptide EL10A avec diminution du débit de 1 mL.min^{-1} à 0.1 mL.min^{-1} au temps d'entrée du peptide dans la cellule UV



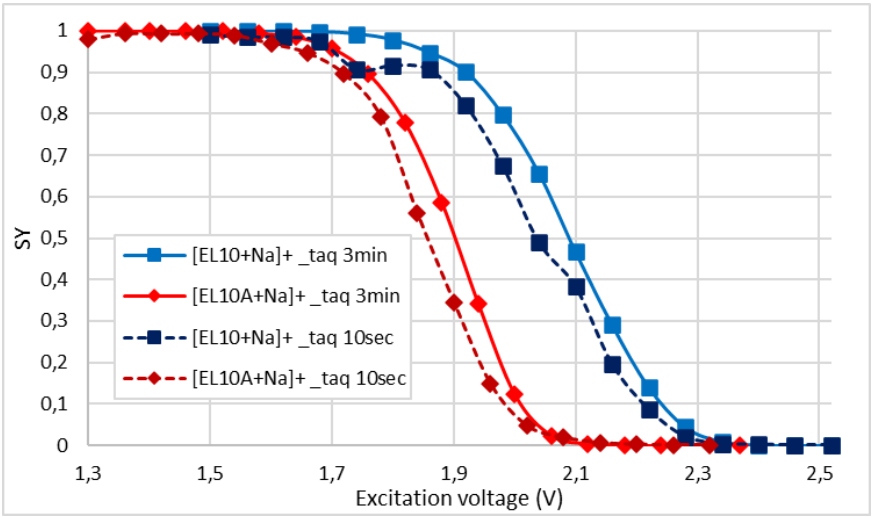
Annexe 2-6.5 : Chromatogramme UV du peptide EL10A avec un diamètre de tubulure entre la sortie de colonne et la cellule UV plus grand



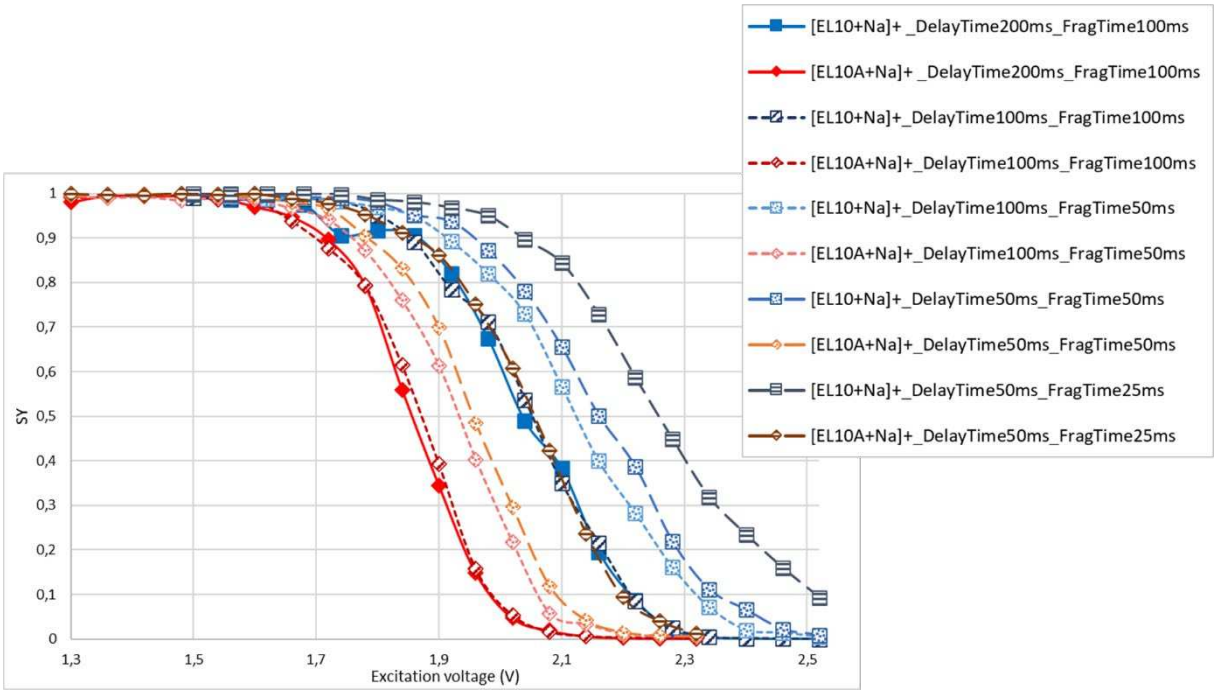
Annexe 2-6.6 : Chromatogramme UV du peptide EL10A avec diminution du débit de 1 mL.min^{-1} à 0.1 mL.min^{-1} au temps de sortie du peptide de la colonne



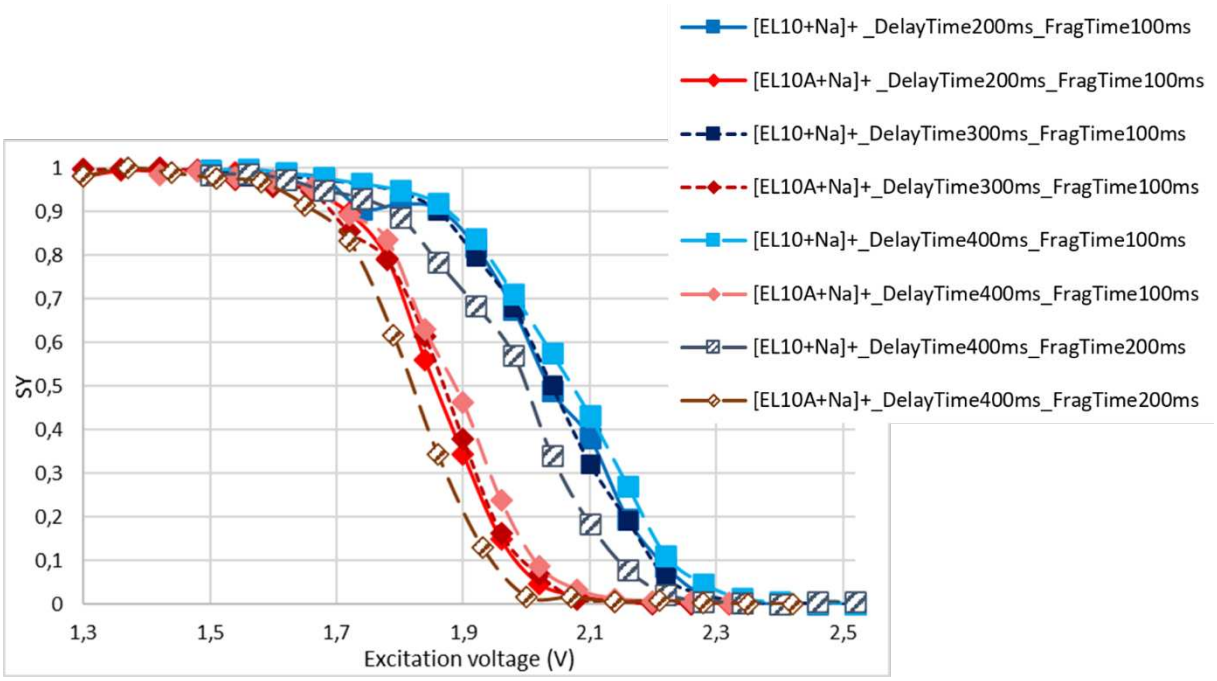
Annexe 2-6.7 : Comparaison courbes SY obtenues avec des temps d'acquisition de 3 minutes et 10 secondes



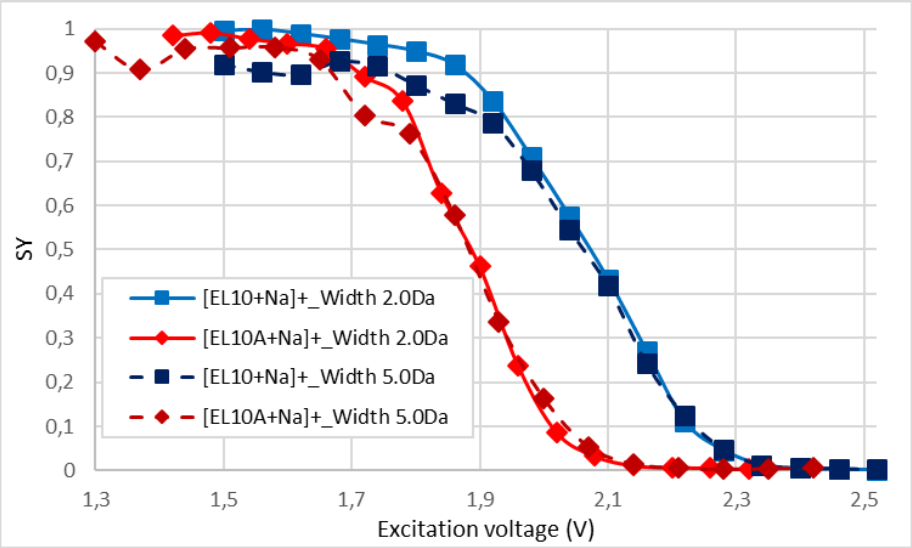
Annexe 2-6.8 : Courbes SY résultant d'une diminution du temps de délai des ions dans le piège associé à une modification du temps de fragmentation



Annexe 2-6.9 : Courbes SY résultant d'une augmentation du temps de délai des ions dans le piège associé à une modification du temps de fragmentation



Annexe 2-6.10 : Courbes SY résultant d'une augmentation de la fenêtre d'isolation de l'ion précurseur pour le calcul du taux d'ions survivants (Delay Time 400 ms, Fragmentation Time 100 ms)



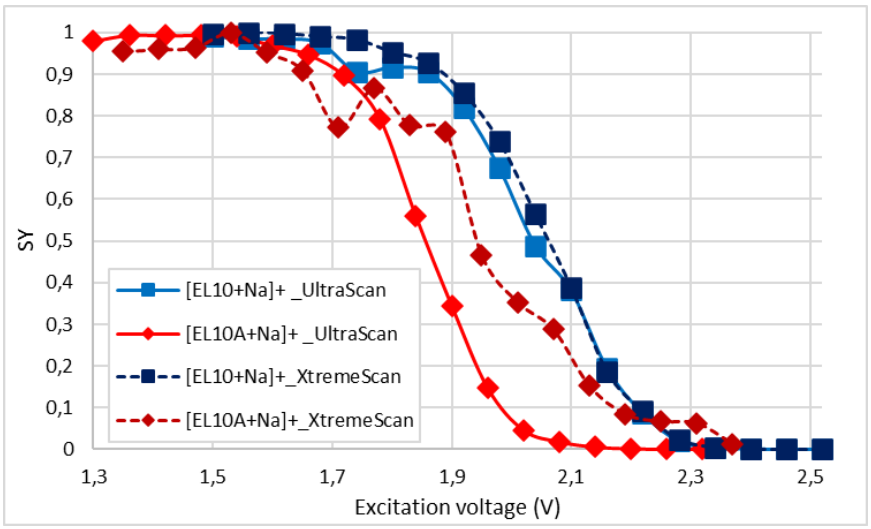
Annexe 2-6.11 : Courbes SY résultant d'une diminution de la résolution du spectromètre de masse (t_{aq} = 10 s, Delay Time 200 ms, Fragmentation Time 100 ms)

Modes de résolution utilisés (du plus au moins résolutif) :

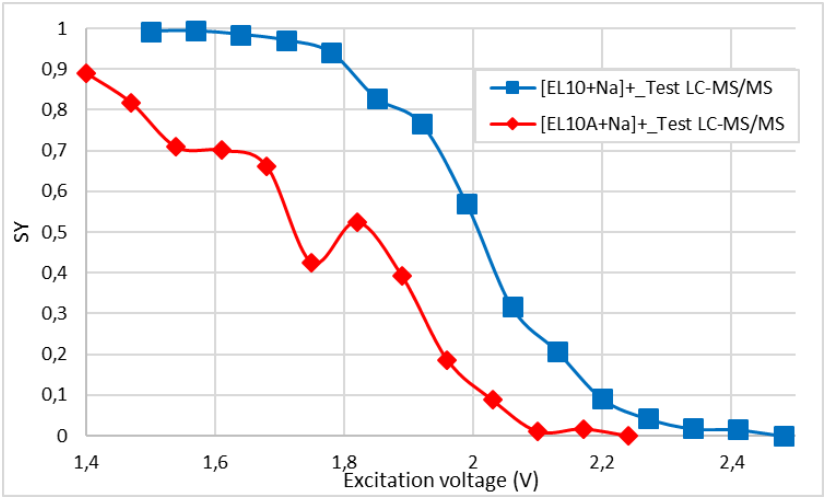
Ultra Scan : Speed : 32 500 *m/z*/sec

XtremeScan : Speed : 52 000 *m/z*/sec

Ci-dessous, les courbes SY obtenues :



Annexe 2-6.12 : Courbes SY résultant d'un premier essai de couplage LC-MS avec ajout d'une solution de NaCl en amont de la source



9) Liste Figures et Tableaux

Figure 1 : Courbes SY de peptides amide et acide obtenues suite à une cationisation par un ion magnésium comparées à celles obtenues par un ion sodium

Figure 2 : Courbes SY de peptides contenant un résidu amide en position C-terminale ou en milieu de séquence

Figure 3 : Courbes SY de peptides contenant un résidu acide en position C-terminale ou en milieu de séquence

Figure 4 : Comparaison de courbes SY issues de la fragmentation de peptides isomères (séquences soulignées)

Figure 5 : Comparaison des spectres MS/MS obtenus lorsque le résidu N ou D respectivement présent dans la séquence d'un peptide acide ou amide, en position C-terminale ou en milieu de séquence (SY $\simeq$ 1)

Figure 6 : Comparaison des spectres MS/MS obtenus lorsque le résidu Q ou E respectivement présent dans la séquence d'un peptide acide ou amide, en position C-terminale ou en milieu de séquence (SY $\simeq$ 1)

Figure 7 : Mécanisme proposé par Renner et Spiteller pour expliquer la formation d'ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$

Figure 8 : Courbes SY obtenues à partir de peptides dichargés

Figure 9 : Courbes SY des peptides cyclisés protonés avec les spectres MS/MS des peptides correspondant

Figure 10 : Courbes SY des peptides cyclisés sodés sous forme $[M+Na]^+$ avec les spectres MS/MS des peptides correspondant

Figure 11 : Courbes SY issues d'expériences MS^3 sur les ions $[b_8+Na+OH]^+$ produits par les peptides amides et acides cyclisés

Figure 12 : Spectre MS^3 obtenu pour la fragmentation de l'ion $[b_8+Na+OH]^+$ du peptide acide TPU10 à une tension de 2,18V

Figure 13 : Spectres MS^n sur les ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$

Figure 14 : Courbes SY des peptides cyclisés sodés sous forme $[M-H+2Na]^+$ avec les spectres MS/MS des peptides correspondant

Figure 15 : Chromatogramme des peptides EL10 et EL10A avec un débit de $1mL.min^{-1}$.

Figure 16 : Chromatogramme des peptides EL10 et EL10A avec le gradient optimisé

Figure 17 : Courbes SY des peptides EL10 et EL10A à $5.10^{-5}M$ injectés individuellement au pousse-seringue dans les conditions MS optimisées pour le couplage LC-MS

Figure 18 : Montage LC-MS permettant l'ajout de NaCl en amont de la source du spectromètre de masse

Figure 19 : Chromatogramme du venin avec ajout artificiel des peptides EL10 et EL10A, à partir de la méthode LC développée avec visualisation des acquisitions MS^2 appliquées avec les courbes SY obtenues des peptides EL10 et EL10A ajoutés artificiellement dans le venin

Figure 20 : Chromatogramme des peptides EL10 et EL10A co-élués

Figure 21 : Courbes SY des peptides EL10 et EL10A en mélange (ratio molaire 1:1) injectés au pousse-seringue, issues de différentes méthodes de traitement de données en modifiant la fenêtre de sélection de l'ion précurseur nécessaire au calcul du taux d'ions survivants

Tableau 1 : Séquences et masses des peptides amide et acide cationisés par un ion sodium ou magnésium

Tableau 2 : Séquences des peptides synthétisés en version amide et acide.

Tableau 3 : Séquences et masses des peptides sélectionnés de poids moléculaire supérieurs à 1000 $g.mol^{-1}$

Tableau 4 : Séquences et masses monoisotopiques des peptides cycliques isolés et caractérisés

Tableau 5 : Séquences et masses des peptides utilisés pour développer la méthode LC-MS des ions survivants

IV. Chapitre 3

Séparation de peptides amide et acide par différentes méthodes analytiques

IV. Séparation de peptides amide et acide par différentes méthodes analytiques

La technique des ions survivants n'ayant pas donné de résultats concluants quant à la quantification de peptides acides présents en mélange avec des peptides amides, d'autres techniques en spectrométrie de masse ont été envisagées. La séparation de peptides amides et acides, ionisés par des métaux alcalins, alcalino-terreux ainsi que des halogènes, dans l'objectif de quantifier le peptide sous forme acide a tout d'abord été envisagée par mobilité ionique en mode positif et négatif. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas été probants. De ce fait, des expériences en spectrométrie de masse ultra haute résolution (UHRMS) ont été menées, afin de résoudre cette problématique. Des méthodes séparatives de type chromatographie liquide et électrophorèse capillaire, usuellement mise en œuvre pour réaliser des quantifications de molécules à partir de traces UV, ou éventuellement de chromatogrammes masse dans le cas de couplage avec la spectrométrie de masse en tandem, ont été développées pour séparer les deux peptides. Les résultats de quantification obtenus par ces méthodologies séparatives ont été comparés aux valeurs déterminées en UHRMS afin de valider la pertinence de cette stratégie de dosage relatif d'une forme vis-à-vis de l'autre à partir de spectres de masse.

I) Utilisation de la mobilité ionique

La première méthode envisagée pour la séparation des deux peptides préalables à leur quantification en spectrométrie de masse est la mobilité ionique. En effet, il a été démontré qu'il est possible de réaliser des quantifications relatives de molécules dans un mélange, séparées par mobilité ionique, à partir de la mesure du temps de dérive des ions avec une droite d'étalonnage [1,2]. C'est pour cela que la séparation de peptides amides et acides en phase gazeuse a été expérimentée par cette technique dans le but de quantifier la forme acide dans un mélange.

La simple protonation des peptides n'a pas permis la séparation des séquences modifiées en C-terminal (voir **Annexe 3-1.1**). Dans les milieux biologiques, les protéines interagissent avec des métaux leur procurant des structures caractéristiques : on peut par exemple citer le motif en doigt de zinc, retrouvé dans des protéines, qui correspond à une complexation d'un ion zinc à deux histidines et deux cystéines [3]. Parmi les métaux impliqués dans les structures de protéines, il est possible de trouver des métaux alcalins (Na^+, K^+), des métaux alcalino-terreux (Mg^{2+}, Ca^{2+}) ainsi que des métaux de transition (Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}) [4]. Ces métaux interagissent généralement avec les fonctions des chaines latérales des acides aminés, mais également avec les oxygènes des carbonyles du squelette peptidique [4]. La cationisation de peptides par ces métaux a donc été réalisée pour réaliser des expériences de mobilité ionique [5,6]. En effet, il a été démontré que l'incorporation de métaux alcalins peut amener les peptides à adopter des conformations en phase gazeuse [7], différentes de celles des espèces protonées [8]. La cationisation par ces différents métaux a ainsi permis de séparer différents peptides isomères [9], et plus particulièrement différents diastéréoisomères [1,2,10,11]. Il est cependant important pour que la séparation soit possible que l'ion métallique soit capable de stabiliser une structure unique en phase gazeuse pour un seul isomère de manière préférentielle, par l'intermédiaire d'un pont salin par exemple [10].

Quelques couples de peptides amides et acides ont alors été cationisés par différents métaux afin de tester la faisabilité de les séparer par mobilité ionique.

a) Matériel et Méthode

Les expériences de mobilité ionique ont été réalisées sur le spectromètre de masse Synapt G2-S (Waters) (TWIMS). Les données ont été enregistrées et traitées par le logiciel MassLynx. Les échantillons ont été infusés dans la source ESI à un débit de 5 µL.min^{-1}. Les tensions appliquées ont été de +2 kV pour le capillaire et de 40 V pour le sampling cone, sous un flux d'azote à 500 L.h^{-1} chauffé à 250 °C. L'analyseur Tof a été calibré pour une 1 acquisition.s^{-1} de 50 à 1000 Da, en mode positif et négatif. La durée de ces acquisitions a été fixée à 30 s. Pour les analyses des ions $[M+X]^+$ (avec X = H, Na, K), $[M+Mg]^{2+}$ et $[M+Y]^-$ (avec Y = H, Br, I), la vitesse ainsi que la hauteur de vague dans la cellule de mobilité ont été fixées à 700 m.s^{-1} et 40 V respectivement. Le délai entre chaque vague a été fixé à 1000 µs. La pression du gaz de mobilité N_2 dans la cellule IMS a été fixée à 3.9 mbar.

Les peptides sélectionnés du Tableau 1 ont été synthétisés dans le laboratoire selon les protocoles conventionnels de synthèse en phase solide et purifiés par HPLC préparative en phase inverse. Ces peptides ont été dilués dans un mélange H_2O/ACN (50/50, v/v) à 5.10^{-5} M. Différentes solutions (NaCl, KCl, $MgCl_2$, NaBr, NaI) ont été ajoutés aux peptides solubilisés dans un ratio molaire 1:1.

<u>Tableau 1 :</u> Séquences et masses (protonés, déprotonés, adduits) des peptides sélectionnés pour les expériences de mobilité ionique

N°	Séquence	Fonction C-ter	ESI(+)			
			$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+K]^+$	$[M+Mg]^{2+}$
1a	GILFAVA	$-NH_2$	689.4345	711,4164	727,5250	356,3658
1b		-OH	690,4185	712,4004	728,5090	356,8578
2a	LAVGIAW	$-NH_2$	728,4454	750,4273	766,5359	375,8713
2b		-OH	729,4294	751,4113	767,5199	376,3633
3a	APIAGFV	$-NH_2$	673,4032	695,3851	711,4937	348,3502
3b		-OH	674,3872	696,3691	712,4777	348,8422
4a	LAVGIAE	$-NH_2$	671,4087	693,3906	709,4992	347,3529
4b		-OH	672,3927	694,3746	710,4832	347,8449
5a	FDAVAIA	$-NH_2$	705,3930	727,3749	743,4835	364,3451
5b		-OH	706,3770	728,3589	744,4675	364,8371
6a	LAVAIAS	$-NH_2$	643,4137	665,3956	681,5042	333,3554
6b		-OH	644,3978	666,3797	682,4883	333,8475
7a	LAVTAIA	$-NH_2$	657,4294	679,4113	695,5199	340,3633
7b		-OH	658,4134	680,3953	696,5039	340,8553
8a	LAVAIAR	$-NH_2$	712,4828	734,4647	750,5733	367,8900
8b		-OH	713,4668	735,4487	751,5573	368,3820
9a	LAVGIAR	$-NH_2$	698,4672	720,4491	736,5577	-
9b		-OH	699,4512	721,4331	737,5417	-

N°	Séquence	Fonction C-ter	ESI(-)		
			$[M-H]^-$	$[M+Br]^-$	$[M+I]^-$
1a	GILFAVA	$-NH_2$	687,4189	768,3307	815,3312
1b		-OH	688,4029	769,3147	816,3152
2a	LAVGIAW	$-NH_2$	726,4298	807,3416	854,3421
2b		-OH	727,4138	808,3256	855,3261
3a	APIAGFV	$-NH_2$	671,3876	752,2994	799,2999
3b		-OH	672,3716	753,2834	800,2839
4a	LAVGIAE	$-NH_2$	669,3931	750,3049	797,3054
4b		-OH	670,3771	751,2889	798,2894
5a	FDAVAIA	$-NH_2$	703,3774	784,2892	831,2897
5b		-OH	704,3614	785,2732	832,2737
6a	LAVAIAS	$-NH_2$	641,3981	722,3099	769,3104
6b		-OH	642,3822	723,2940	770,2945
7a	LAVTAIA	$-NH_2$	655,4138	736,3256	783,32607
7b		-OH	656,3978	737,3096	784,31007
8a	LAVAIAR	$-NH_2$	-	-	-
8b		-OH	-	-	-
9a	LAVGIAR	$-NH_2$	696,4516	777,3634	824,3639
9b		-OH	697,4356	778,3474	825,3479

b) Résultats

Les ions métalliques appropriés pour réaliser des ponts salins, issus de liaisons électrostatiques, sont K^+, Na^+ et Mg^{2+} [4] pour ainsi espérer créer des structures en phase gazeuse différentes entre les peptides amides et acides. Ces cations métalliques interagissent principalement avec les oxygènes des carbonyles du squelette, ainsi que ceux des résidus Asp et Glu. Il est aussi possible qu'ils se coordonnent avec les oxygènes des résidus Ser et Thr, ceux de l'Asn et Gln ou encore aux doublets non liant des atomes d'azote de l'His [4]. Cependant, les peptides contenant des résidus dits neutres (n°1 à 3 dans Tableau 1) ainsi que ceux contenant les résidus cités (n°4 à 7 dans Tableau n°1) n'ont pas été séparés par mobilité ionique (voir **Annexe 3-1.2**), peu importe l'agent de cationisation. Seuls les peptides contenant un résidu Arg (n°8 et 9 dans Tableau n°1) ont été séparés par mobilité ionique suite à une cationisation par un ion sodium (voir Figure 1 et **Annexe 3-1.2**).

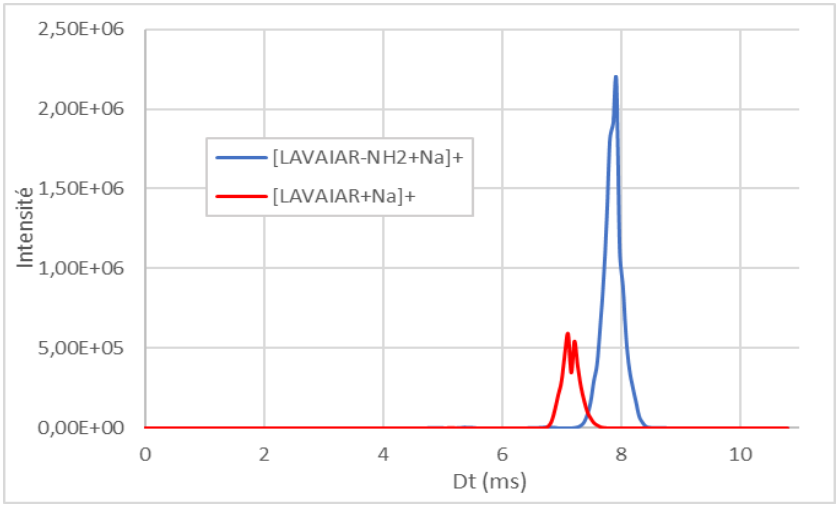


Figure 1 : Mobilogrammes des peptides n°8a et 8b sodés

Le groupement guanidine de l'Arg peut en effet participer à la coordination des ions métalliques. Un pont salin peut se créer entre le groupement guanidine protoné du résidu Arg C-terminal et la fonction acide carboxylique C-terminale du peptide acide déprotoné (carboxylate). Si cette forme zwitterionique n'existe pas, l'addition d'un ion métallique génère des complexes à charge solvatée [12,13]. La plus grande affinité de l'ion sodium pour ce résidu pourrait s'expliquer par une chaine latérale plus longue, plus éloignée du squelette peptidique, augmentant alors les entropies de liaison au Na^+ [14]. Cet effet a été rapporté pour les complexes de Cu^I et d'Ag avec les résidus Lys et Arg [15–17]. Il a été démontré que la formation du pont salin avec l'Arg est plus stable avec l'ion K^+ par rapport à celui formé avec l'ion Na^+ [12]. Cependant, la cationisation des peptides n°8a et 8b du Tableau n°1 par ce métal alcalin affecte la séparation des deux formes par mobilité ionique (voir **Annexe 3-1.2**). Les coefficients de variations (CV) des temps de dérive ont été calculés afin d'attester ces séparations (CV < 3%, voir **Annexe 3-1.3**).

La cationisation par un ion magnésium n'a également pas permis de séparer les peptides amide et acide. Seul un début de séparation a été observé pour les peptides 2a et 2b ainsi que 8a et 8b (voir **Annexe 3-1.2**), qui pourrait potentiellement s'expliquer par la présence du résidu C-terminal de chaque peptide qui correspond à un résidu W et R respectivement. Les chaines latérales de ces résidus sont volumineuses (fonction indole et guanidine), et peuvent interagir avec le métal alcalino-terreux et donc potentiellement avec la fonction C-terminale du peptide. L'échec de séparation pourrait également s'expliquer par les conditions opératoires qui sont identiques à celles optimisées pour la

séparation des ions monochargés, tandis que la cationisation par le magnésium génère des ions dichargés. La vitesse de vague appliquée a alors été diminuée/augmentée afin d'optimiser la distinction entre les peptides amide et acide. Cependant, cela n'a pas donné lieu à de meilleures séparations.

Afin d'améliorer les séparations des peptides amide et acide par mobilité ionique, des expériences en mode négatif ont été réalisées. Ces expériences ont été réalisées à partir des peptides amide et acide du Tableau n°1 déprotonés et ionisés par les halogènes Br^- et I^- (voir **Annexe 3-1.4**). L'incorporation de ces halogènes de différentes tailles, pouvant potentiellement générer des conformations différentes entre les peptides amides et acides, n'a pas permis d'obtenir de meilleures séparations par rapport au mode positif.

Il est possible d'observer des différences d'intensité entre les peptides amide et acide sur les mobilogrammes présentés en annexes. Cela peut s'expliquer de différentes façons. Premièrement, les peptides sélectionnés ne sont pas purs. De ce fait, pour une même pesée, les quantités de peptides amide et acide ne sont potentiellement pas les mêmes. Ensuite, la présence de gaz dans la cellule de mobilité (N_2 mais principalement He pour ce phénomène) pourrait générer des collisions et induire la fragmentation du peptide contenant les liaisons les plus fragiles, diminuant alors l'intensité du peptide intact [18,19]. Cela pourrait être vérifié en sélectionnant l'ion dont on veut mesurer la mobilité ionique en amont de la cellule IMS dans le quadripôle. Pour les peptides cationisés par des métaux, cela peut tout simplement s'expliquer par les différences d'affinité avec les ions métalliques.

Toutefois, il est encore possible de modifier la pression de N_2 dans la cellule de mobilité, qui n'a pas été variée au cours des différentes expérimentations. Ce paramètre pourrait donner lieu à une meilleure séparation des peptides amide et acide. Il serait également intéressant de pouvoir analyser ces couples de peptides avec un DT-IMS (Drift Tube IMS) ou un TIMS (Trap IMS), qui affichent de plus grande résolution que le TWIMS du Synapt G2-S, afin de continuer l'optimisation de cette séparation.

Une autre méthode se basant sur la spectrométrie de masse a alors été envisagée : l'utilisation de la ultra-haute résolution (UHRMS). Ces spectromètres de masse offrent la possibilité de séparer les massifs isotopiques des peptides amides et acides, qui différent d'uniquement 0.984 Da.

2) Séparation des peptides amides et acides - Quantification du peptide acide par spectrométrie de masse et des techniques séparatives

a) Publication (Talanta, 2022, DOI : 10.1016/j.talanta.2022.124036)

Quantitating α-Amidated Peptide Degradation by Separative Technologies and Ultra-High Resolution Mass Spectrometry

Elodie Logerot[1], Catherine Perrin[1], Yoann Ladner[1], Frédéric Aubriet[2], Vincent Carré[2], Christine Enjalbal[1]*

[1] Univ Montpellier, IBMM, CNRS, ENSCM, Montpellier, France
[2] Université de Lorraine, LCP-A2MC, F-57000 Metz, France

Keywords: Peptide degradation, Relative quantification, FT-ICR MS, Liquid chromatography, Capillary Electrophoresis

ABSTRACT α-amidation of peptides is a C-terminal modification allowing to improve half-life of therapeutic peptides. However, due to storage conditions, this C-terminal amide function can be partially hydrolyzed into a carboxylic acid moiety, resulting in a decrease of the molecule bioactivity. It is therefore necessary to be able to detect and quantify any trace of this degradation product when dealing with such class of peptides. For this purpose, LC-UV, CE-UV, LC/MS and LC/MS/MS are conventional analytical technologies used in pharmaceutical laboratories to monitor peptide integrity. Since the production of the carboxylated peptide issued from the amidated starting compound is scrutinized, ultra-high-resolution mass spectrometry was investigated without the recourse to any separative method (direct infusion mode) to achieve rapid straightforward relative quantitative analyses from the detected isotopic clusters of both peptides. Indeed, low or high-resolution MS instruments present in pharmaceutical laboratories (fitted with Q, IT or ToF mass analyzers) allow to distinguish both molecular ions that differ from 0.984 Da (NH_2 formally substituted by OH). However, the analytical difficulty comes from the fact that the A+1 ion (^{13}C contribution) of the amidated peptide and the A ion (^{12}C contribution) of any produced carboxylated sequence are overlapping hampering the detection of minute amount of the hydrolyzed product. Actually, to differentiate these two isobaric ions, mass analyzers should possess at least a resolution of 90 000 for 7 residues peptides (molecular ions around 700–800 Da) which is presumably attainable with any FT-MS instrument. With an ultra-high-resolution mass spectrometer (FT-ICR MS) the observed fine isotopic structure displaying all expected isotopologues permitted in a single fast analysis to unambiguously detect both compounds (non-hydrolyzed and hydrolyzed one) and subsequently define the relative amount of the carboxylated peptide contaminant. Finally, these results were confronted with conventional measurements recorded with orthogonal methodologies such as LC-UV and CE-UV. The pro and cons of all quantitative strategies are discussed.

1. Introduction

Over the past few years, therapeutic synthetic peptides have been developed in the pharmaceutical industry reaching 7% of Food Drug Administration (FDA) approved drugs between 2015 and 2019 (15 over 208 approved new drugs) [1]. In 2020, 3 peptides received approval from FDA, representing almost 6% of the new authorized drugs [2]. Indeed, this biomolecule category presents several advantages such as high specificity and high selectivity compared to small organic molecules. Due to their natural presence in the body, their toxicity is potentially lower than exogenous synthetic compounds inducing a better tolerance by the organism [3,4]. Moreover, natural proteins and peptides can be in vivo subjected to several post-translational modifications (PTM) that may improve their stability and/or activity. Among these PTMs, α-amidation is a widespread C-terminal backbone modification with a carboxylic acid (-COOH) being replaced by an amide function (-$CONH_2$), allowing inhibition of peptide degradation by proteases [5]. The C-terminal amide is introduced through oxidative C-terminal glycine-extended propeptides that are matured under enzymatic processes [6,7]. C-terminal amidation is also a signature of bioactivity in natural samples since it can be essential to peptide activity [7–11]. Considering their low production cost, it is therefore quite natural to find such peptides as bioactive molecules on the pharmaceutical market [12]. Although several strategies are proposed for peptide synthesis, solid-phase peptide synthesis (SPPS) has the advantage to produce large-scale pharmaceutical-grade peptides [12]. For example, desmopressin, which is a disulfide bond amidated peptide used to treat diabetes insipidus among others [13], is synthetized by SPPS with 85% yield and 86% purity [14]. As for any synthetic molecule, impurities can be produced during the preparation steps requiring extensive purification of the final product. Noteworthy, degradants can also appear due to storage conditions. Continuing with the desmopressin example, the C-terminal amide can be hydrolyzed into a carboxylic acid function [13]. Such hydrolysis also occurs in vivo during metabolism. Although the resulting C-terminal carboxylated peptide is not considered as toxic, its biological activity is less efficient. As for desmopressin, it is therefore interesting to quickly detect and quantify any α-amidation hydrolysis that can alter the drug efficacy of amidated therapeutic peptides. Indeed, if such bioactive compounds are already partially hydrolyzed before administration, the delivered dose will not correspond to the prescribed one being deleterious to the expected therapeutic effects. This problem, which plagues the biopharma industry, is very similar to the issue of protein deamidation, where an asparagine or glutamine residue converts spontaneously over time to aspartic acid or glutamic acid and related cyclic structures [15–18]. High pressure liquid chromatography-UV (HPLC-UV) is the most used analytical method to check the presence of degradation products in pharmaceutical peptides [19]. This separative method allows the differentiation of peptides according to their polarity and sequence length. It is also possible to separate peptides according to their charge and size by capillary electrophoresis (CE), thanks to their different isoelectric point (pI). Although these separative methods are commonly used, the analysis of amidated and carboxylated peptides that exhibit very similar structures requires extensive method development. Indeed, for liquid chromatography analyses, the C-terminal modification which solely distinguishes these sequences does not clearly generate different physicochemical properties, making their separation quite delicate. Moreover, the recourse to UV as detection system requires the prior knowledge of the retention (tR) or migration (tM) time of the hydrolyzed product to be detected/quantified. Since several impurities of different nature may be present, a database containing their tR or tM should be available. To avoid generating too much data and to save time in data reprocessing, it is possible to couple these separative techniques to mass spectrometry (MS), thus providing direct information on the nature of

the analyzed impurity by its m/z value. Despite the fact that both techniques can be hyphenated to mass spectrometry, LC-MS coupling is mainly used in pharmaceutical laboratories owing to the compatibility of their respective mobile phases. In contrast, CE-MS coupling is less common since it requires a more thorough and consequent method development. As a matter of fact, it is also possible to use a mass spectrometer without any separative method upstream, thus performing direct infusion of the sample of interest into the MS ion source. Nevertheless, detecting in that case a hydrolyzed peptide with common mass spectrometer equipped with quadripole (Q), ion trap (IT) or time of flight (ToF), mass analyzers is tricky since carboxylated peptides differ from the amidated ones by only 0.984 Da. Thus, the isotopic patterns of both biomolecules molecular ions overlap and prevent hydrolyzed product to be straightforwardly detected, especially when produced at minute quantities with a low rate of hydrolysis. For instance, to detect this contamination from the isotope distribution of a 1000 Da amidated peptide, the resolution of the mass spectrometer must be greater than 90 000. Not all pharmaceutical laboratories possess such high-resolution mass spectrometer (HRMS) notably due to their high cost. To circumvent this difficulty, some methods were proposed in the literature by chemical modifications based on the different peptides reactivities, to differentiate the two forms. In order to prevent such tedious sample manipulations, we propose to only reckon on ultra-high-resolution mass spectrometry to apprehend α-amidated peptide degradation. Since a majority of peptides entering clinical development are fewer than 10 amino acids long [20], two series of synthetic peptides containing 7 residues (amidated and their carboxylated versions) that were stored for more than one decade at 4 °C in a fridge were selected to undergo UHRMS (FT-ICR MS) analyses in order to detect and quantify any hydrolyzed form. Furthermore, these results were confronted for few peptides with the ones recorded more conventionally with separative LC and CE methodologies upon UV detection in order to validate the proposed FT-ICR MS quantification strategy.

2. Material and Methods

2.1 Amidated peptides

Peptides were prepared in amidated and carboxylated forms according to conventional solid-phase protocols and purified by preparative reversed-phase HPLC. As a matter of fact, it is very difficult to entirely remove all truncated/deleted peptide chains produced during the synthesis step due to very similar molecular weight, sequence length and pI inducing very close retention times in HPLC. Average purities around 80% according to UV response at 214 nm were achieved (See Figure 2 for peptides n° 1 to 4). Synthetic peptides were stored at 4°C. Due to long term storage, some amidated peptides can be partially hydrolyzed into their carboxylated forms at different percentages of contamination. We aimed at determining such peptide degradation in a rapid and reliable manner to provide a straightforward analytical method to control peptide drugs. Peptide pI were calculated with Prot pi Peptide Tool (https://www.protpi.ch/Calculator/PeptideTool), offering the possibility to add PTMs such as C-terminal amidation to the sequence. Default parameters were used, with pKa values from Protein Modification Screening Tool.

Table 1: Studied couple of peptides (carboxylated and amidated forms)

Sequence	N° C-terminus $-NH_2$ (a) / -OH (b)	Elemental composition	Carbon isotope contribution : $[M+H]^+$ ion			pI
			A (^{12}C)	A+1 ($1 * ^{13}C$)	A+2 ($2 * ^{13}C$)	
IFAVLGA	1a	$C_{34}H_{56}N_8O_7$	689.4345	690.4378	691.4411	14.0
	1b	$C_{34}H_{55}N_7O_8$	690.4185	691.4218	692.4251	5.6
GILFAVA	2a	$C_{34}H_{56}N_8O_7$	689.4345	690.4378	691.4411	14.0
	2b	$C_{34}H_{55}N_7O_8$	690.4185	691.4218	692.4251	5.6
FDAVAIA	3a	$C_{33}H_{52}N_8O_9$	705.3930	706.3963	707.3996	5.5
	3b	$C_{33}H_{51}N_7O_{10}$	706.3770	707.3803	708.3836	3.9
AGVDNFG	4a	$C_{29}H_{43}N_9O_{10}$	678.3206	679.3284	680.3317	5.8
	4b	$C_{29}H_{42}N_8O_{11}$	679.3046	680.3079	681.3112	3.9
APIAGFV	5a	$C_{33}H_{52}N_8O_7$	673.4032	674.4065	675.4098	14.0
	5b	$C_{33}H_{51}N_7O_8$	674.3872	675.3905	676.3938	5.6
IVAVLGA	6a	$C_{30}H_{56}N_8O_7$	641.4345	642.4378	643.4411	14.0
	6b	$C_{30}H_{55}N_7O_8$	642.4185	643.4218	644.4251	5.6
FPCEAFA	7a	$C_{37}H_{52}N_8O_9S_1$	783.3494	784.3527	785.3560	5.7
	7b	$C_{37}H_{49}N_7O_{10}S_1$	784.3334	785.3367	786.3400	4.1
FFAVAIA	8a	$C_{38}H_{56}N_8O_7$	737.4345	738.4378	739.4411	14.0
	8b	$C_{38}H_{55}N_7O_8$	738.4185	739.4218	740.4251	5.6
LAVGIAE	9a	$C_{30}H_{54}N_8O_9$	671.4087	672.4120	673.4153	6.1
	9b	$C_{30}H_{55}N_7O_{10}$	672.3927	673.3960	674.3993	4.1
LAVTAIA	10a	$C_{30}H_{56}N_8O_8$	657.4294	658.4327	659.4360	14.0
	10b	$C_{30}H_{55}N_7O_9$	658.4134	659.4167	660.4200	5.6
LAVAIAS	11a	$C_{29}H_{54}N_8O_8$	643.4137	644.4170	645.4203	14.0
	11b	$C_{29}H_{55}N_7O_9$	644.3978	645.4011	646.4044	5.6
LAVGIAW	12a	$C_{36}H_{57}N_9O_7$	728.4454	729.4487	730.4520	14.0
	12b	$C_{36}H_{56}N_8O_8$	729.4294	730.4327	731.4360	5.6
LAVGIAR	13a	$C_{31}H_{59}N_{11}O_7$	698.4672	699.4705	700.4738	14.0
	13b	$C_{31}H_{58}N_{10}O_8$	699.4512	700.4545	701.4578	9.5

2.2 High performance liquid chromatography

2.2.1 Sample preparations

Peptide stock and diluted solutions were dissolved in a 0.05 % trifluoroacetic acid mixture of H_2O/CH_3CN (50/50, v/v).

2.2.2 Instrumentation and operating conditions

LC-UV analyses were performed on a Thermo Fisher Scientific UPLC Ultimate 3000 (San Jose, USA). Chromatographic separations were carried out on a Luna Omega 3µm Polar C18 (150 x 4.6 mm) column. Other columns were tested to optimize peptide separation : classical C18 columns (2.6 µm and 3.6 µm, 100 * 2.1 mm each), C18 PS column (1.6 µm, 100 * 2.1 mm) presenting a mixed-mode stationary phase, and SB-CN columns (5 µm, 4.6 * 150 mm and 3.5 µm, 4.6 * 75 mm) which present a cyano protected stationary phase chemically bonded to porous silica microspheres. The column and

autosampler temperatures were set at 25 °C. Solvent A was prepared by combining water with 0.05 % trifluoroacetic acid (v/v); solvent B by combining acetonitrile with 0.05 % trifluoroacetic acid (v/v). The optimized gradient used to separate the peptides of interest starts with an isocratic gradient with 15 % solvent B for 3 min and then linearly increasing to 65 % solvent B in 5 minutes, followed by a column rinse by 85 % solvent B for 3 min. The mobile phase is then ramped back to 15 % solvent B for equilibration prior to the next injection. The flow rate was set at 1 mL.min-1. Analyte solutions were injected into the column with a volume of 20 µL. Data were acquired and processed with Chromeleon 7.1 software (Thermo Fisher Scientific).

2.3 Capillary electrophoresis

2.3.1 Solutions and sample preparations

Capillary polyethylene oxide (PEO) coating solution

Stock solution of polyethylene oxide (PEO) was prepared by dissolving 100 mg of PEO (MW = 1 000 000) in 45 mL of distilled water heated at 95 °C during 90 minutes. PEO coating solution was then prepared by adding 0.5 mL of 1 M HCl to 4.5 mL of PEO stock solution. This solution is stored at 4°C.

Background electrolyte (BGE)

25 mM ionic strength (IS) citric buffer adjusted to pH 3.0 with sodium hydroxide solution was used as BGE for the analyses of the peptides.

Peptide sample solution

Peptide stock solutions were dissolved in a mixture of H_2O/CH_3CN (50/50, v/v) at a concentration of 10^{-3} M. Stock solutions were diluted in the BGE for CE analysis.

2.3.2 Instrumentation and operating conditions

CE-UV analyses were performed with a Beckman-Coulter Proteome Lab PA800 capillary electrophoresis system (Sciex, USA). Polymicro fused silica capillaries (Molex, USA) (id = 50 µm, Leff = 20 cm, L = 30 cm) were used for the analyses. Autosampler and capillary cartridges were set at 25°C. All rinses were performed hydrodynamically at 137 895 Pa (20 psi). Capillary pre-conditioning was performed by the following successive rinsing procedure: NaOH 1 M, NaOH 0.1 M, water and HCl 0.1 M for 5 min each. Capillary coating with PEO was then performed to avoid any peptide adsorption during analysis. The following procedure of successive rinses was used: NaOH 1M (10 min), water (5 min), HCl 0.1 M (10 min), PEO (10 min), water (5 min), and eventually BGE (5 min). The coating was regenerated every 6 analyses. Prior to each analysis, the coated capillary was rinsed with BGE for 5 min. Hydrodynamic injection of the samples was used for 10 seconds, corresponding to 19.77 nL (3447.4 Pa (0.5 psi)), followed by a BGE plug injection for 3 seconds (3447.4 Pa (0.5 psi)) to avoid any sample loss on voltage application. Separations were achieved under 20 kV with an additional pressure of 689.5 Pa (0.1 psi). UV detection was performed at 214 nm. The current (about 27 µA) was monitored throughout the run. Data were acquired and processed with 32 Karat software (Beckman-Coulter).

2.4 Ultra-high resolution mass spectrometry instrumentation (UHRMS)

Ultra-high-resolution mass measurements were performed in positive-ion mode with a 7 T FT-ICR mass spectrometer (Solarix 2XR, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Peptide sample solutions were directly injected in an electrospray source (ESI). ESI and instrument parameters were optimized by the FTMS-Control V2.3.0 (Bruker Daltonics) software. Mass spectrometer was tuned and externally calibrated using a 0.1 mg.mL^{-1} NaTFA solution (H_2O/CH_3CN - 50/50, v/v). Mass spectra were acquired over the 200–1000 m/z range with a 4 megaword time-domain using 2w quadripolar detection (2s of transient), and 10 scans were accumulated. One scan resulted from an ion accumulation time of 10 ms. Mass resolving power was around 500 000 at m/z 600. Each peptide sample was infused with a flow rate of 2 µL.min^{-1}. The ESI source conditions were set with drying gas temperature and flow rate at 200 ◦C and 4 L.min^{-1}, respectively, and the pressure of the nebulizer gas was 80 000 Pa (0.8 bar). The capillary voltage was 4.2 kV. Software DataAnalysis 5.2 (Bruker, Daltonics) was used for data processing. Molecular formulae were assigned within a ±0.5 ppm mass error range. Only C, H, O, N elements and protonated ions were considered. Real isotopic distributions were compared with the simulated ones.

3. Results and Discussion

As previously stated, synthetic C-terminal amidated peptides were selected from a home-made peptide library that was stored in a fridge for more than one decade in order to assess their long-term stability towards hydrolysis reactivity. According to drug-like features depicted by the Lipinsky rules [21] favoring structures with low molecular weights, rather short sequences of 7 residues were chosen (700–800 Da). Particular attention was devoted to the presence of any type of amino acid at the C-terminal position (aliphatic and aromatic residues such as glycine (G), alanine (A), valine (V), phenylalanine (F), polar residues illustrated by serine (S), threonine (T), proline (P), cysteine (C) and tryptophan (W) as well as acidic and basic residues like aspartic acid and glutamic acid (D, E) and arginine (R), respectively). Noteworthy, one sequence displaying an asparagine (N) residue that possess an amide function onto its lateral side-chains (Peptide 4a and 4b in Table 1) was also included in the study to question the regioselectivity of the targeted degradation reaction. At last, all the selected C-terminal amidated peptides were also available in the library as the corresponding carboxylated chains meaning that both starting materials and final degradation products can be analyzed by UHRMS, LC-UV and CE-UV for relative quantification purposes. Indeed, we have recently investigated the separation of both amidated and carboxylated forms of some stored peptides by energy-resolved mass spectrometry experiments [22,39]. Although very interesting results were obtained at the detection level, such MS/MS strategy was found less efficient for quantification purposes. For that reason, we performed further investigations to achieve efficient detection and quantification with a unique analytical technology.

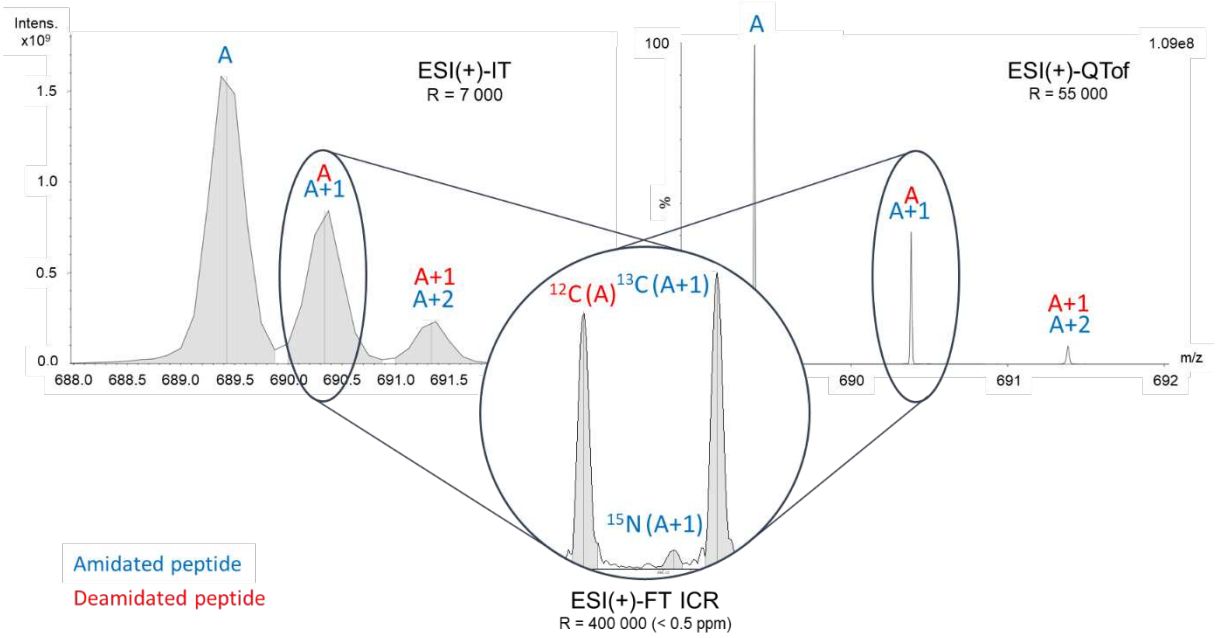
3.1 Peptide/degradant separation and quantification

3.1.1 FT-ICR

Coupling separative method such as LC or CE with mass spectrometry (MS) offers the possibility to explore complex mixtures such as biological samples. However, synthetic products are less challenging

to analyze since they contain limited side-products. In the case of C-terminal amidated peptide hydrolysis, direct infusion can thus be performed since differences in ionization outputs of such structurally related compounds should be negligible. However, the nature of the mass analyzer and its intrinsic mass-resolution performance is of utmost importance to be able to differentiate, under direct injection mode, both $[M+H]^+$ isotopic patterns shifted by 0.984 Da as shown in Fig. 1. Considering that the most common mass spectrometers in pharmaceutical laboratories: ion trap (IT), quadrupole (Q) or even time of flight (ToF) intruments possessing respectively low or high resolution, noticeable limitations in the capacity of unambiguously detecting partial hydrolysis are evidenced for peptides n◦1a and 1b of Table 1. In this example, the first peak of both isotopic patterns noted "A" which contain stable isotopes of the lowest atomic masses (^{1}H, ^{12}C, ^{14}N, ^{16}O) differ from 0.984 Da (formally NH_2 replaced by OH). Noteworthy, this scrutinized mass increment approaching 1 Da is very close to the atomic masses of neutrons that are present in the heavier isotopes of the considered elements (^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{17}O, ^{18}O). For instance, the natural abundances of ^{13}C (1.1%) and ^{15}N (0.37%) majorly contribute to the detection of an ion noted "A+1" in the molecular isotopic pattern. This ion results in a mass increment from the A ion of 1.0033 atomic mass unit for ^{13}C contribution or 0.9970 for ^{15}N insertion, respectively. Under such considerations, neither the mass-resolution of the IT nor the QToF mass analyzer is sufficient to distinguish ^{13}C from ^{15}N contributions of the $[M+H]^+$ ion signals gathered into a single A+1 peak which is commonly admitted for standard identification purposes. But much more problematic for our research concern, this A+1 ion of the amidated peptide referring to the cumulated contributions of $^{13}C/^{15}N$ isotopes (+1.003/+0.997 Da) overlap with the A ion of the hydrolyzed carboxylated form (+0.019 Da mass shift from amidated A+1 ion, the minimum resolving power needed to separate these ions for peptides around 700 Da being around 90 000). The miscellaneous nature of this ion referring to isobaric compounds (different elemental composition but same detected m/z with an inadequate mass-resolution) represent an actual pitfall to unambiguously pinpoint a chimeric mass spectrum. This problem is particularly acute when the expected amidated peptide is slightly contaminated by the hydrolyzed sequence since the relative abundances of A vs A+1 ion within the isotopic pattern will be not too much affected by the contamination (relative variation of few percent within the discrepancy of ion transmission). Thereafter, without prior chromatographic separation, this decisive issue is only solved by MS measurements at ultra-high mass resolving power that allow distinctly recording all isotope contributions. As seen in Fig. 1, the FT-ICR used in this study provided chemical fine structures of A+1 ion of the amidated peptide molecular signals (for instance $^{12}C_{33}{}^{13}CH_{57}N_8O_7$ and for $C_{34}H_{57}{}^{14}N_7{}^{15}NO_7$ were well separated at m/z 690.43782 and 690.43153, respectively), far apart from the A ion of the carboxylated species ($C_{34}H_{56}N_7O_8$ at m/z 690.41846). Therefore, in order to compare the two peptides isotopic patterns in ultra-high resolution FT-ICR measurements, we only relied on the contribution of the carbon atom (^{12}C or ^{13}C) in the A, A+1 and A+2 ions of the protonated molecular species as calculated in Table 1. Since the C-terminal amide function being modified into an acid function solely affects the number of O, N and H atoms, the number of carbon atoms remains the same between the two compounds of interest. Another reason to neglect the contribution in the A+1 and A+2 ions of the other heavy isotopes (^{2}H,^{15}N, ^{17}O, ^{18}O) comes from their low natural abundances (0.0001%, 0.0037%, 0.0004 and 0.0021%, respectively) compared to the ^{13}C one (1.1%).

Figure 1: Comparison of an amidated peptide isotopic pattern contaminated by its carboxylated form obtained with low to ultra-high-resolution mass spectrometers.



Thus, despite the difference of C-terminal function, direct relative quantitation of peptides is possible from separated isotopic patterns. Ion intensities from the carbon contribution are extracted from the spectrum and used for calculations. It is possible to directly compare A ions from the two isotopic patterns since the carbon isotopic contribution (^{12}C) is the same for both. It is then sufficient to calculate a ratio of the intensity of the A ion of the carboxylated peptide and the amidated peptide as shown in Table 2 (corresponding isotopic patterns are depicted in Fig. S1 in supplemental information).

Table 2: Percentage of contamination calculated from the obtained isotope distribution by FT-ICR MS (a): $-NH_2$; (b): –OH. The grey columns required prior normalization of the relative abundances of the amide form ions ($A+1_{(a)}$ and $A+2_{(a)}$) according to calculations depicted in supplemental information (S1).

N°	Sequence	$A_{(b)} / A_{(a)}$	$A+1_{(b)} / A+1_{(a)}$	$A_{(b)} / A+1_{(a)}$	$A+1_{(b)} / A+2_{(a)}$	Average	Standard deviation	RSD
1	IFAVLGA	29.1	32.4	32.5	34.5	32.1	2.2	7 %
2	GILFAVA	5.1	5.3	5.2	6.1	5.4	0.4	8 %
3	FDAVAIA	53.5	55.9	58.1	59.3	56.7	2.6	5 %
4	AGVDNFG	10.3	10.5	11.0	11.5	10.8	0.5	5%
5	APIAGFV	0.7	-	0.9	-	0.8	0.1	18 %
6	IVAVLGA	25.1	29.1	28.7	31.8	28.7	2.8	10 %
7	FPCEAFA	11.1	13.3	12.3	11.6	12.1	0.9	8%
8	FFAVAIA	72.1	70.1	77.8	78.2	74.5	4.1	5 %
9	LAVGIAE	5.4	5.7	5.6	5.9	5.6	0.2	4 %
10	LAVTAIA	41.9	48.5	48.8	48.4	46.9	3.3	7 %
11	LAVAIAS	6.4	7.0	6.6	7.3	6.8	0.4	6%
12	LAVGIAW	0.4	-	0.5	-	0.45	0.1	16 %
13	LAVGIAR	1.4	3.1	1.4	3.3	2.3	1.0	45 %

For verification purposes, it is also possible to estimate peptide contamination from different ions of the isotopic clusters. As for A ions, $(A+1)_{(a)}$ and $(A+1)_{(b)}$ ion intensities of amidated and carboxylated sequences issued from ^{13}C contribution can be directly compared to obtain a percentage of the hydrolyzed form. Furthermore, since all isotopologues of both isotopic patterns are well separated, comparison of A(b) ion intensity (^{12}C contribution) of the carboxylated peptide with the $A+1_{(a)}$ ion intensity (^{13}C contribution) of the amidated form can be performed. In that case, it is necessary to convert the $A+1_{(a)}$ ion intensity to the relative abundance of the related $A_{(a)}$ ion through the following relation, A+1(^{13}C contribution)/A(^{12}C contribution) = n_{carbon} x 1.1% (see calculations S1 in supplemental information) in order to perform a direct comparison with the $A_{(b)}$ ion intensity. Applying this calculation also to the ratio of $A+1_{(b)}/A+2_{(a)}$ normalized ion intensities, we obtained different percentages of contamination of the amidated peptide by the hydrolyzed product. The minor differences observed for the various calculations may be due to repulsive interactions between ions of close gyration values but with very different quantities in the ICR cell (such as A ion compared to A+1 or A+2 ions), affecting ion intensity and resolution along the isotopic patterns. To obtain a global result of the C-terminal amidated peptide contamination, an average of all ratios is thus carried out from all gathered results (see Table 2). Noteworthy, if the amidated peptide sequence contains a glutamine or an asparagine residue (like for peptide n◦4a in Table 1), the amide function present on their side-chain can also be hydrolyzed. From a mass spectrometric point of view, hydrolysis of the amide function from C-terminal part or from the lateral side-chain leads to two regioisomers with the same elemental composition. In order to validate this straightforward strategy, the FTICR MS data were compared with results recorded with UV detection from liquid chromatography and capillary electrophoresis. Thus, reckoning on orthogonal separations, the relative quantifications made from the ion intensities of the isotopic clusters of the two compounds can be confronted to the relative or absolute quantifications deduced from UV traces.

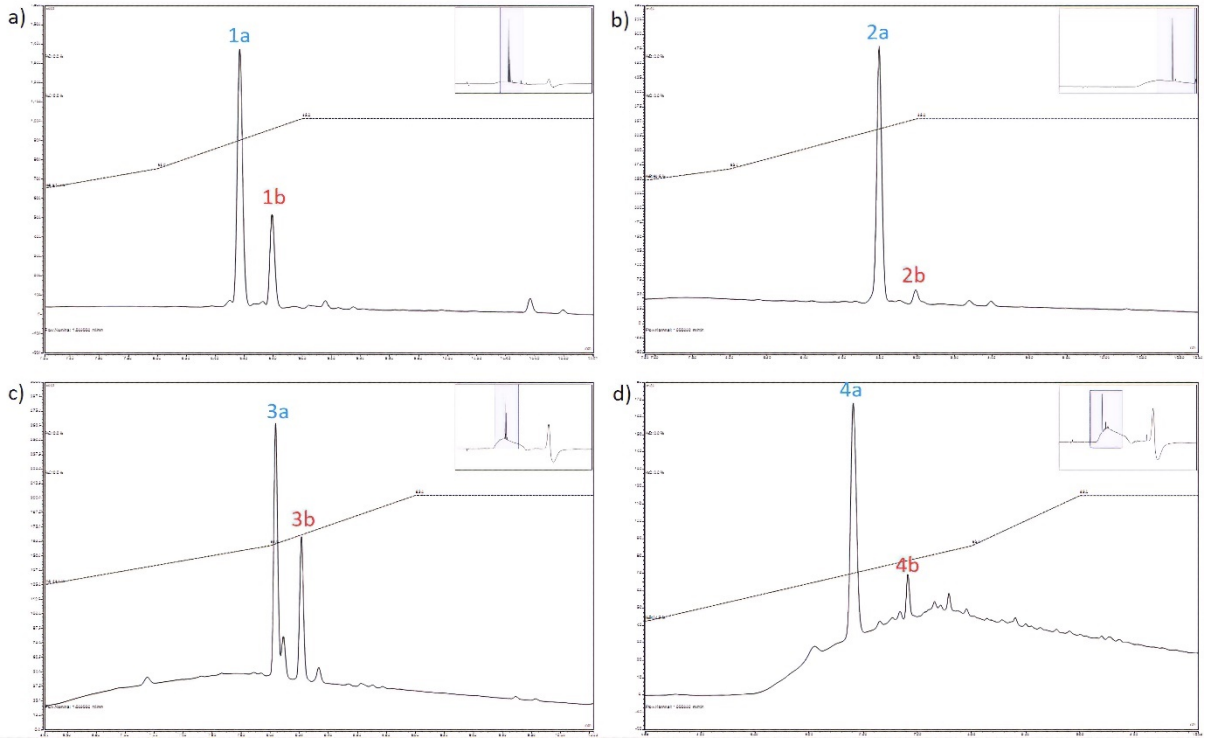
3.1.2 HPLC

Liquid chromatography is the most common analytical method used in the pharmaceutical industry for the analysis of therapeutic peptides in order to detect and quantify impurities [19]. Among the available LC modes based on different separative principles, for instance ion exchange (IEC), size exclusion (SEC), hydrophilic interaction (HILIC), as well as reversed-phase HPLC (RPLC), the latter constitutes the most common choice for peptides separation [20]. Thanks to hydrophobic interactions with the silica stationary phase grafted with apolar aliphatic chains (generally C18 or more rarely shorter chains (C8 C4, …)), peptides are separated according to their size and polarity [20]. Amidated and carboxylated peptides have relatively similar physico-chemical properties, which implies developing specific methods to separate them. In this perspective, four pairs of peptides presenting different amino acid compositions were selected to represent as many therapeutic peptides as possible (n° 1 to 4 in Table 1). The goal of such method was therefore to separate the carboxylated peptide resulting from the amidated peptide hydrolysis in order to both detect and quantify this degradation product.

In this perspective, different eluents (phosphate buffer pH 7.0, formic acid buffer pH 3.0, H_2O with different percentage of trifluoroacetic acid (TFA) (0.01, 0.05, 0.1 v/v)) were tested with different columns presenting different stationary phases (from classical C18 to cyano grafting), particle sizes or lengths (see Material and Methods). In parallel, several acetonitrile gradients were experimented. From these tests, it was concluded that a C18 column combined with H2O 0.05 % TFA provided the

best results for the four analyzed peptides (n°1 to 4 in Table 1) for quantification of the hydrolyzed product as shown in Figure 2.

Figure 2: Amidated peptides chromatograms contaminated by their carboxylated forms : a) peptide n°1 ; b) peptide n°2 ; c) peptide n°3 ; d) peptide n°4 in Table 1.



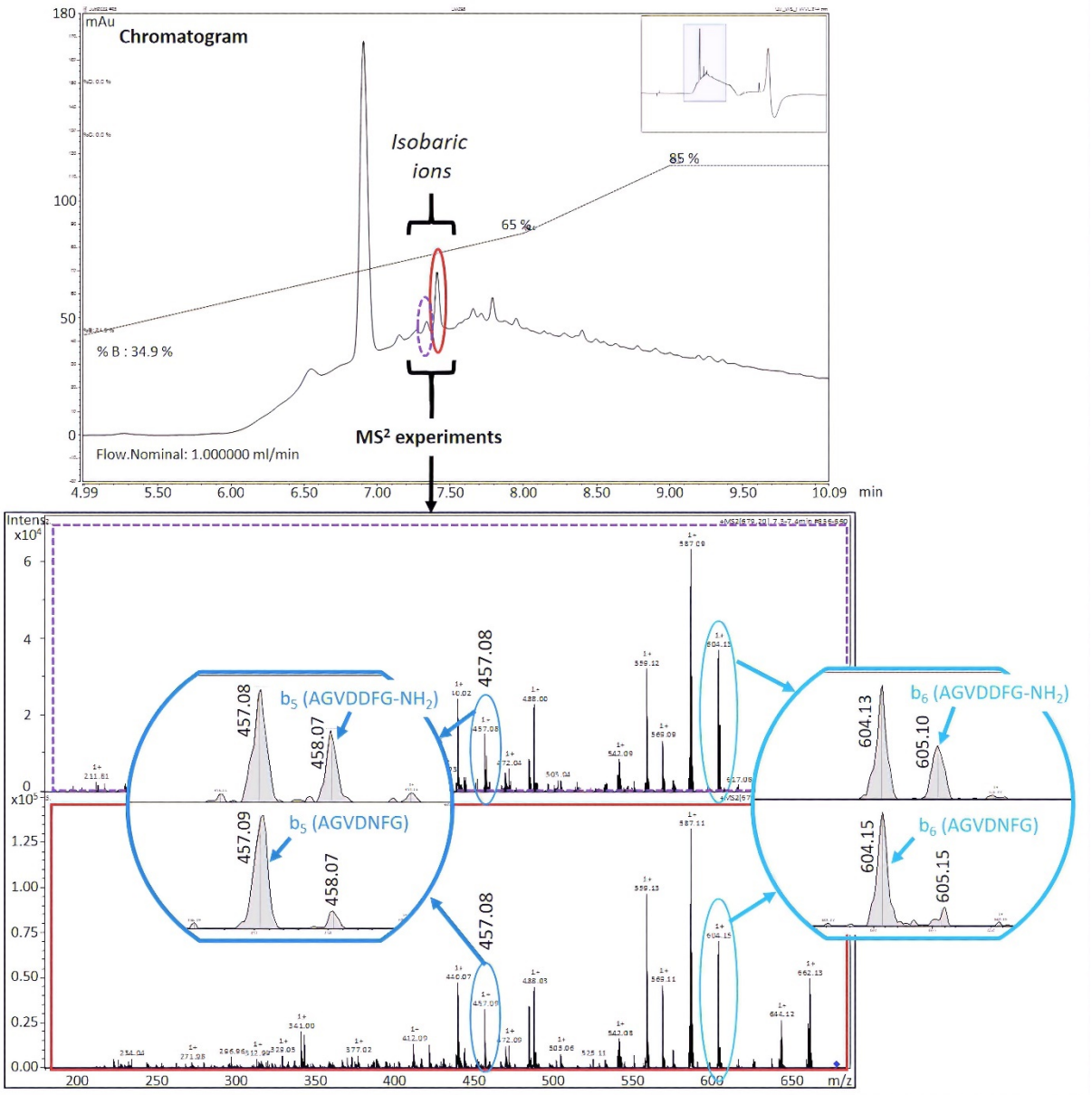
Moreover, a relative quantification can be directly estimated from peptides areas issued from chromatograms since amidated and carboxylated peptides have the same absorption coefficient at 214 nm (C-terminal function has no impact on the absorption at this wavelength). Therefore, peptide degradation was evaluated by performing a straightforward area ratio of the C-terminal carboxylated peptide signal towards the one of the corresponding amidated form leading to hydrolysis rate values listed in Table 3.

Table 3: Hydrolysis estimation rate by liquid chromatography compared to UHRMS results

Peptide n°	% hydrolysis LC-UV	% hydrolysis FT-ICR	Comparison difference
1	33.2	32.1	1.1 %
2	5.4	5.4	0 %
3	58.5	56.7	1.8 %
4	9.5	10.8	1.3 %

In the specific case of peptides showing C-terminal and lateral amide functions (see peptide 4a in Table 1), separation conditions must be optimized (by creating a plateau in the gradient for example) to differentiate the hydrolysis products, with a single or both amide functions being modified (Figure 3).

Figure 3: Results of MS^2 experiments of isobaric ions present under two distinct chromatographic peaks, resulting from hydrolysis of the C-terminal amide function for one and hydrolysis of side chain amide function for the other.



Not surprisingly, it was difficult to clearly separate the peptide exhibiting one carboxylic acid function and one amide moiety switching their respective positions at the C-terminus or within the lateral pendant chain (for instance, AGVDNFG with amide function on the side-chain and the carboxylic acid at the end / AGVDDFG-NH_2 with the carboxylic acid on the side-chain and amide function at the end). As stated previously, tandem mass spectrometry allows to sequence both isomeric peptides meaning that the coupling of the LC system compulsory to an MS/MS instrument is required to solve this analytical issue [21,22]. Other LC-MS experiments were conducted on peptide n°1 to 3 in Table 1 to identify molecules present in samples (see Figure S2 in supplemental information).

On the whole, comparing the proportion of hydrolysis recorded in LC-UV and UHRMS experiments gave an average difference between the two data sets of ~1 %. Such result, which was obtained following extensive development of the liquid chromatography method, thus confirmed the adequacy

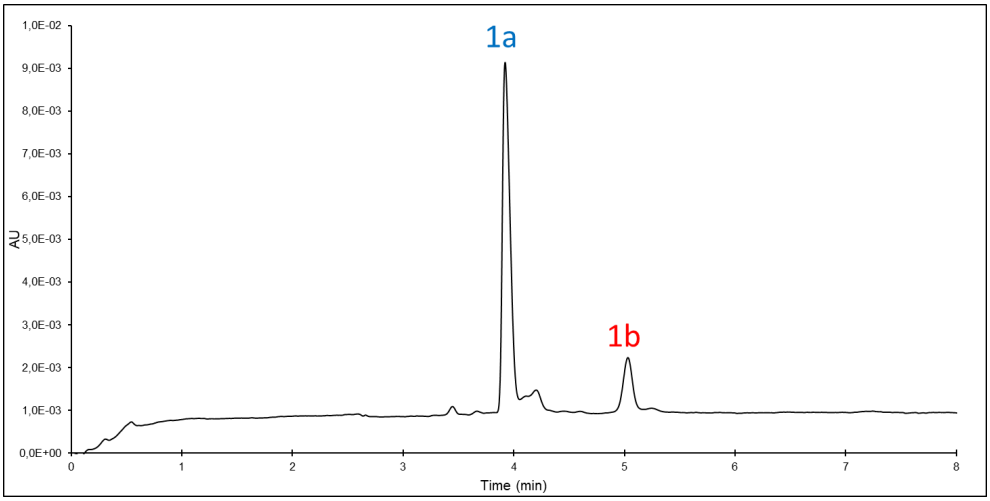
of relative quantification performed in UHRMS according to ion intensities measurements. Assumption that ionization efficiency was very similar for C-terminal amidated and carboxylated peptides that sustained the MS-based protocol was thus confirmed.

3.1.3 CE

In complement to the results obtained by RPLC, capillary electrophoresis can also be used, particularly well-suited for peptides [23]. This separative technique exploiting molecules charge differences is mainly employed to differentiate native and post-translational modified peptide sequences [24] presenting different pI [25–30]. As the studied amidated and carboxylated peptides exhibit different isoelectric points (see Table 1), CE is a relevant analytical choice to separate them. Similarly to LC, there are several modes of analysis in CE, based on separation by sequence length, charge, hydrophobicity… [30]. Capillary zone electrophoresis (CZE), where analytes are separated according to their charge/hydrodynamic radius ratio, is the most frequently used separation mode to analyze peptides [30–32]. Electrophoretic mobility depends on different factors such as the analyte itself (charge, sequence length, shape), but also possible interactions with the components of the background electrolyte (BGE) used for analysis [30]. Indeed, analysis sensitivity and selectivity directly rely on the composition of the BGE, its pH and ionic strength (IS) [24]. The majority of CZE peptide analyses is performed at acidic pH (around pH 2-3) to protonate all basic functions, that are numerous in such biomolecules [33]. As shown in Table 1, all pI calculated for the studied peptides are above 3 meaning that a BGE at pH < 3 induces a positive global charge for all amidated and carboxylated sequences [32]. Considering this, several buffer compositions such as phosphate or citrate (pKa= 2.14 / 7.20 / 12.32 and pKa = 3.13 / 4.76 / 6.40 respectively) at different pH level (3, 5, 7) and ionic strength (25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM) were tested to separate the two C-carboxylated and C-amidated sequences with the best compromise between selectivity, sensitivity and analysis time. Peptide n°1a in Table 1 was used to develop the analytical method. 25 mM IS citrate buffer pH 3.0 of was found to provide the best performance. Moreover, capillary was coated with a neutral polymer (polyethylene oxide (PEO)) in order to reduce possible peptide adsorption on capillary wall and improve analysis repeatability [23,31,33,34]. Figure 4 displays the electrophoregram of peptide n°1a in Table 1 showing amidated and hydrolyzed peptide separation. Owing to this dynamic coating, the migration times were constant with relative standard deviation (RSD) lower than 2%. Moreover, we were interested in extracting from all recorded electrophoregrams the corrected areas (areas of detected signals divided by the migration time). They also exhibited steady values with a maximum RSD of 19.9% measured for the lowest peptide concentrations (10^{-5}M).

Thereafter, this experimental protocol was applied to the analyses of other studied peptides listed in Table 1 (N°2-4, see Figure S3 in supplemental information). CZE displayed less efficient performances than separation by RPLC of peptides n°2 to 4 in Table 1. Unfortunately, the results were not as significant as for peptide n°1a as LC-UV results for these peptides. The presence of a carboxylic acid function in the side-chain of D (peptides n°3 and 4 in Table 1) affected the overall separation efficiency due to very similar pI values (enlarged signals, perturbed baseline separation for expected peptides and their impurities). In view of these results, BGE composition should be customized for each peptide couple to obtain optimal separation suitable to quantify the hydrolyzed product.

Figure 4: Electrophoregram of peptide n°1a in Table 1



Once the optimal analytical method is obtained, CE can be used as a control method of peptide purity. In this perspective, relative quantification with the aforementioned developed method has been investigated for the separation of peptides 1 and 1a in Table 1. Contamination of C-terminal amidated peptide n°1a by C-terminal carboxylated peptide n°1b in Table 1 is estimated at 34 % according to analyses of the amidated sequence at 5.10^{-4}M. If we compare this percentage of C-terminal function hydrolysis of peptide 1a in Table 1 to the results obtained from LC-UV and UHRMS, there is only 0.8 and 3.9 % difference between the three presented methods, respectively. Again, this confirmed the feasibility of direct relative quantification method by UHRMS.

3.2 Comparaison of separative methods vs ICR

To detect and quantify degradation products that could alter α-amidated peptide efficiency such as hydrolyzed peptide, several methods can be used. Among them, reversed phase liquid chromatography and capillary zone electrophoresis are the most widespread separative methods to analyze peptides. Both are based on the different physicochemical properties of C-terminal amidated and carboxylated peptides. In terms of detection, results obtained are different due to the UV path length which is smaller in the case of CZE. The latter detect concentrations at a minimum 100 times more concentrated than the LoD of RPLC method for peptide 1b in Table 1. This constraint requires customization of the analytical method for CZE, in addition to the constraint of the BGE nature, which has a great impact on the quality of the amidated and carboxylated peptides separation. However, contrary to liquid chromatography method, capillary electrophoresis consumes few sample volume (nL compared to µL for LC), which can be interesting if the sample volume is small. Nevertheless, the lower sensitivity of LC and CE is not a prohibitive problem in quality control since the concentration of the samples can be modified as desired from the base material. Highly concentrated samples can be injected in order to saturate the optical density of the interest product, and increase the intensities of degradation products peaks in parallel.

The major strength of both separative techniques relies in their capacity to perform an absolute quantification from the recorded UV traces. Provided that both compounds of interest are well distinguished, it is possible to estimate the percentage of the hydrolyzed product since the amidated and carboxylated peptides have the same absorption coefficient at 214 nm (wavelength of the peptide

skeleton amide function absorption). Importantly, two significant limitations must be considered. First of all, a standard sample of the pure impurity must be available to unambiguously assign the detected peaks for quantification. Otherwise, the preparation of such carboxylated peptide implies to spend time and resources on this synthetic step prior to analyses. Indeed, although C-terminal amidated peptides can be efficiently prepared thanks to microwave assisted SPPS synthesis, carboxylated sequences require more attention. The C-terminal residue must be first manually attached to the solid phase support prior to automated chain elongation. Besides, owing to the potent formation under heating of side-products such as diketopiperazine or aspartimide, protocols at room temperature with specific activation agents are required providing on the whole rather time-consuming synthetic process. Second, obtaining an appropriate separation of the two closely related structures may cost a lot of time in method development, especially upon CE separation as stated before. At last but not least, the constraints of the availability of the side-product to monitor remains the same for absolute as well as relative UV quantification.

In contrast to separative techniques coupled to UV detection, mass spectrometry can only perform relative quantification with the recourse to an internal isotopically labeled standard. Nevertheless, in the context of our study, relative quantitation can be directly realized without the need of a quantification standard since the ionization yield of C-terminal amidated and carboxylated peptides are assumed identical. In another word, one peptide stands for the internal standard of the other one allowing comparison of ion intensities on the MS spectrum for estimation of their respective amounts. The analysis is very fast (direct sample injection into the ion source, no coupling with separative method required) and the direct inspection of the MS data gives the expected contamination ratio with a high confidence even at trace level (less than 1% of contamination detected in FT-ICR measurements). The major point of concern to apply such simple protocol deals with the necessity to work under ultra-high resolution to separate the isotopologues within the two isotopic clusters. Such technology, based on instruments equipped with an FT-ICR or an OrbitrapTM mass analyzer, is very expensive with a limited access to non-expert scientists.

To position the advantages and drawbacks of LC-UV, CE-UV and UHRMS performance in the frame of C-terminal amidated/carboxylated peptides relative quantification, many important features were considered. Sample and solvent consumption, analysis time, cost of the overall process together with the method sensitivity and capacity to detect trace of contamination were evaluated as shown in Table 4.

Table 4: Comparative table of the different analytical methods

	UHRMS	**RPLC**	**CZE**
Sample volume consumed	Few µL	Few µL	Few nL
Solvent	None (direct injection)	Yes	Few
Total analysis time	Few seconds	22 min	15 min
Standard required (hydrolyzed peptide)	None	Yes	Yes
Cost	High	Low	Low

Sample consumption is rather low for the three methods, whereas mass spectrometry flow injection analysis (FIA) analyses has the advantage to be nearly solvent free and very rapid compared to LC and CE. The preparation time prior to analysis is also reduced because no special solutions such as BGE in CZE are needed to perform it. Moreover, high sensitivities were achieved in UHRMS allowing to detect very low percentages of contamination, despite the few µL injected (see Table 4). Contrary to CZE for which conditions of analysis developed for one peptide cannot be transposed to another one, UHRMS measurement conducted on FT-ICR MS instrument has the advantage to be suitable to any peptides whatever its amino acid composition and length.

4. Conclusion

After calibration of the UHRMS instrument, 17 C-terminal amidated peptides were analyzed in 1.5 days in order to unambiguously detect and quantify hydrolyzed peptides. These results were verified following development of LC-UV and CE-UV methods. The use of UHRMS allowed the fast detection of trace amounts of hydrolysis, down to 1% contamination with good reliability. Despite the several advantages in term of analysis time, sensitivity and versatility of the UHRMS method, FT-ICR MS instruments are among other things expensive and difficult to operate being therefore quite rare in pharmaceutical laboratories. There is hence a compromise to be made between a rapid straightforward, very sensitive FT-ICR MS relative quantification of high cost applicable to any peptide and more accessible well-mastered RPLC-UV and CZE-UV technologies but of limited performance in terms of trace contamination detection and overall time of method development.

Acknowledgement

Financial support from the IR INFRANALYTICS FR-2054 CNRS for conducting the research is gratefully acknowledged.

References

[1] B.G. de la Torre, F. Albericio, Peptide Therapeutics 2.0, Molecules. 25 (2020) 2293. https://doi.org/10.3390/molecules25102293.

[2] B.G. de la Torre, F. Albericio, The Pharmaceutical Industry in 2020. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules, Molecules. 26 (2021) 627. https://doi.org/10.3390/molecules26030627.

[3] D.J. Craik, D.P. Fairlie, S. Liras, D. Price, The Future of Peptide-based Drugs: Peptides in Drug Development, Chemical Biology & Drug Design. 81 (2013) 136–147. https://doi.org/10.1111/cbdd.12055.

[4] S.K. Dubey, S. Parab, N. Dabholkar, M. Agrawal, G. Singhvi, A. Alexander, R.A. Bapat, P. Kesharwani, Oral peptide delivery: challenges and the way ahead, Drug Discovery Today. (2021) S1359644621000015. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.001.

[5] D. Mcgregor, Discovering and improving novel peptide therapeutics, Current Opinion in Pharmacology. 8 (2008) 616–619. https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.06.002.

[6] R. Kulathila, K.A. Merkler, D.J. Merkler, R. Kulathila, Enzymatic formation of C-terminal amides, Nat. Prod. Rep. 16 (1999) 145–154. https://doi.org/10.1039/a801346b.

[7] S.T. Prigge, A.S. Kolhekar, B.A. Eipper, R.E. Mains, L.M. Amzel, Amidation of Bioactive Peptides: The Structure of Peptidylglycine α-Hydroxylating Monooxygenase, Science. 278 (1997) 1300–1305. https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1300.

[8] B.A. Eipper, D.A. Stoffers, R.E. Mains, The Biosynthesis of Neuropeptides: Peptide alpha-Amidation, Annu. Rev. Neurosci. 15 (1992) 57–85. https://doi.org/10.1146/annurev.ne.15.030192.000421.

[9] S.T. Prigge, R.E. Mains, B.A. Eipper, L.M. Amzel* **, New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function:, CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1236–1259. https://doi.org/10.1007/PL00000763.

[10] B.A. Eipper, S.L. Milgram, E. Jean Husten, H.-Y. Yun, R.E. Mains, Peptidylglycine α -amidating monooxygenase: A multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains: Peptidylglycine α -amidating monooxygenase, Protein Science. 2 (1993) 489–497. https://doi.org/10.1002/pro.5560020401.

[11] H. Yamaguchi, K. Sasaki, Y. Satomi, T. Shimbara, H. Kageyama, M.S. Mondal, K. Toshinai, Y. Date, L.J. González, S. Shioda, T. Takao, M. Nakazato, N. Minamino, Peptidomic Identification and Biological Validation of Neuroendocrine Regulatory Peptide-1 and -2, Journal of Biological Chemistry. 282 (2007) 26354–26360. https://doi.org/10.1074/jbc.M701665200.

[12] T. Uhlig, T. Kyprianou, F.G. Martinelli, C.A. Oppici, D. Heiligers, D. Hills, X.R. Calvo, P. Verhaert, The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation, EuPA Open Proteomics. 4 (2014) 58–69. https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.05.003.

[13] Ph. Eur. 10.0, 0712 (07/2009), (n.d.).

[14] L. Andersson, L. Blomberg, M. Flegel, L. Lepsa, B. Nilsson, M. Verlander, Large-scale synthesis of peptides, Biopolymers. 55 (2000) 227–250. https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7.

[15] N.E. Robinson, A.B. Robinson, Molecular clocks, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (2001) 944–949. https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.944.

[16] H. Yang, R.A. Zubarev, Mass spectrometric analysis of asparagine deamidation and aspartate isomerization in polypeptides: General, ELECTROPHORESIS. 31 (2010) 1764–1772. https://doi.org/10.1002/elps.201000027.

[17] F. Bray, S. Flament, G. Abrams, D. Bonjean, K.D. Modica, C. Rolando, C. Tokarski, P. Auguste, Extinct species identification from Upper Pleistocene bone fragments not identifiable from their osteomorphological studies by proteomics analysis, Paleontology, 2020. https://doi.org/10.1101/2020.10.06.328021.

[18] V.N. Lapko, A.G. Purkiss, D.L. Smith, J.B. Smith, Deamidation in Human γS-Crystallin from Cataractous Lenses Is Influenced by Surface Exposure, Biochemistry. 41 (2002) 8638–8648. https://doi.org/10.1021/bi015924t.

[19] V. Vergote, C. Burvenich, C. Van de Wiele, B. De Spiegeleer, Quality specifications for peptide drugs: a regulatory-pharmaceutical approach, J. Pept. Sci. 15 (2009) 697–710. https://doi.org/10.1002/psc.1167.

[20] J.L. Lau, M.K. Dunn, Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 26 (2018) 2700–2707. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052.

[21] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 23 (1997) 3–25. 1, Advanced Drug Delivery Reviews. 46 (2001) 3–26. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0.

[22] M. Dupré, S. Cantel, J. Martinez, C. Enjalbal, Occurrence of C-Terminal Residue Exclusion in Peptide Fragmentation by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23 (2012) 330–346. https://doi.org/10.1007/s13361-011-0254-1.

[23] Z. Lian, N. Wang, Y. Tian, L. Huang, Characterization of Synthetic Peptide Therapeutics Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: Challenges, Solutions, Pitfalls, and Future Perspectives, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 32 (2021) 1852–1860. https://doi.org/10.1021/jasms.0c00479.

[24] L. Kang, N. Weng, W. Jian, LC–MS bioanalysis of intact proteins and peptides, Biomedical Chromatography. 34 (2020). https://doi.org/10.1002/bmc.4633.

[25] L. Mouls, G. Subra, J.-L. Aubagnac, J. Martinez, C. Enjalbal, Tandem mass spectrometry of amidated peptides, J. Mass Spectrom. 41 (2006) 1470–1483. https://doi.org/10.1002/jms.1118.

[26] E. Logerot, C. Enjalbal, Dissociation Pattern of Sodiated Amide Peptides as a Tool for De Novo Sequencing, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 31 (2020) 2328–2337. https://doi.org/10.1021/jasms.0c00269.

[27] L. Hajba, Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins, Trends in Analytical Chemistry. (2017) 7.

[28] P.G. Righetti, R. Sebastiano, A. Citterio, Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis, Proteomics. 13 (2013) 325–340. https://doi.org/10.1002/pmic.201200378.

[29] B. Sarg, K. Faserl, H.H. Lindner, Identification of Novel Site-Specific Alterations in the Modification Level of Myelin Basic Protein Isolated from Mouse Brain at Different Ages Using Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, Proteomics. 17 (2017) 1700269. https://doi.org/10.1002/pmic.201700269.

[30] K. Faserl, B. Sarg, V. Maurer, H.H. Lindner, Exploiting charge differences for the analysis of challenging post-translational modifications by capillary electrophoresis-mass spectrometry, J Chromatogr A. 1498 (2017) 215–223. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.086.

[31] K. Faserl, B. Sarg, P. Gruber, H.H. Lindner, Investigating capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of common post-translational modifications, Electrophoresis. 39 (2018) 1208–1215. https://doi.org/10.1002/elps.201700437.

[32] E. Dominguez-Vega, T. De Vijlder, E.P. Romijn, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry as a highly selective tool for the compositional and site-specific assessment of multiple peptide-deamidation, Analytica Chimica Acta. 982 (2017) 122–130. https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.021.

[33] A. Stolz, K. Jooß, O. Höcker, J. Römer, J. Schlecht, C. Neusüß, Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Instrumentation, methodology and applications, Electrophoresis. 40 (2019) 79–112. https://doi.org/10.1002/elps.201800331.

[34] V. Kašička, Capillary electrophoresis of peptides, Electrophoresis. 20 (1999) 3084–3105. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991001)20:15/16<3084::AID-ELPS3084>3.0.CO;2-4.

[35] D. Chen, E.N. McCool, Z. Yang, X. Shen, R.A. Lubeckyj, T. Xu, Q. Wang, L. Sun, Recent advances (2019-2021) of capillary electrophoresis-mass spectrometry for multilevel proteomics, Mass Spectrom Rev. (2021). https://doi.org/10.1002/mas.21714.

[36] M. Herrero, E. Ibañez, A. Cifuentes, Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics, Electrophoresis. 29 (2008) 2148–2160. https://doi.org/10.1002/elps.200700404.

[37] I. Messana, D.V. Rossetti, L. Cassiano, F. Misiti, B. Giardina, M. Castagnola, Peptide analysis by capillary (zone) electrophoresis, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 699 (1997) 149–171. https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00198-9.

[38] M. Dadouch, Y. Ladner, C. Perrin, Analysis of Monoclonal Antibodies by Capillary Electrophoresis: Sample Preparation, Separation, and Detection, Separations. 8 (2021) 4. https://doi.org/10.3390/separations8010004.

[39] Elodie Logerot, Guillaume Cazals, Antony Memboeuf, Christine Enjalbal, Revealing C-terminal peptide amidation by the use of the survival yield technique, Anal. Biochem. 655 (2022), 114823, https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114823.

b) Supplemental information

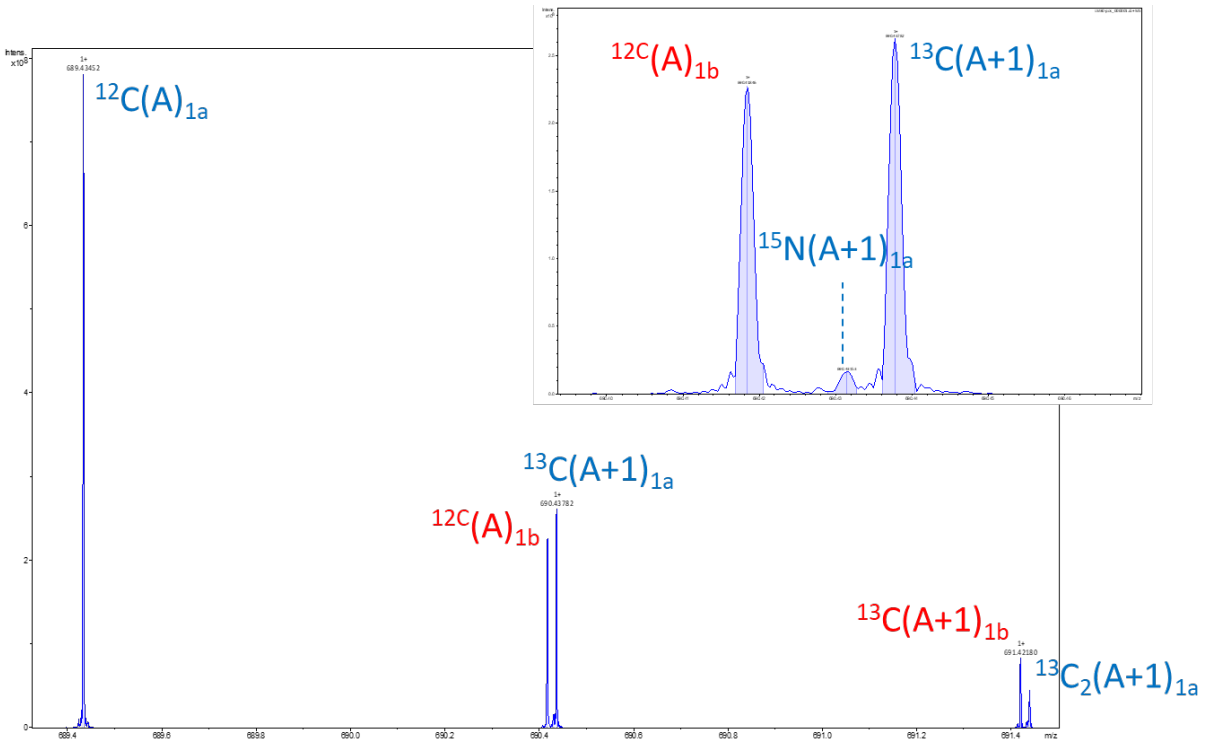
Figure S1: Isotopic patterns of amidated peptides in Table 1 obtained by UHRMS
242

Isotopic distribution of peptide n°1 in Table 1 242
Isotopic distribution of peptide n°2 in Table 1 243
Isotopic distribution of peptide n°3 in Table 1 243
Isotopic distribution of peptide n°4 in Table 1 244
Isotopic distribution of peptide n°5 in Table 1 244
Isotopic distribution of peptide n°6 in Table 1 245
Isotopic distribution of peptide n°7 in Table 1 245
Isotopic distribution of peptide n°8 in Table 1 246

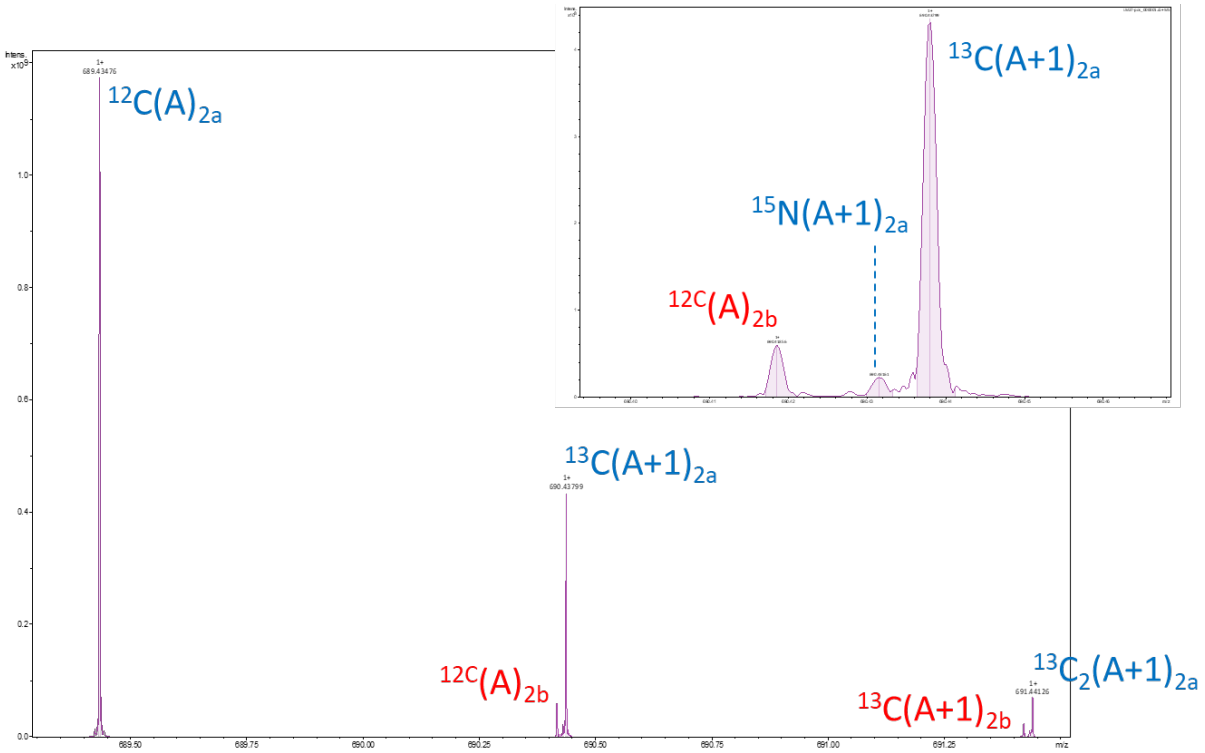
Isotopic distribution of peptide n°9 in Table 1 246
Isotopic distribution of peptide n°10 in Table 1 247
Isotopic distribution of peptide n°11 in Table 1 247
Isotopic distribution of peptide n°12 in Table 1 248
Isotopic distribution of peptide n°13 in Table 1 248
Calculations S1 249
Figure S2: LC-MS experiments of peptides n°1 to 3 in Table 1 249
a) Peptide n°1 in Table 1 contaminated by peptide n°1a 249
b) Peptide n°1 in Table 1 contaminated by peptide n°1a 250
c) Peptide n°1 in Table 1 contaminated by peptide n°1a 250
Figure S3: Electrophoregram of peptides n°2 to 4 in Table 1 251
a) Peptide n°2 in Table 1 contaminated by peptide n°2a 251
b) Peptide n°3 in Table 1 contaminated by peptide n°3a 251
c) Peptide n°4 in Table 1 contaminated by peptide n°4a 251

Figure S1: Isotopic patterns of amidated peptides in Table 1 obtained by UHRMS

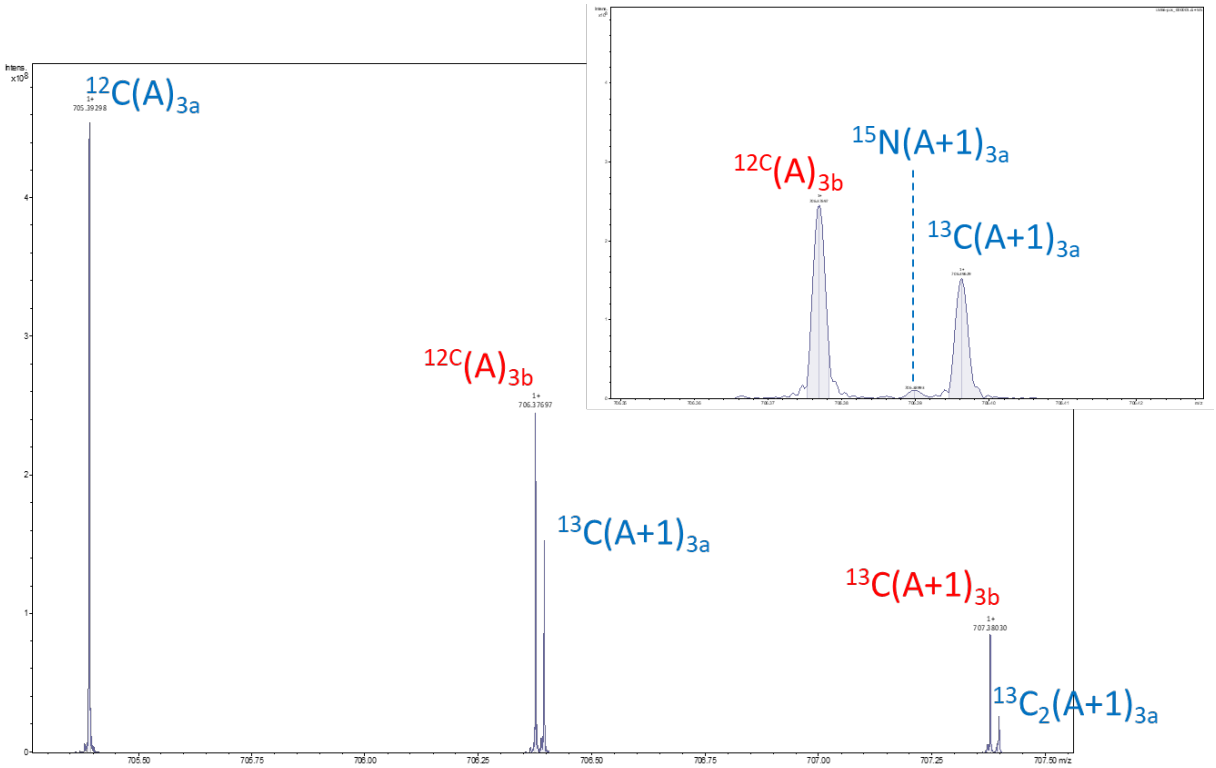
a) Isotopic distribution of peptide n°1 in Table 1



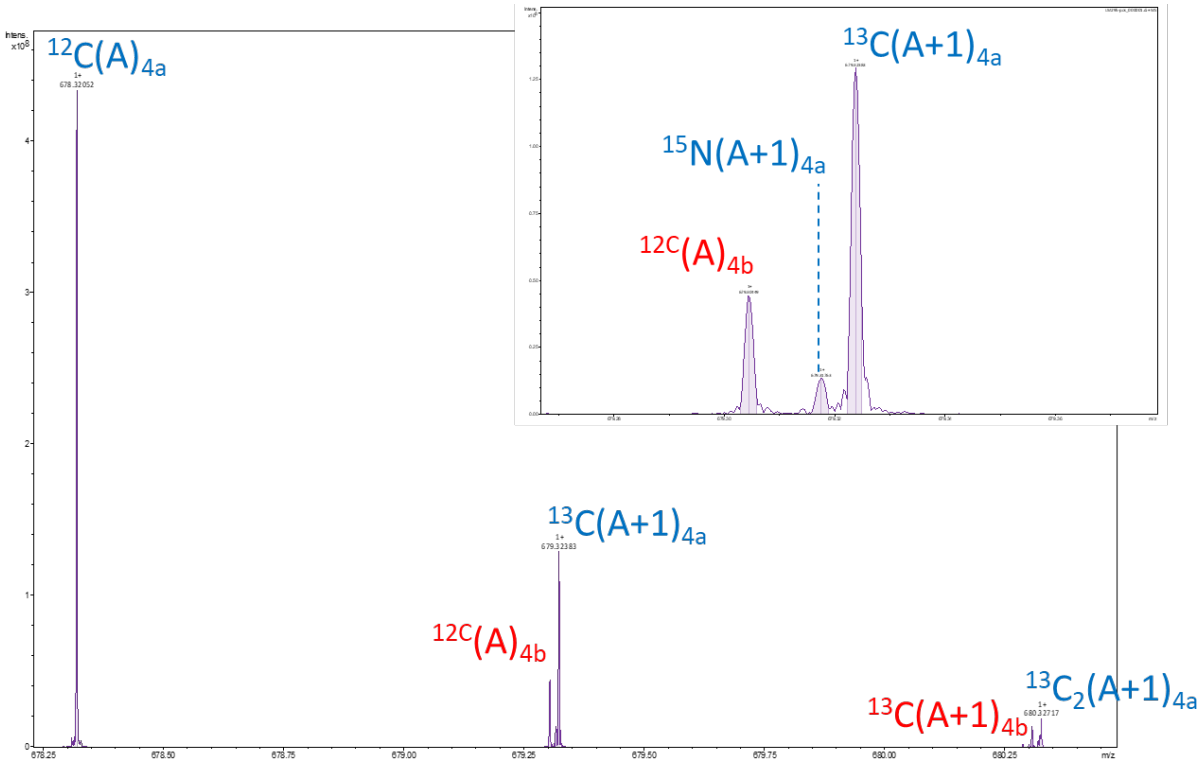
b) Isotopic distribution of peptide n°2 in Table 1



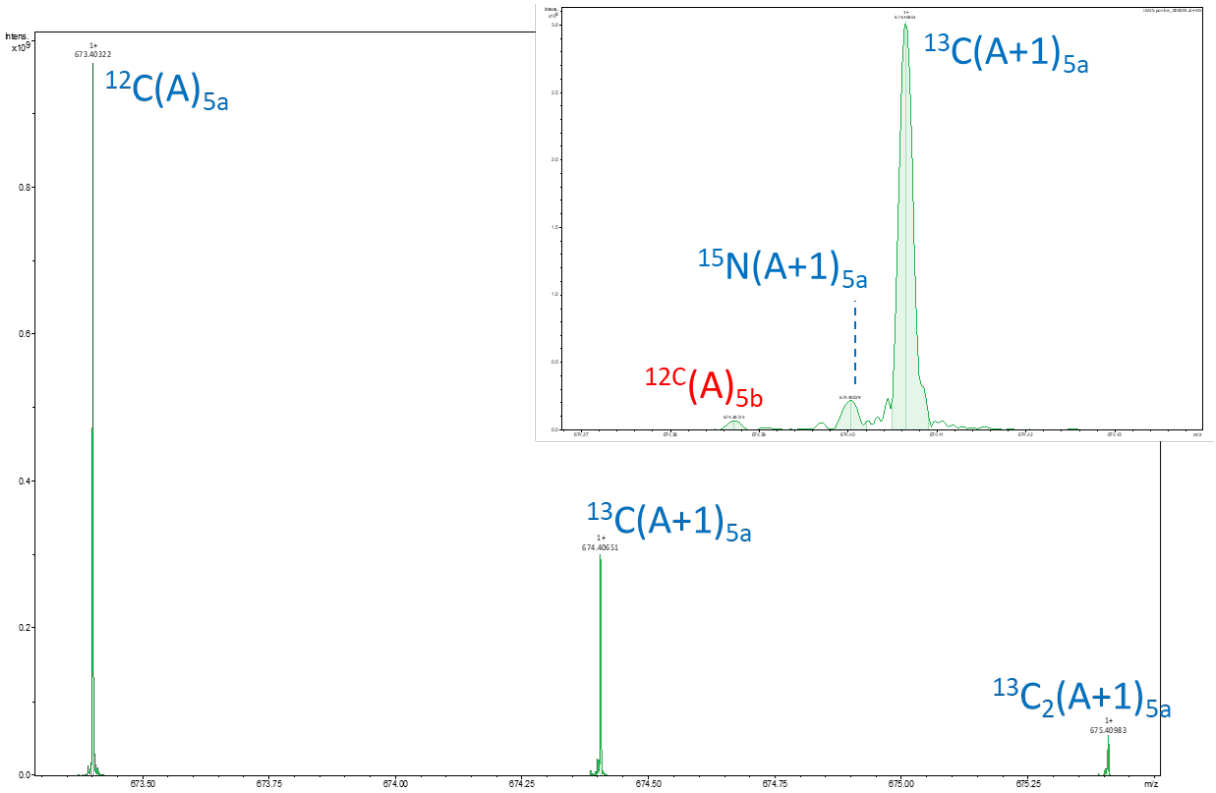
c) Isotopic distribution of peptide n°3 in Table 1



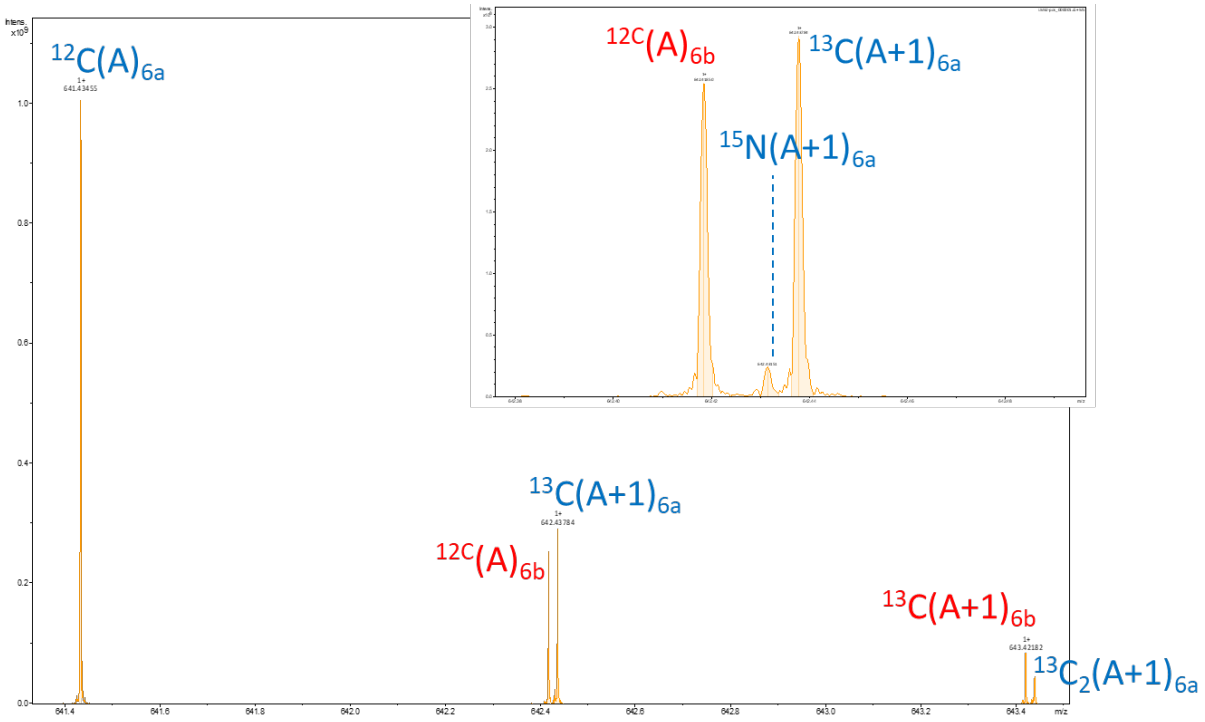
d) Isotopic distribution of peptide n°4 in Table 1



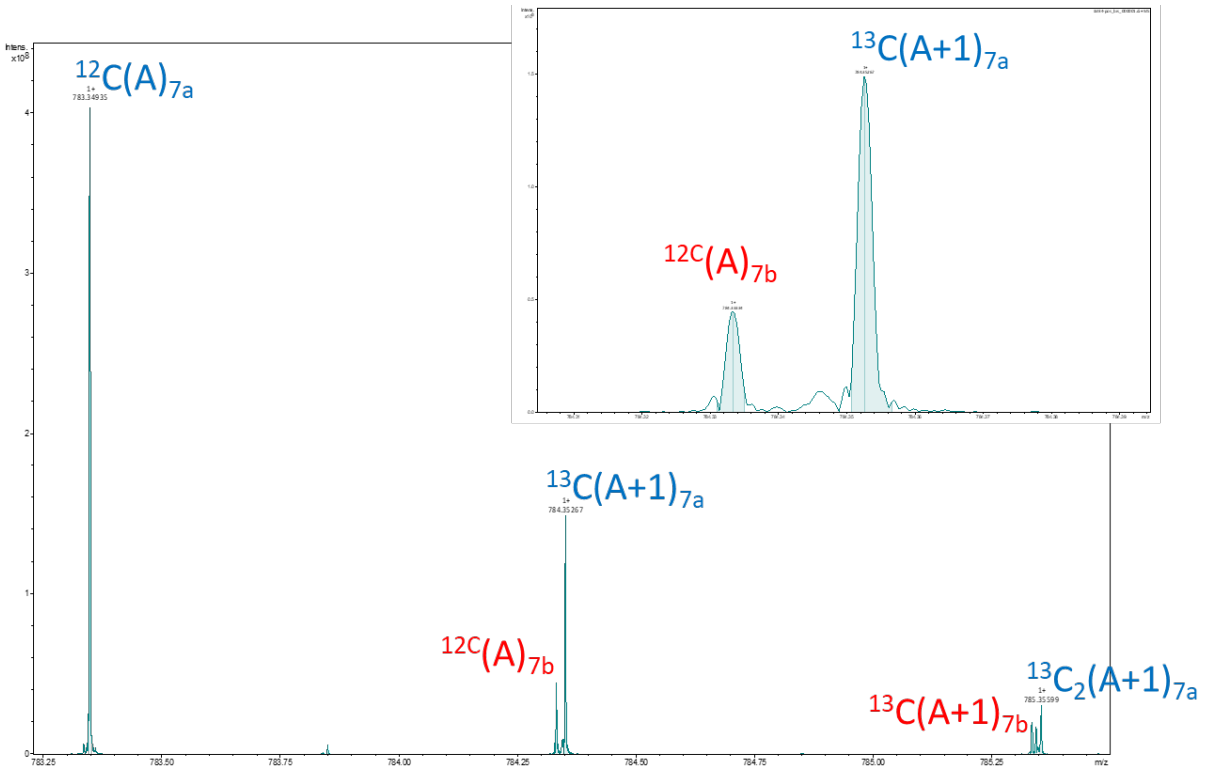
e) Isotopic distribution of peptide n°5 in Table 1



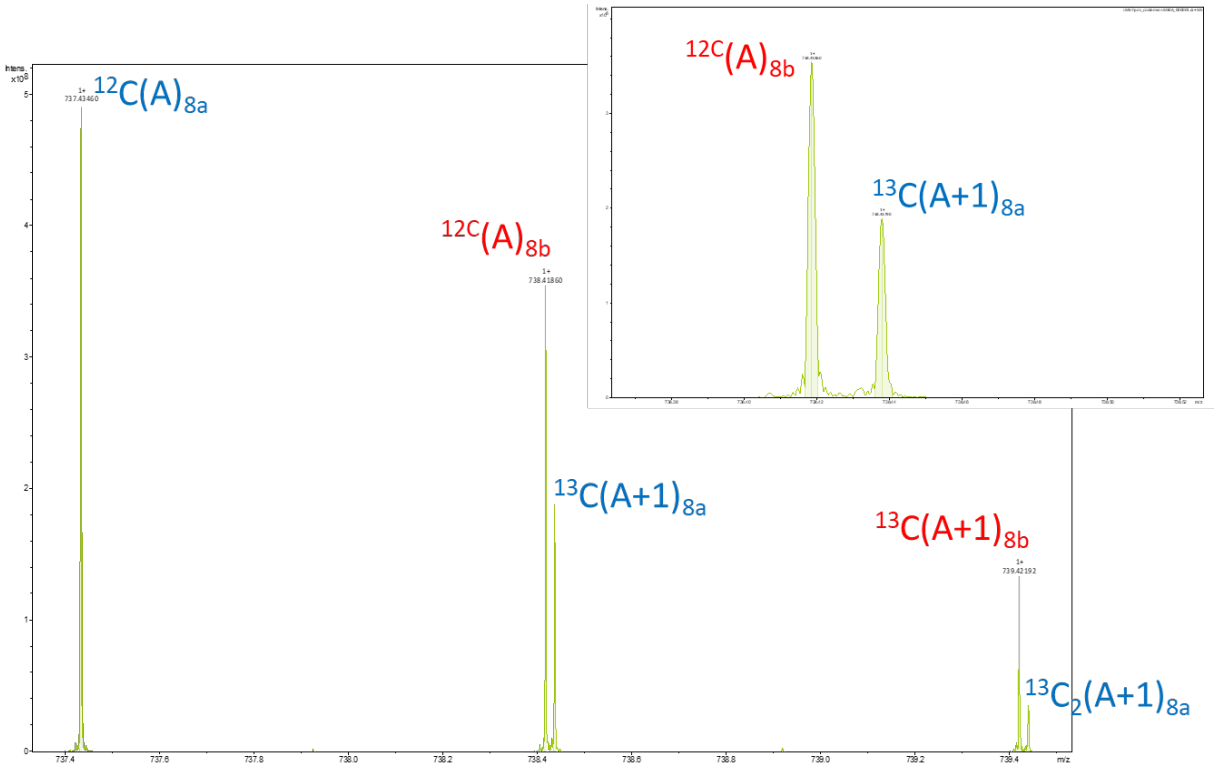
f) Isotopic distribution of peptide n°6 in Table 1



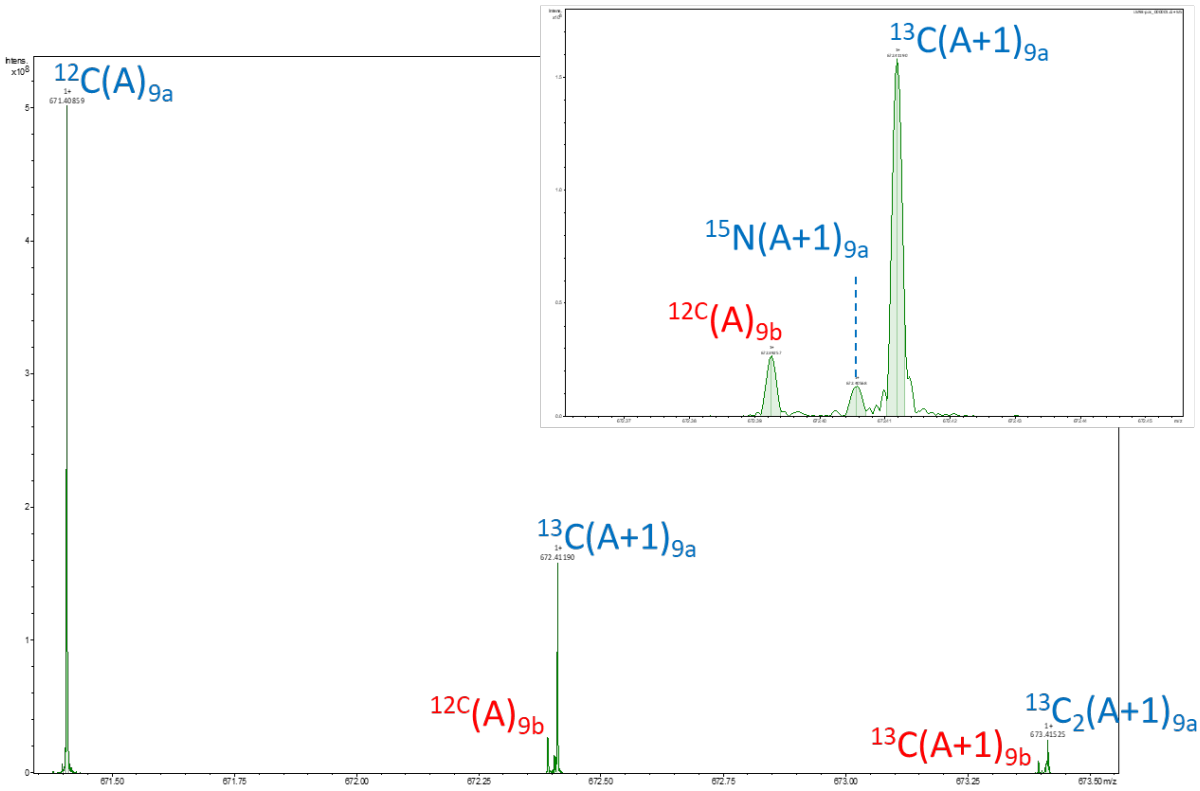
g) Isotopic distribution of peptide n°7 in Table 1



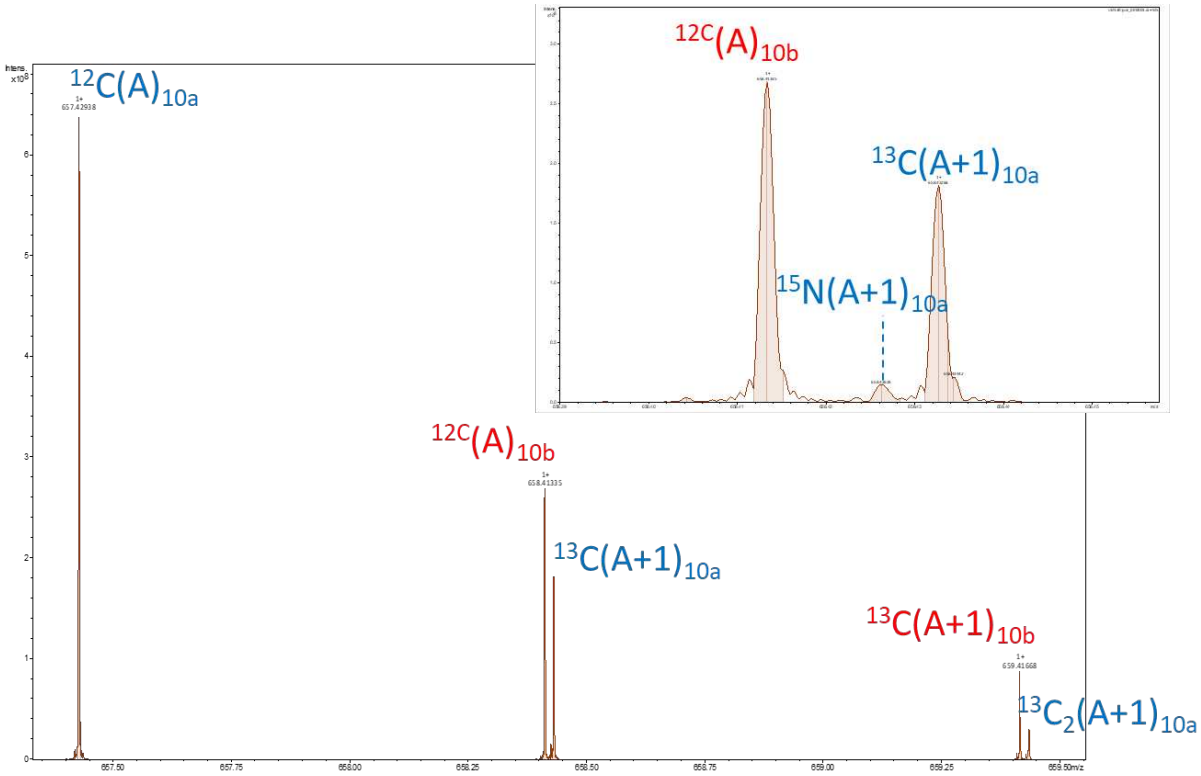
h) Isotopic distribution of peptide n°8 in Table 1



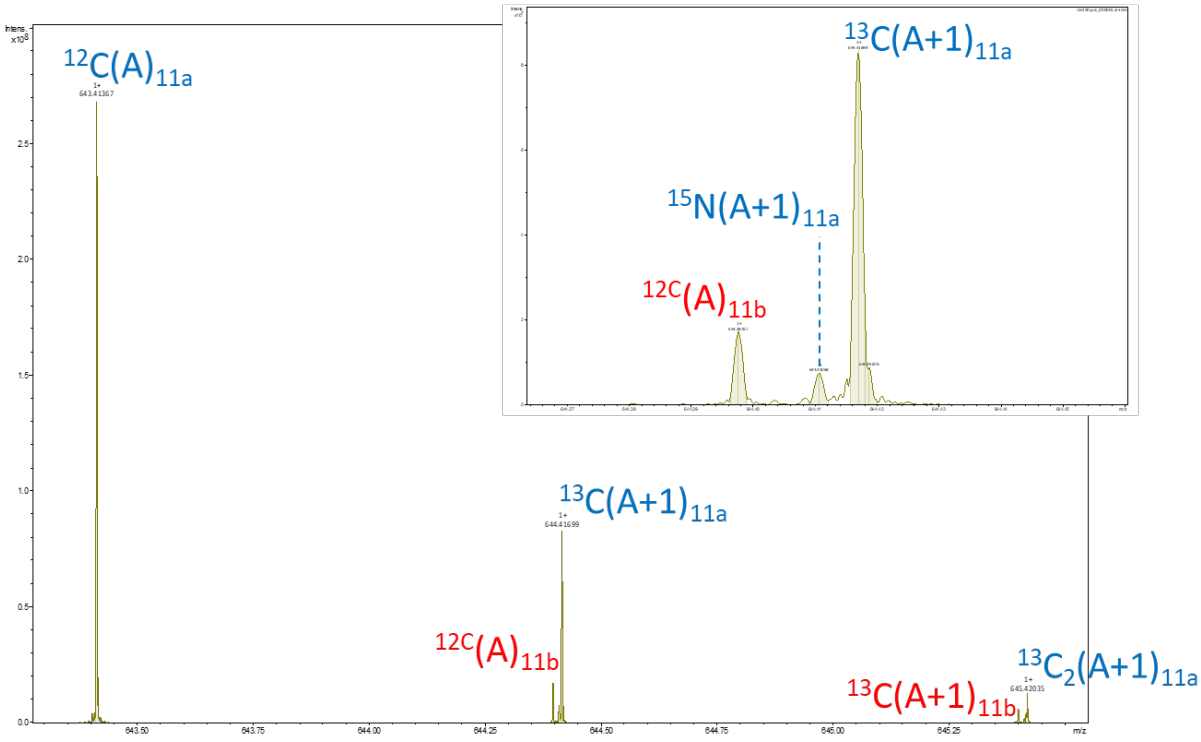
i) Isotopic distribution of peptide n°9 in Table 1



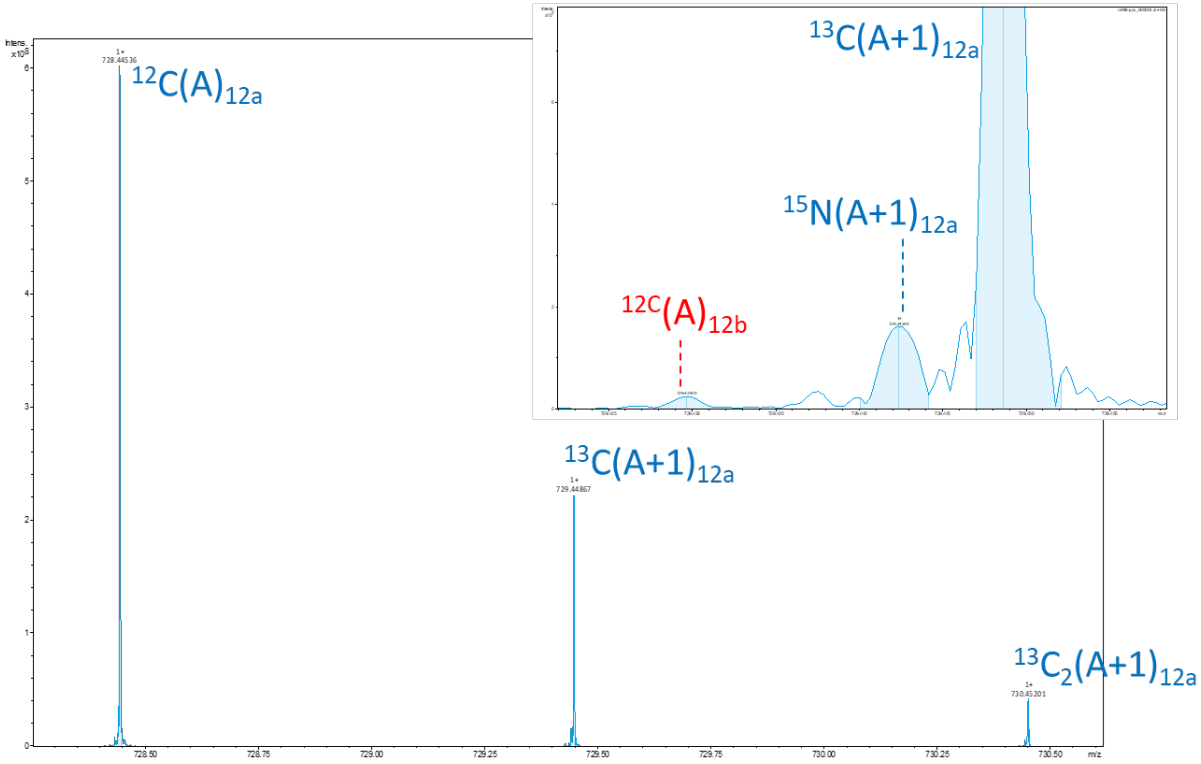
j) Isotopic distribution of peptide n°10 in Table 1



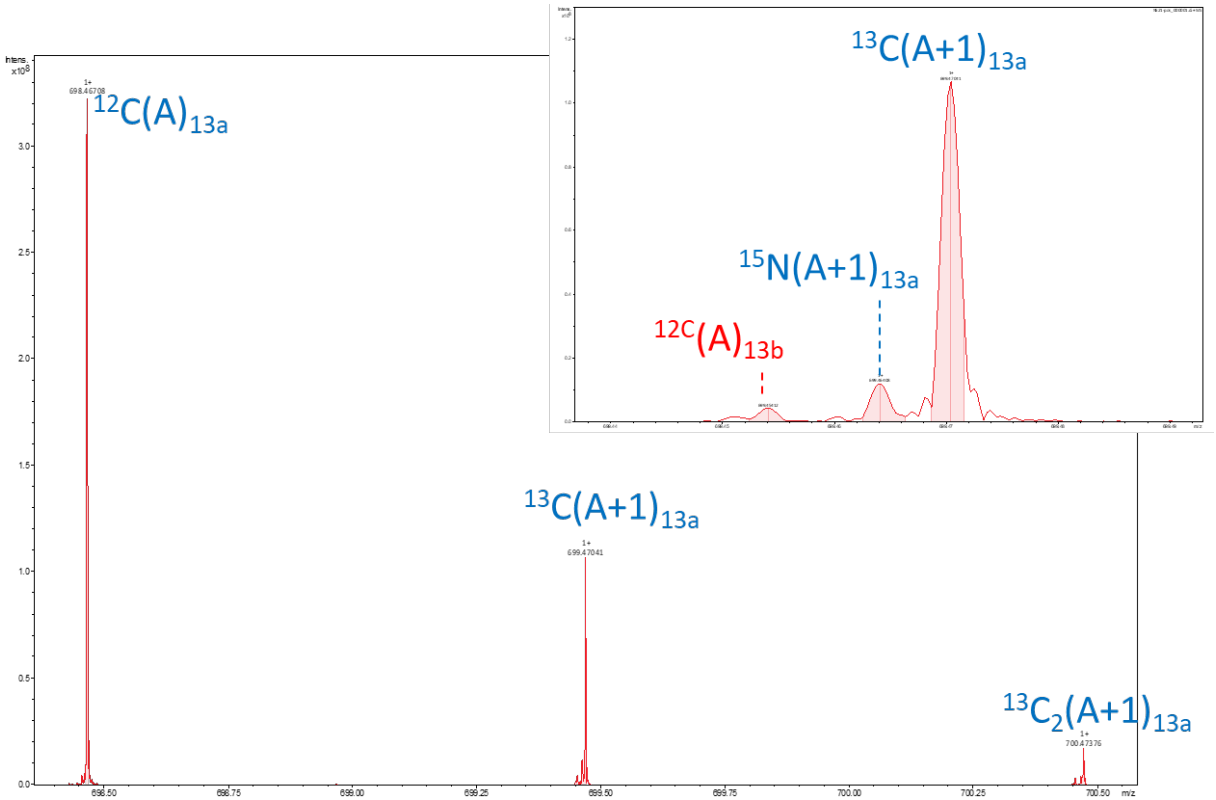
k) Isotopic distribution of peptide n°11 in Table 1



l) Isotopic distribution of peptide n°12 in Table 1



m) Isotopic distribution of peptide n°13 in Table 1

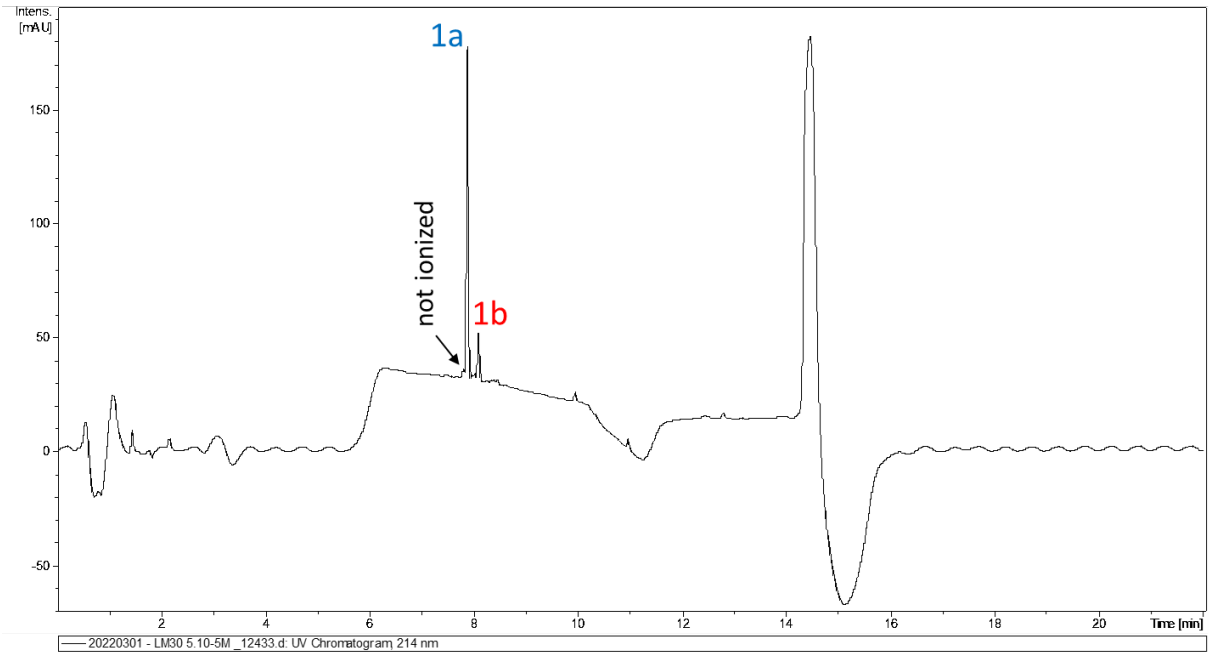


Calculations S1:

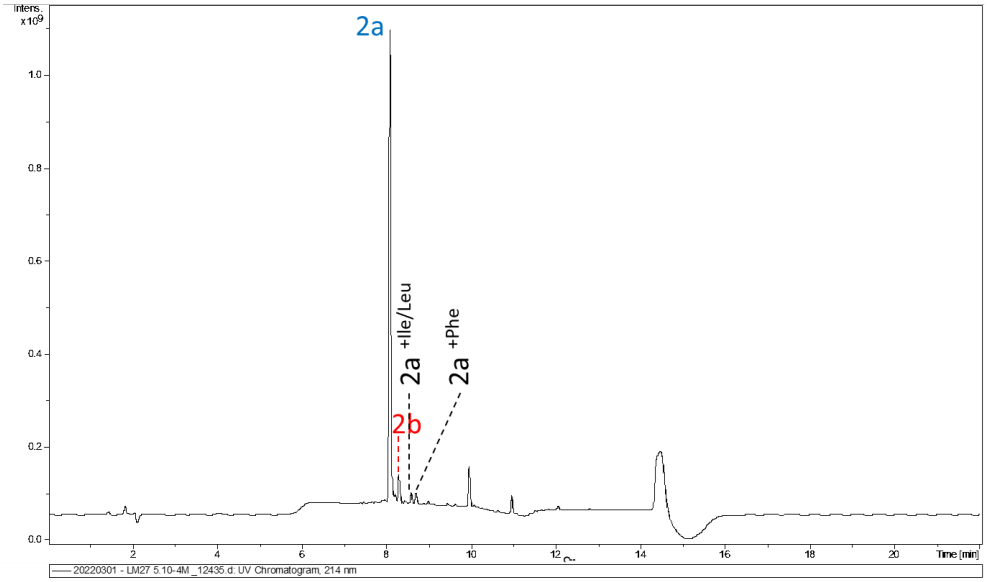
Here, isotope distributions are composed of three signals corresponding to the contributions of the stable carbon isotopes (^{12}C, ^{13}C and $^{13}C_2$). The relative abundances of these three signals are determined by considerations of the probability of presence of the heavy isotope for each carbon of the compound. The A ion is going to be the more abundant, it will therefore be normalized to 100% relative abundance. The A+1 ion contains the isotopic contribution of ^{13}C and the probability of having this heavy isotope per position is 1.1%. Concerning peptides 1a and 1b in Table 1, 34 carbon atoms are present in their sequences, thus 34 positions can be in heavy form resulting in a probability of 34 * 1.1% = 37.4 % to find a ^{13}C in the peptide sequence. In order to compare intensities of the A and A+1 ions respectively issued from carboxylated and amidated peptides, it is necessary to apply a corrective factor to the intensity of the A+1 amidated peptide ion which contains heavy isotope unlike the A carboxylated peptide ion. This correction factor is calculated from the probability of finding a ^{13}C in the peptide sequence, previously calculated, and allows to simulate the abundance of the A amidated peptide ion. To obtain it, the relative abundance of the A amidated peptide ion normalized to 100% is divided by the probability of finding ^{13}C in the peptide sequence (for peptide n°1a in Table 1 : 100 divided by 37.4). The intensity of the A+1 amidated peptide ion is then multiplied by the result in order to perform a new ratio with the intensity of the A carboxylated peptide ion to find the percentage of contamination. A similar calculation can be made from A+1 carboxylated peptide ion and A+2 amidated peptide ion.

Figure S2: LC-MS experiments of peptides n°1 to 3 in Table 1

a) Peptide n°1 in Table 1 contaminated by peptide n°1a



b) Peptide n°1 in Table 1 contaminated by peptide n°1a



c) Peptide n°1 in Table 1 contaminated by peptide n°1a

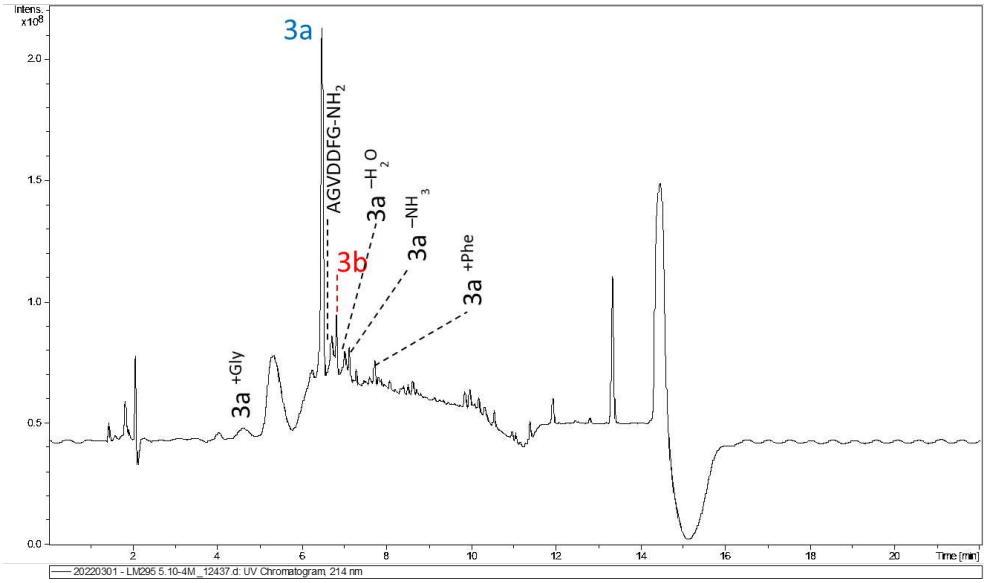
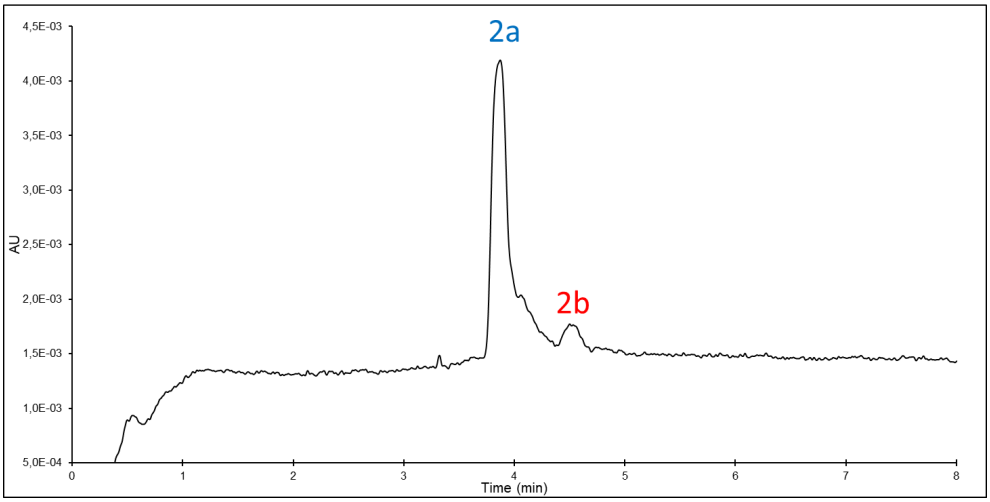
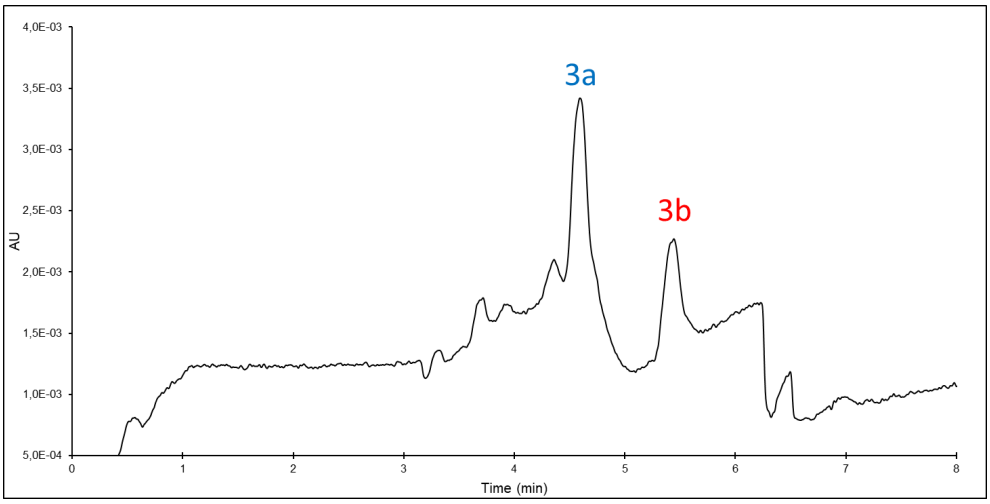


Figure S3: Electrophoregram of peptides n°2 to 4 in Table 1

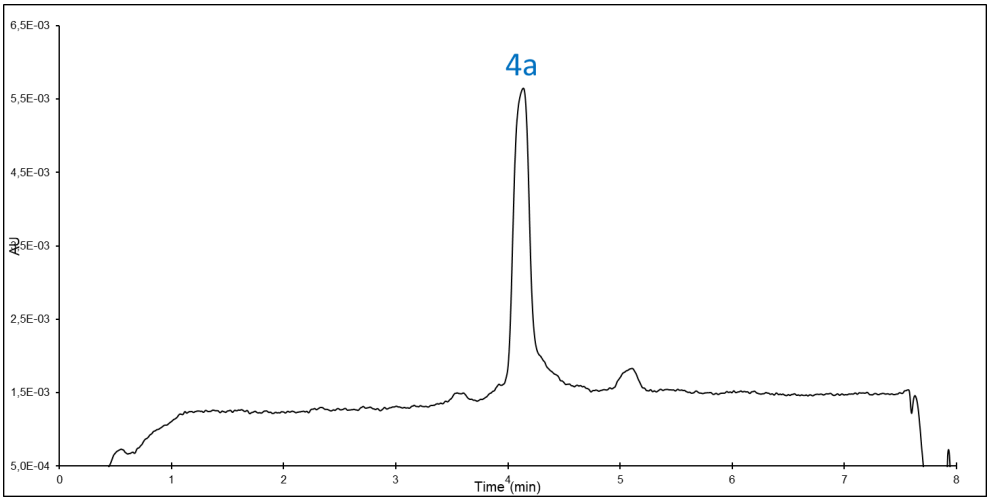
a) Peptide n°2 in Table 1 contaminated by peptide n°2a



b) Peptide n°3 in Table 1 contaminated by peptide n°3a



c) Peptide n°4 in Table 1 contaminated by peptide n°4a



3) Références

1. Domalain V, Tognetti V, Hubert-Roux M, et al. Role of Cationization and Multimers Formation for Diastereomers Differentiation by Ion Mobility-Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2013;24(9):1437-1445. doi:10.1007/s13361-013-0690-1

2. Jeanne Dit Fouque K, Garabedian A, Porter J, et al. Fast and Effective Ion Mobility–Mass Spectrometry Separation of D -Amino-Acid-Containing Peptides. *Anal Chem*. 2017;89(21):11787-11794. doi:10.1021/acs.analchem.7b03401

3. Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. *The EMBO Journal*. 1985;4(6):1609-1614. doi:10.1002/j.1460-2075.1985.tb03825.x

4. Harding MM, Nowicki MW, Walkinshaw MD. Metals in protein structures: a review of their principal features. *Crystallography Reviews*. 2010;16(4):247-302. doi:10.1080/0889311X.2010.485616

5. Dilger JM, Valentine SJ, Glover MS, Ewing MA, Clemmer DE. A database of alkali metal-containing peptide cross sections: Influence of metals on size parameters for specific amino acids. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2012;330-332:35-45. doi:10.1016/j.ijms.2012.05.001

6. Dilger JM, Valentine SJ, Glover MS, Clemmer DE. A Database of Alkaline-Earth-Coordinated Peptide Cross Sections: Insight into General Aspects of Structure. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2013;24(5):768-779. doi:10.1007/s13361-013-0579-z

7. Kohtani M, Kinnear BS, Jarrold MF. Metal-Ion Enhanced Helicity in the Gas Phase. *J Am Chem Soc*. 2000;122(49):12377-12378. doi:10.1021/ja002485x

8. Wu C, Klasmeier J, Hill, HH. Atmospheric pressure ion mobility spectrometry of protonated and sodiated peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13(12):1138-1142. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19990630)13:12<1138::AID-RCM625>3.0.CO;2-8

9. Wu C, Siems WF, Klasmeier J, Hill HH. Separation of Isomeric Peptides Using Electrospray Ionization/High-Resolution Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem*. 2000;72(2):391-395. doi:10.1021/ac990601c

10. Flick TG, Campuzano IDG, Bartberger MD. Structural Resolution of 4-Substituted Proline Diastereomers with Ion Mobility Spectrometry via Alkali Metal Ion Cationization. *Anal Chem*. 2015;87(6):3300-3307. doi:10.1021/ac5043285

11. Pang X, Jia C, Chen Z, Li L. Structural Characterization of Monomers and Oligomers of D-Amino Acid-Containing Peptides Using T-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017;28(1):110-118. doi:10.1007/s13361-016-1523-9

12. Jockusch RA, Price WD, Williams ER. Structure of Cationized Arginine (Arg·M $^{+}$, M = H, Li, Na, K, Rb, and Cs) in the Gas Phase: Further Evidence for Zwitterionic Arginine. *J Phys Chem A*. 1999;103(46):9266-9274. doi:10.1021/jp9931307

13. Cerda BA, Wesdemiotis C. Zwitterionic vs. charge-solvated structures in the binding of arginine to alkali metal ions in the gas phase. *Analyst*. 2000;125(4):657-660. doi:10.1039/a909220j

14. Kish MM, Ohanessian G, Wesdemiotis C. The Na+ affinities of α-amino acids: side-chain substituent effects. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2003;227(3):509-524. doi:10.1016/S1387-3806(03)00082-4

15. Cerda BA, Wesdemiotis C. The Relative Copper(I) Ion Affinities of Amino Acids in the Gas Phase. *J Am Chem Soc*. 1995;117(38):9734-9739. doi:10.1021/ja00143a017

16. Cerda BA, Cornett L, Wesdemiotis C. Probing the interaction of alkali and transition metal ions with bradykinin and its des-arginine derivatives via matrix-assisted laser desorption/ionization and postsource decay mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 1999;193(2-3):205-226. doi:10.1016/S1387-3806(99)00164-5

17. Lee VWM, Li H, Lau TChu, Guevremont R, Michael Siu KW. Relative silver(I) ion binding energies of α-amino acids: A determination by means of the kinetic method. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1998;9(8):760-766. doi:10.1016/S1044-0305(98)00051-8

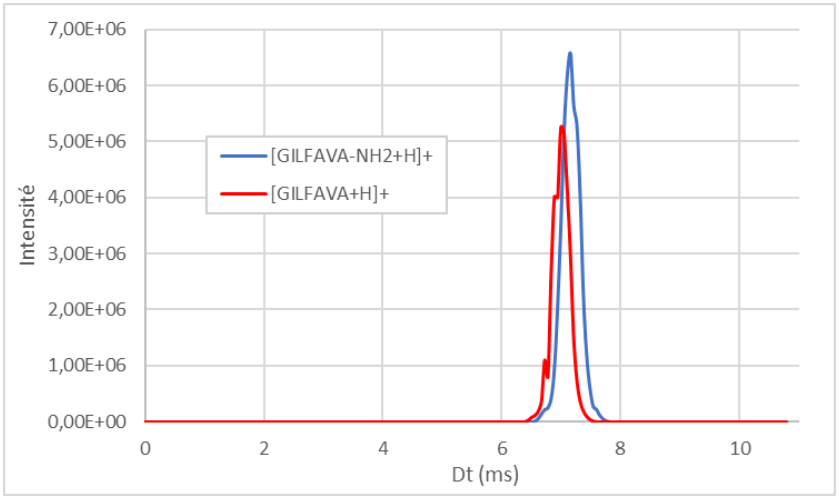
18. Morsa D, Gabelica V, De Pauw E. Effective Temperature of Ions in Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry. *Anal Chem*. 2011;83(14):5775-5782. doi:10.1021/ac201509p

19. Merenbloom SI, Flick TG, Williams ER. How Hot are Your Ions in TWAVE Ion Mobility Spectrometry? *J Am Soc Mass Spectrom*. 2012;23(3):553-562. doi:10.1007/s13361-011-0313-7

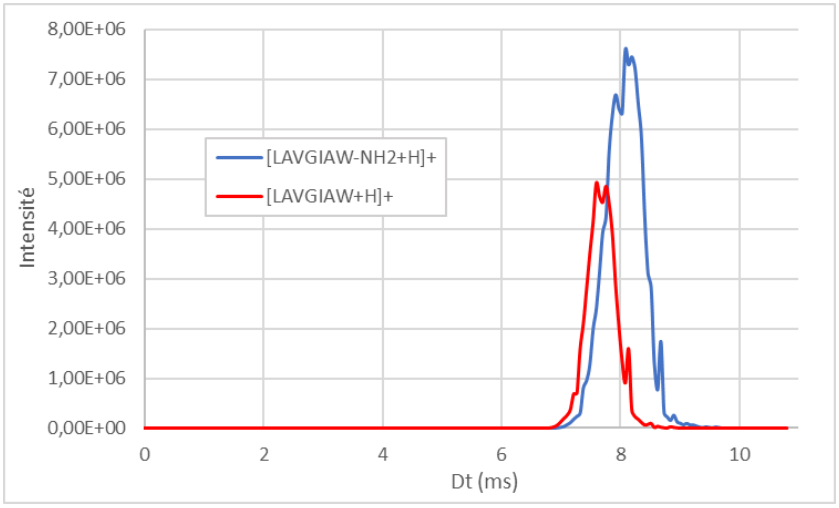
4) Annexes

Annexe 3-1.1 : Expériences de mobilité sur les couples de peptides amides et acides du Tableau 1 sous forme protonée

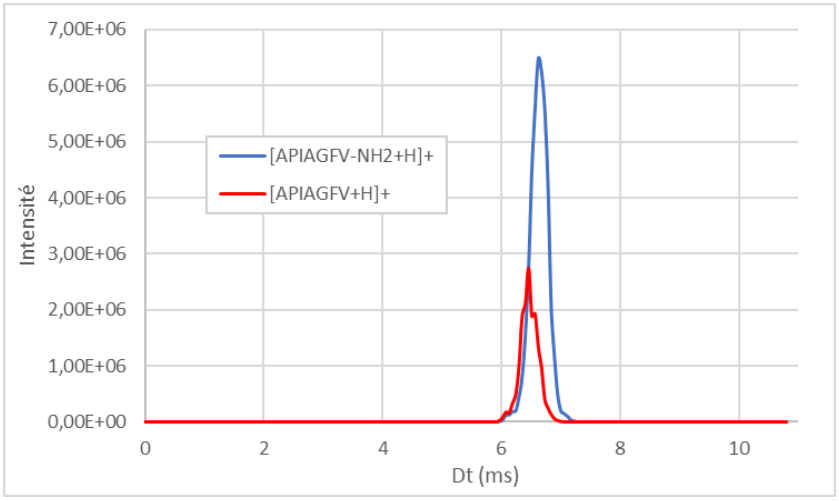
Peptides 1a et 1b (GILFAVA)



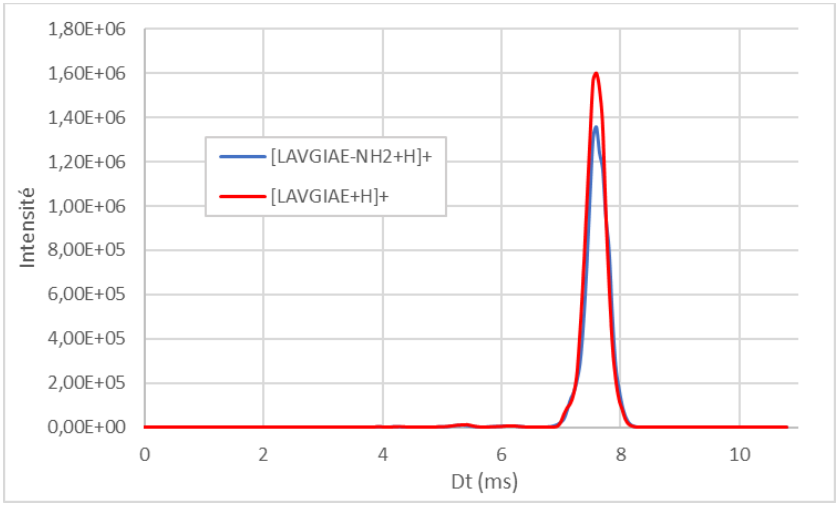
Peptides 2a et 2b (LAVGIAW)



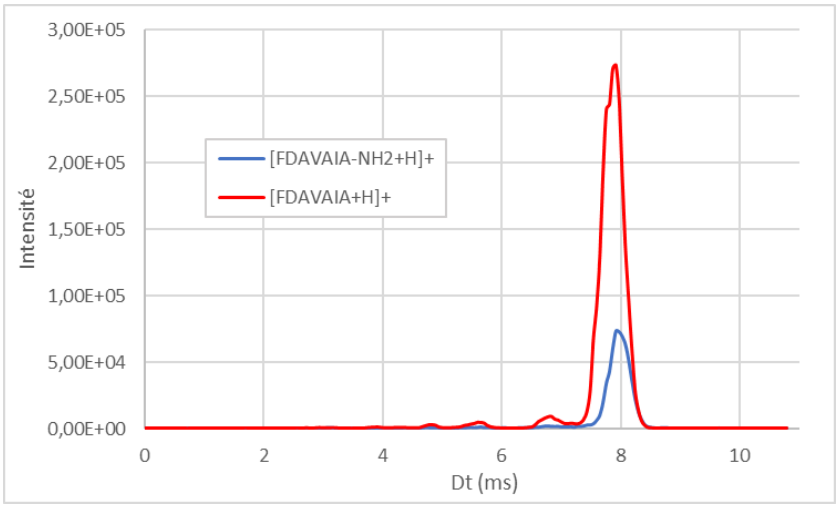
Peptides 3a et 3b (APIAGFV)



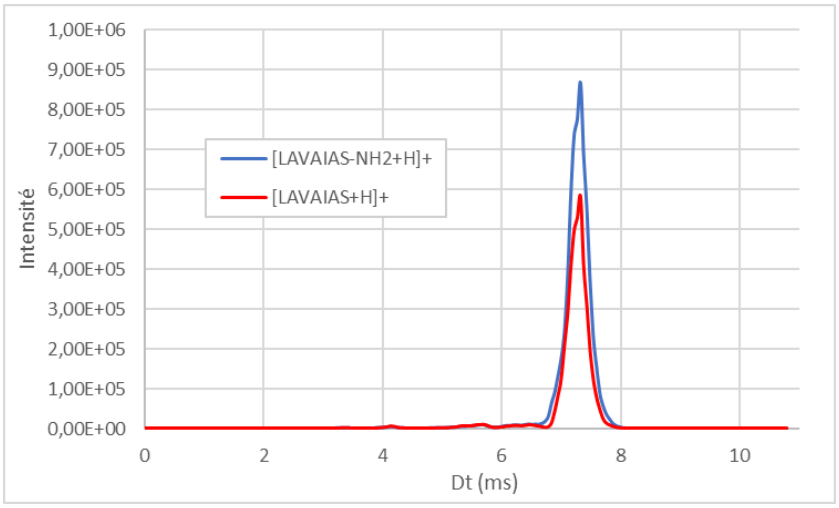
Peptides 4a et 4b (LAVGIAE)



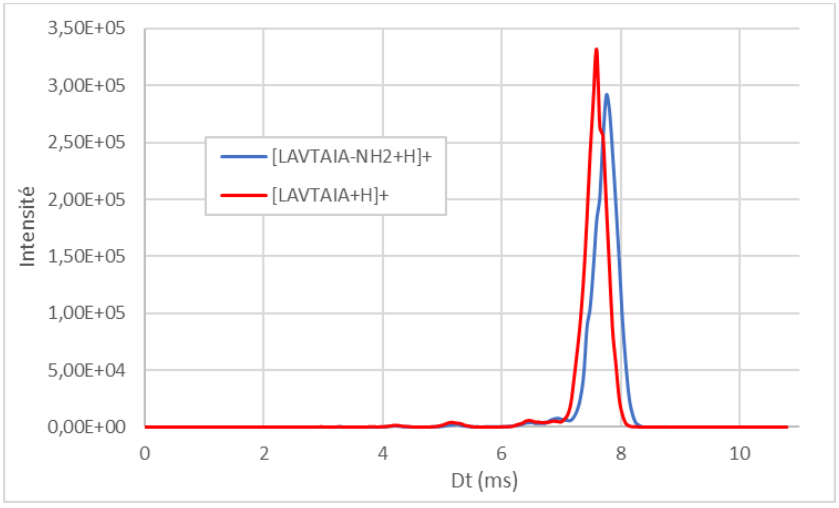
Peptides 5a et 5b (FDAVAIA)



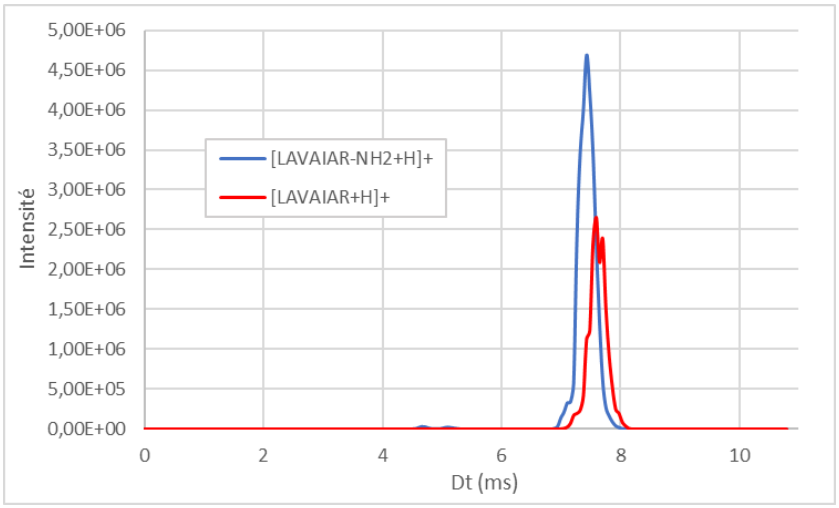
Peptides 6a et 6b (LAVAIAS)



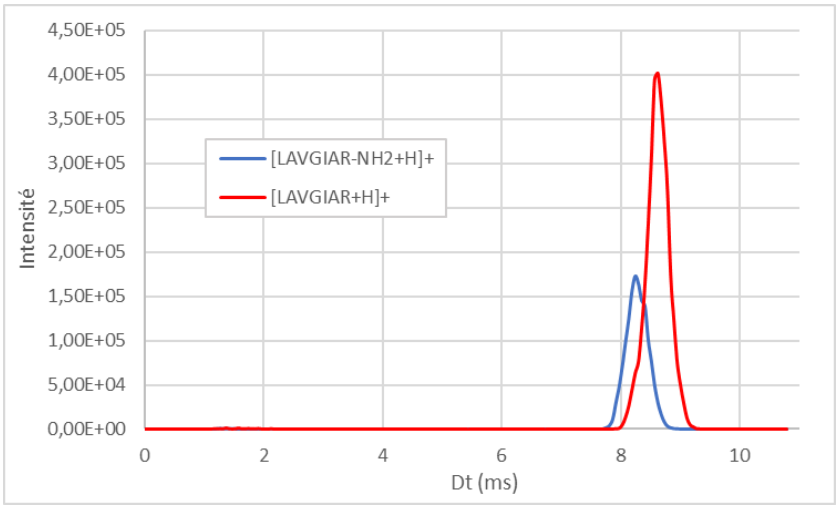
Peptides 7a et 7b (LAVTAIA)



Peptides 8a et 8b (LAVAIAR)

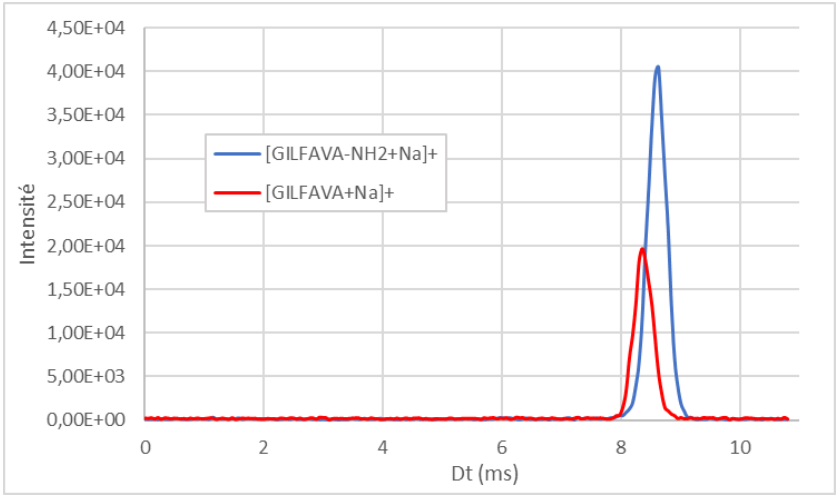


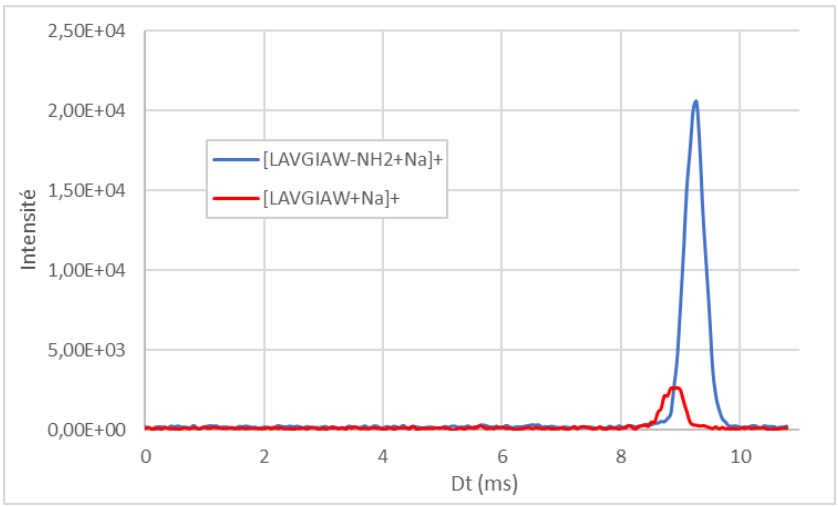
Peptides 9a et 9b (LAVGIAR)

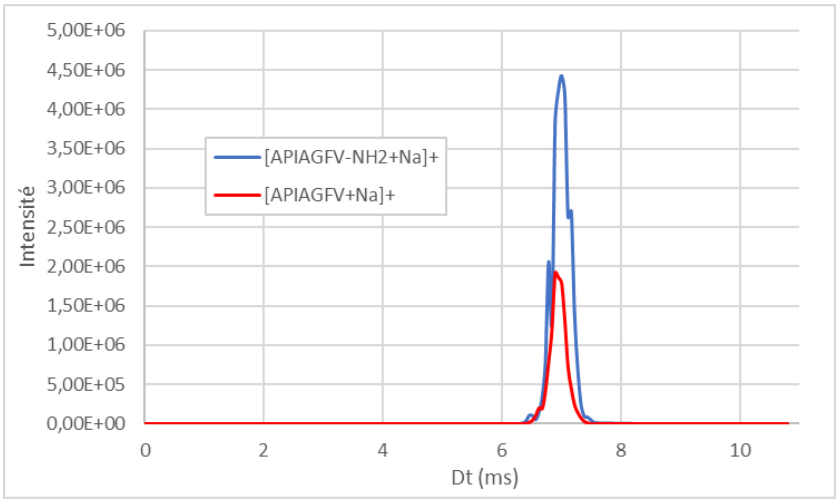


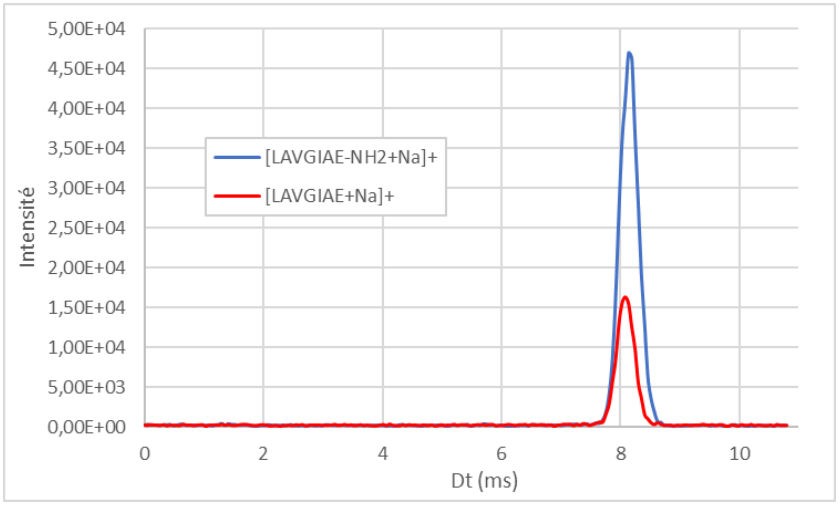
Annexe 3-1.2 : Expériences de mobilité sur les couples de peptides amides et acides cationisés par Na^+, K^+ et Mg^{2+}

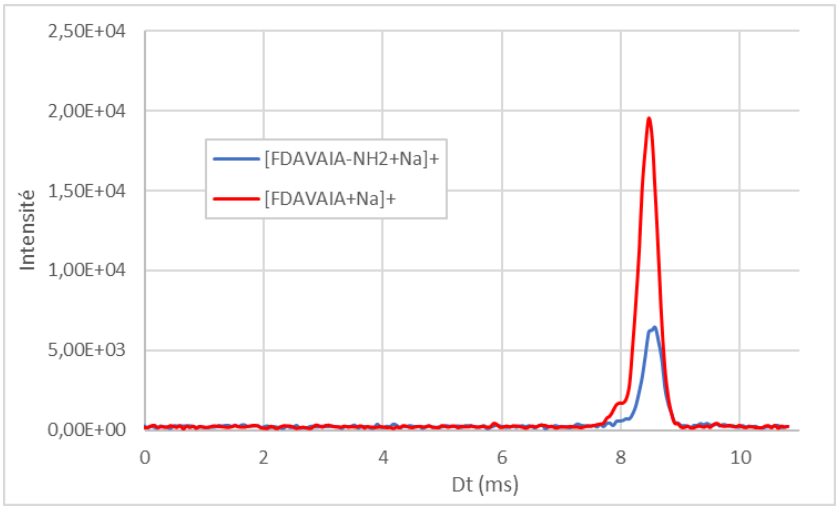
Ion Na^+

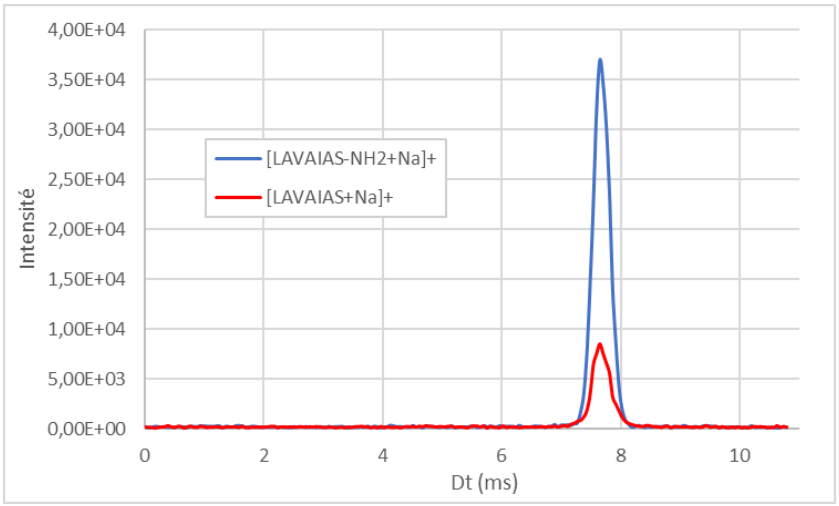


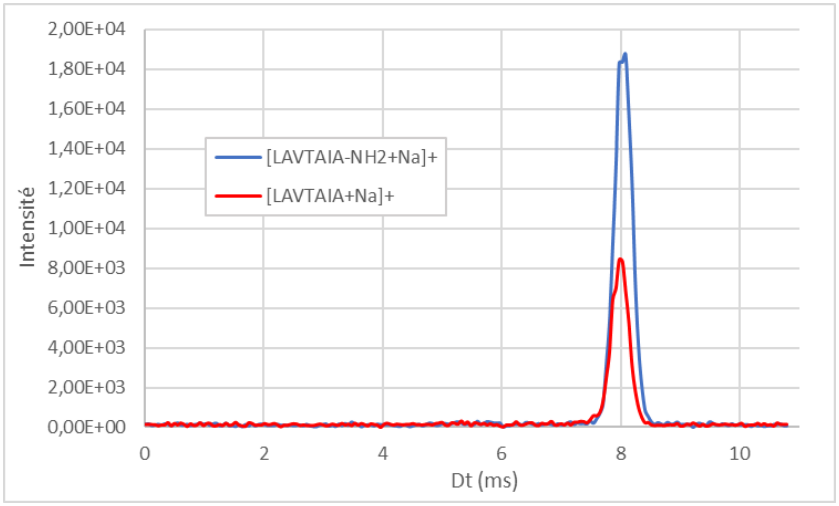


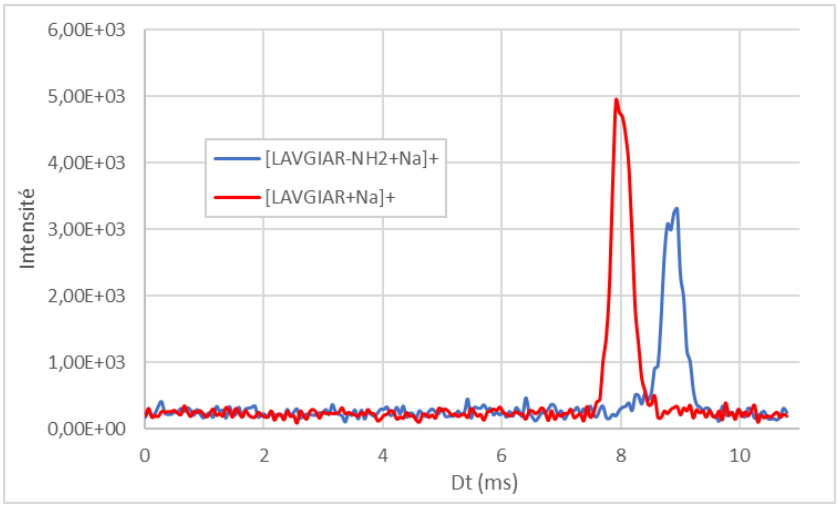



5,00E+04
4,50E+04
4,00E+04
3,50E+04
3,00E+04
2,50E+04
2,00E+04
1,50E+04
1,00E+04
5,00E+03
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAE-NH2+Na]+
[LAVGIAE+Na]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

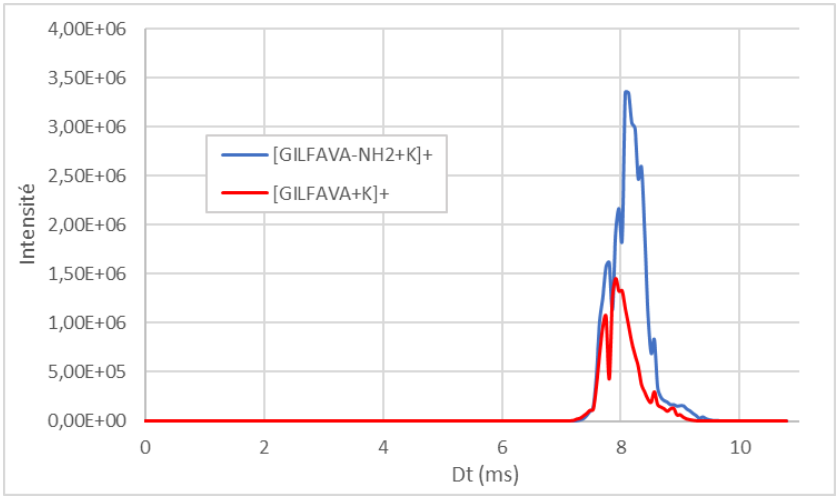

2,50E+04
2,00E+04
1,50E+04
1,00E+04
5,00E+03
0,00E+00
Intensité
[FDAVAIA-NH2+Na]+
[FDAVAIA+Na]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

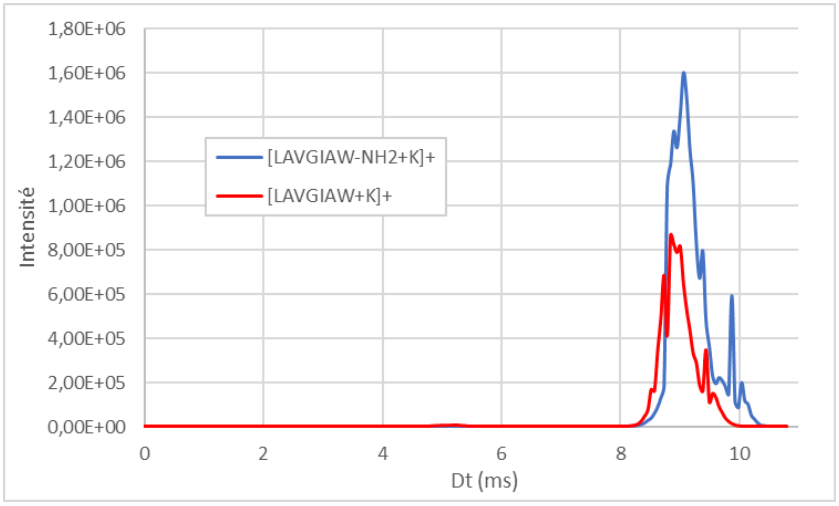

4,00E+04
3,50E+04
3,00E+04
2,50E+04
2,00E+04
1,50E+04
1,00E+04
5,00E+03
0,00E+00
Intensité
[LAVAIAS-NH2+Na]+
[LAVAIAS+Na]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

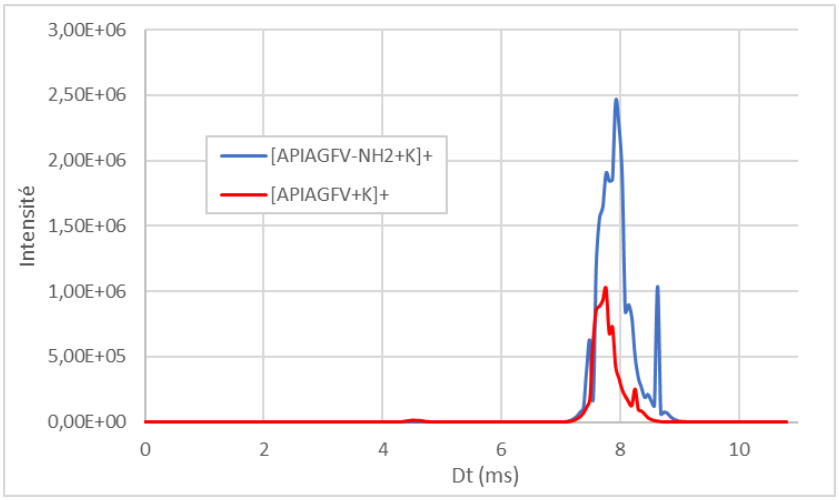

2,00E+04
1,80E+04
1,60E+04
1,40E+04
1,20E+04
1,00E+04
8,00E+03
6,00E+03
4,00E+03
2,00E+03
0,00E+00
Intensité
[LAVTAIA-NH2+Na]+
[LAVTAIA+Na]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

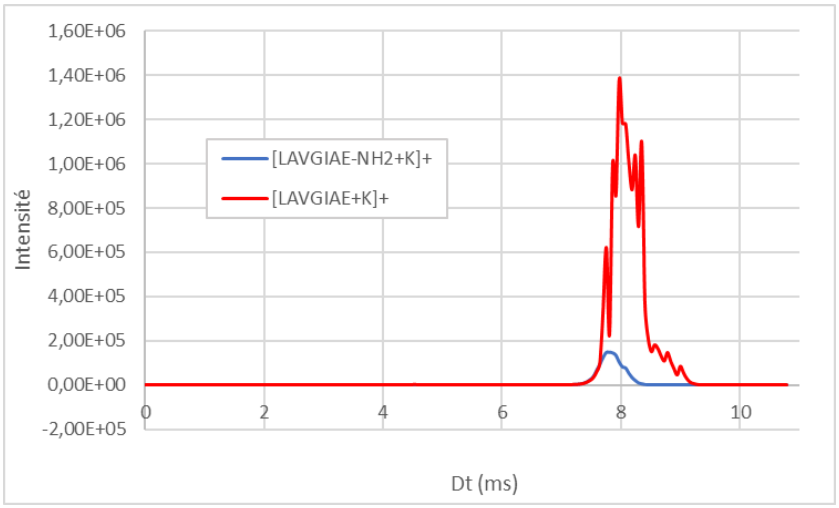

6,00E+03
5,00E+03
4,00E+03
3,00E+03
2,00E+03
1,00E+03
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAR-NH2+Na]+
[LAVGIAR+Na]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

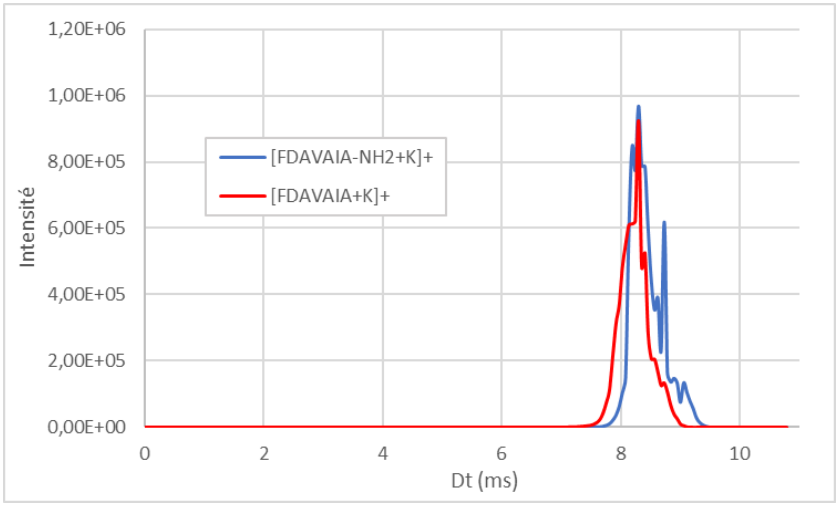
Ion K^+

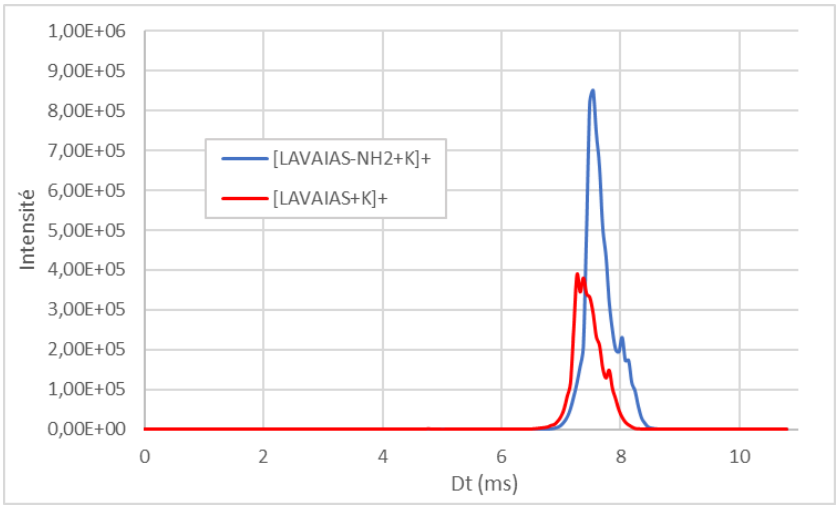

4,00E+06
3,50E+06
3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[GILFAVA-NH2+K]+
[GILFAVA+K]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

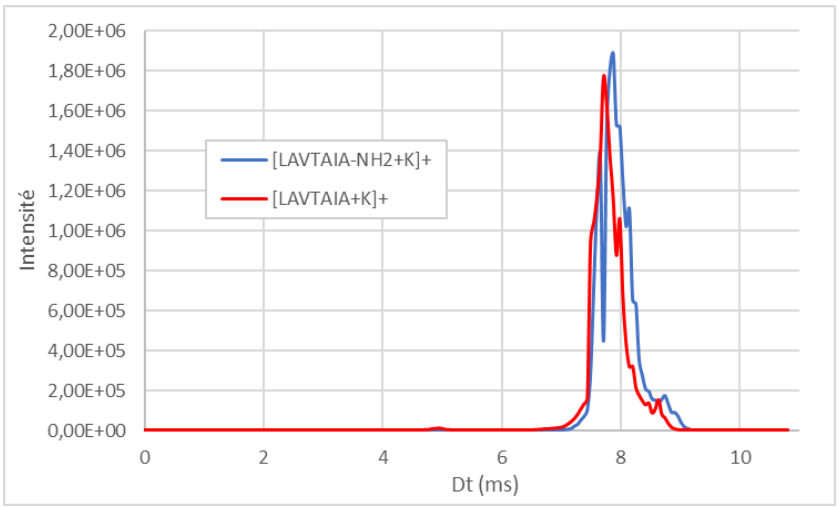

1,80E+06
1,60E+06
1,40E+06
1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAW-NH2+K]+
[LAVGIAW+K]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

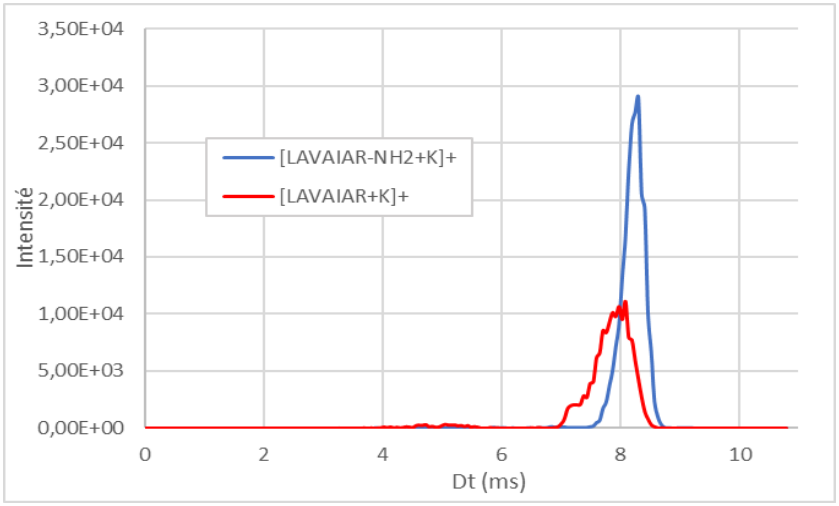

3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[APIAGFV-NH2+K]+
[APIAGFV+K]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

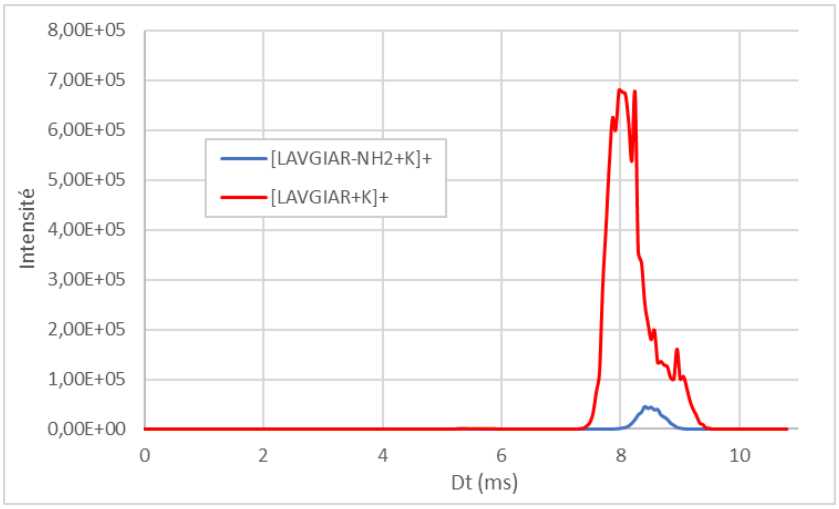

1,60E+06
1,40E+06
1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
-2,00E+05
Intensité
[LAVGIAE-NH2+K]+
[LAVGIAE+K]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)


1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
Intensité
[FDAVAIA-NH2+K]+
[FDAVAIA+K]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

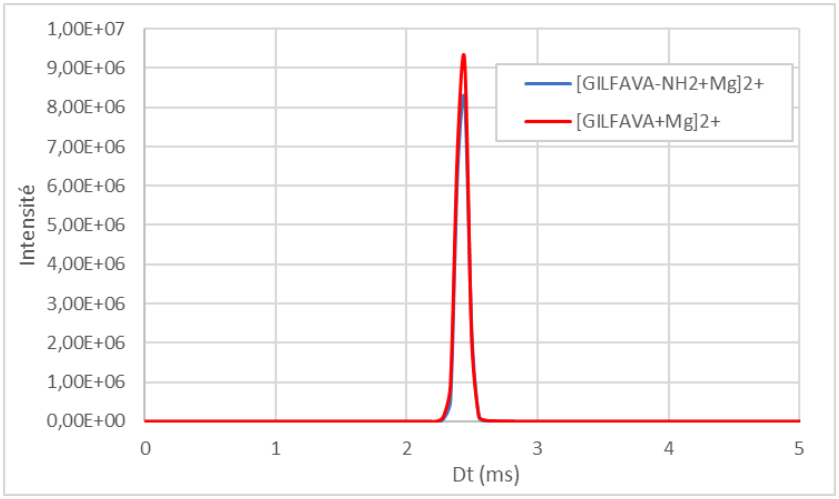

1,00E+06
9,00E+05
8,00E+05
7,00E+05
6,00E+05
5,00E+05
4,00E+05
3,00E+05
2,00E+05
1,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVAIAS-NH2+K]+
[LAVAIAS+K]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

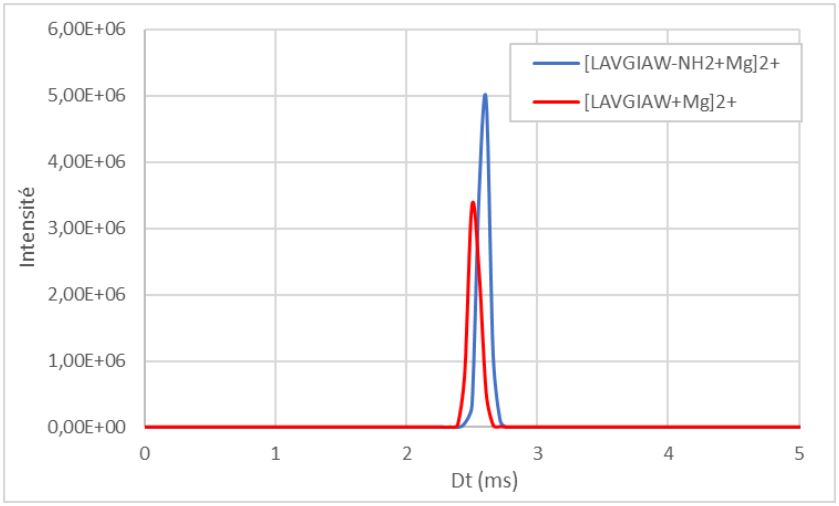

2,00E+06
1,80E+06
1,60E+06
1,40E+06
1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVTAIA-NH2+K]+
[LAVTAIA+K]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

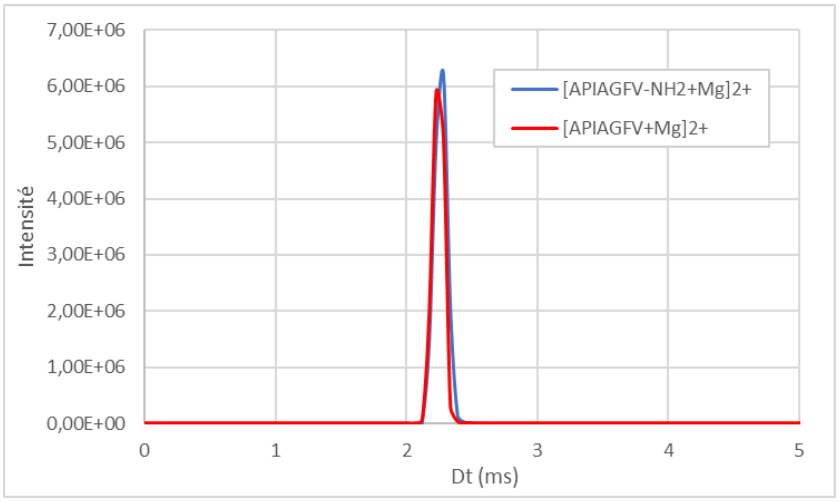

3,50E+04
3,00E+04
2,50E+04
2,00E+04
1,50E+04
1,00E+04
5,00E+03
0,00E+00
Intensité
[LAVAIAR-NH2+K]+
[LAVAIAR+K]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

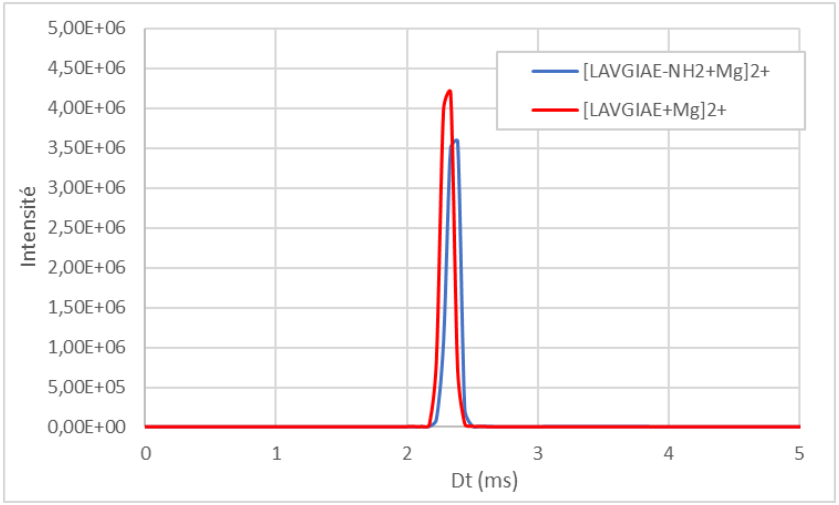

8,00E+05
7,00E+05
6,00E+05
5,00E+05
4,00E+05
3,00E+05
2,00E+05
1,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAR-NH2+K]+
[LAVGIAR+K]+
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

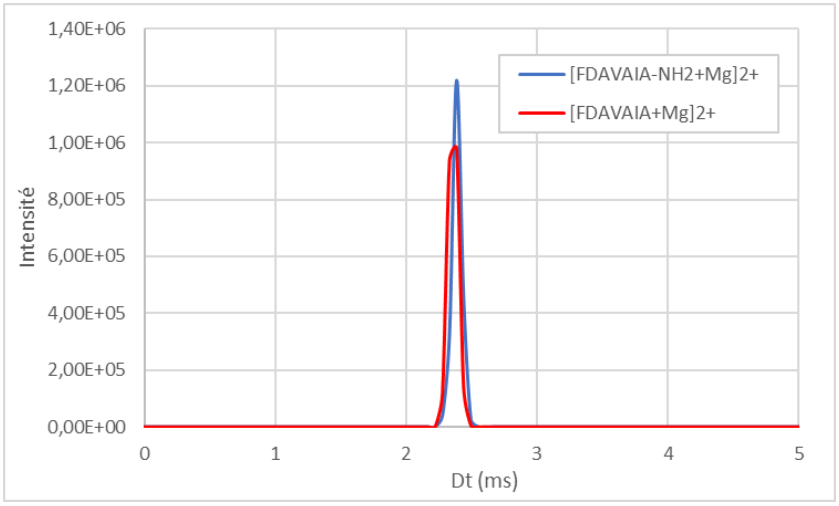
Ion Mg^{2+}

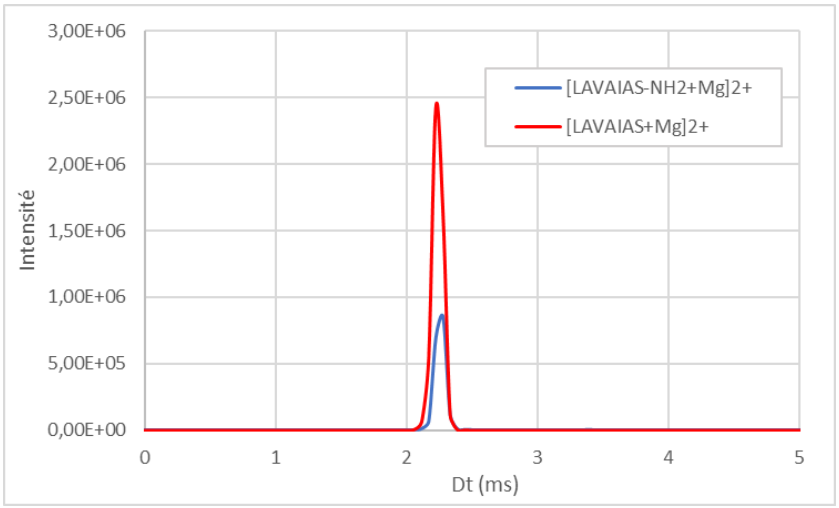

1,00E+07
9,00E+06
8,00E+06
7,00E+06
6,00E+06
5,00E+06
4,00E+06
3,00E+06
2,00E+06
1,00E+06
0,00E+00
Intensité
[GILFAVA-NH2+Mg]2+
[GILFAVA+Mg]2+
0
1
2
3
4
5
Dt (ms)

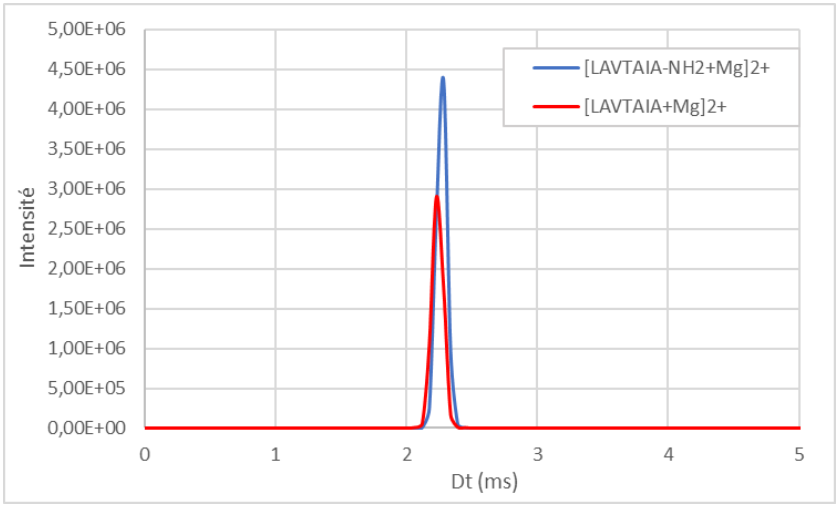

6,00E+06
5,00E+06
4,00E+06
3,00E+06
2,00E+06
1,00E+06
0,00E+00
Intensité
0
1
2
3
4
5
Dt (ms)
[LAVGIAW-NH2+Mg]2+
[LAVGIAW+Mg]2+

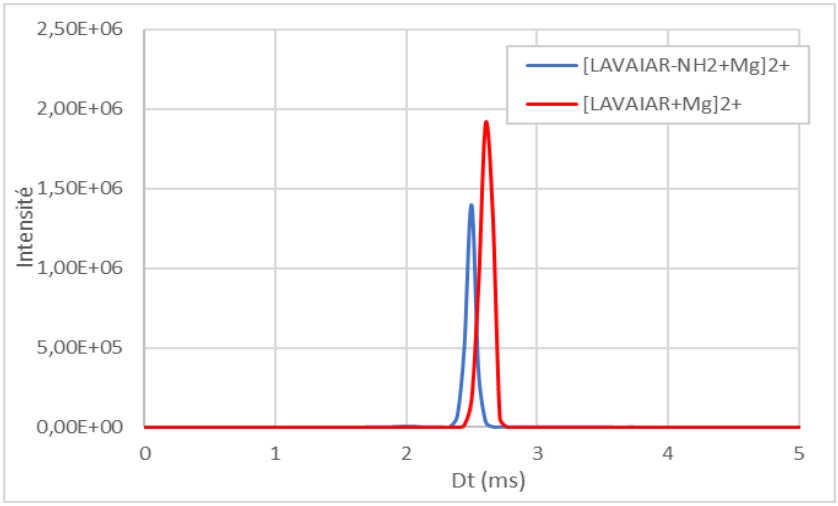

7,00E+06
6,00E+06
5,00E+06
4,00E+06
3,00E+06
2,00E+06
1,00E+06
0,00E+00
Intensité
0
1
2
3
4
5
Dt (ms)
[APIAGFV-NH2+Mg]2+
[APIAGFV+Mg]2+


5,00E+06
4,50E+06
4,00E+06
3,50E+06
3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
0
1
2
3
4
5
Dt (ms)
[LAVGIAE-NH2+Mg]2+
[LAVGIAE+Mg]2+


1,40E+06
1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
Intensité
0
1
2
3
4
5
Dt (ms)
[FDAVAIA-NH2+Mg]2+
[FDAVAIA+Mg]2+


3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
0
1
2
3
4
5
Dt (ms)
[LAVAIAS-NH2+Mg]2+
[LAVAIAS+Mg]2+


5,00E+06
4,50E+06
4,00E+06
3,50E+06
3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
0
1
2
3
4
5
Dt (ms)
[LAVTAIA-NH2+Mg]2+
[LAVTAIA+Mg]2+

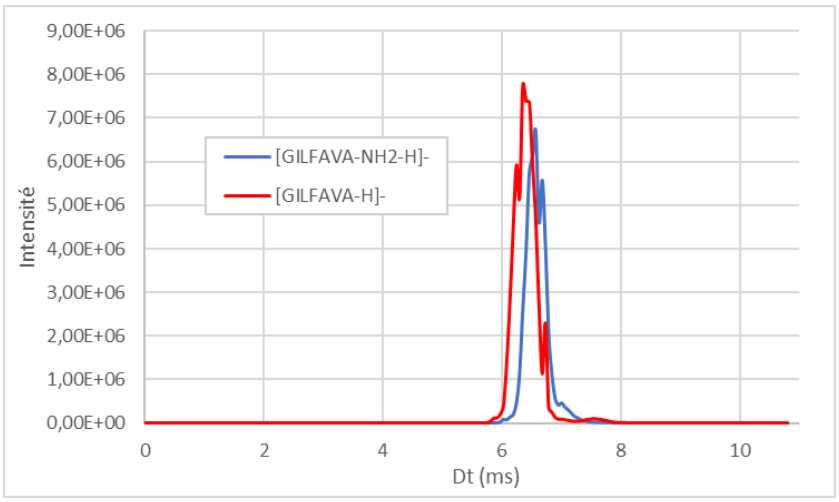


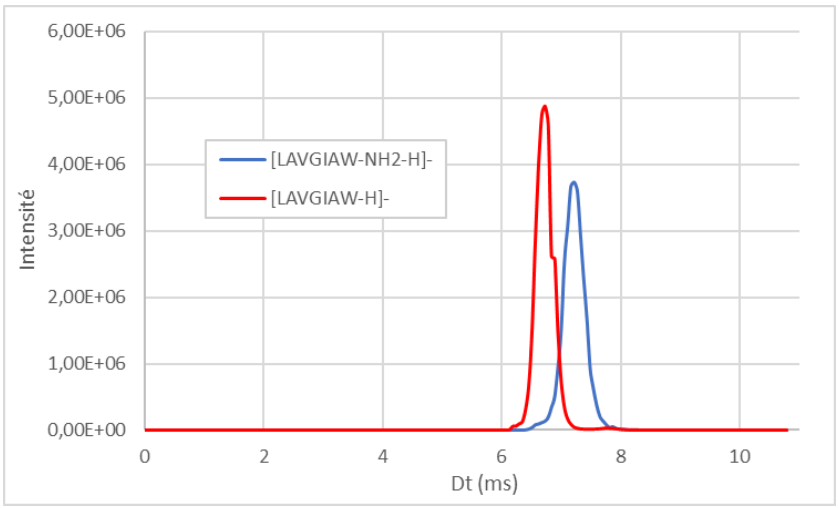
Annexe 3-1.3 : Calcul des coefficients de variation des temps de mobilité obtenus pour les peptides cationisés (interjournalier, n=3)

N°	Séquence	Fonction C-ter	ESI(+)							
			$[M+H]^+$		$[M+Na]^+$		$[M+K]^+$		$[M+Mg]^{2+}$	
			Dt (ms)	CV (%)	Dt (ms)	CV (%)	Dt (ms)	CV (%)	Dt (ms)	CV (%)
1a	GILFAVA	$-NH_2$	7.794	0.80	8.318	0.37	7.848	0.40	2.441	0.00
1b		-OH	7.631	0.82	7.758	0.00	7.631	0.41	2.441	0.00
2a	LAVGIAW	$-NH_2$	8.174	0.39	8.806	1.98	8.951	1.05	2.604	0.00
2b		-OH	7.721	0.41	8.174	1.02	8.879	0.35	2.532	1.23
3a	APIAGFV	$-NH_2$	7.215	0.75	7.721	0.41	7.776	1.07	2.279	0.00
3b		-OH	6.998	0.77	7.794	0.40	7.758	0.70	2.224	0.00
4a	LAVGIAE	$-NH_2$	7.161	0.00	7.757	2.71	7.649	2.46	2.333	0.00
4b		-OH	7.161	0.75	7.306	1.14	8.119	1.02	2.333	0.00
5a	FDAVAIA	$-NH_2$	7.541	0.72	8.101	0.77	8.264	0.38	2.387	0.00
5b		-OH	7.396	1.12	7.866	0.69	8.191	1.15	2.387	0.00
6a	LAVAIAS	$-NH_2$	6.817	0.46	7.016	0.89	7.269	0.75	2.279	0.00
6b		-OH	6.763	0.46	6.872	0.46	7.052	0.77	2.279	0.00
7a	LAVTAIA	$-NH_2$	7.288	0.86	7.396	1.12	7.504	0.42	2.261	1.40
7b		-OH	7.161	0.75	7.251	0.43	7.468	0.42	2.224	0.00
8a	LAVAIAR	$-NH_2$	7.486	0.73	7.577	0.41	7.884	0.40	2.514	1.24
8b		-OH	7.631	0.41	7.414	0.42	7.721	0.41	2.622	1.19
9a	LAVGIAR	$-NH_2$	7.794	0.40	8.445	0.37	8.336	2.10	-	-
9b		-OH	8.264	0.38	8.228	1.01	8.264	0.75	-	-

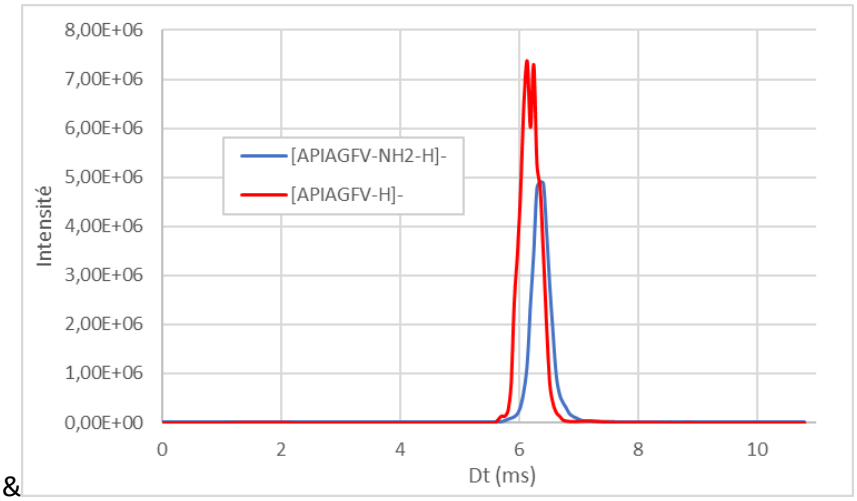
Annexe 3-1.4 : Expériences de mobilité sur les couples de peptides amides et acides déprotonés et anionisés par Br^- et I^-

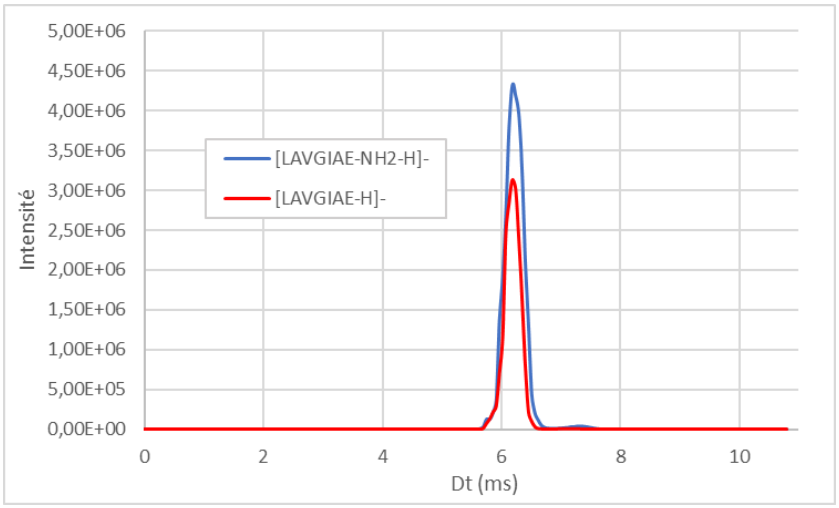
Peptides déprotonés

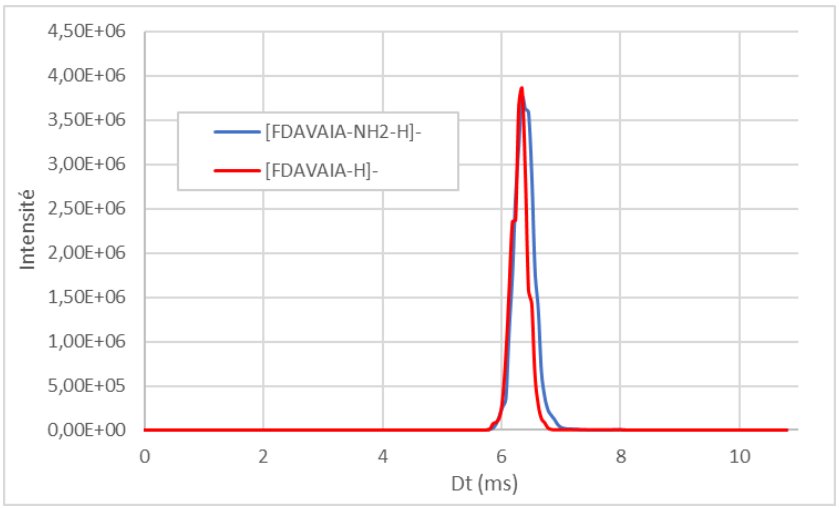


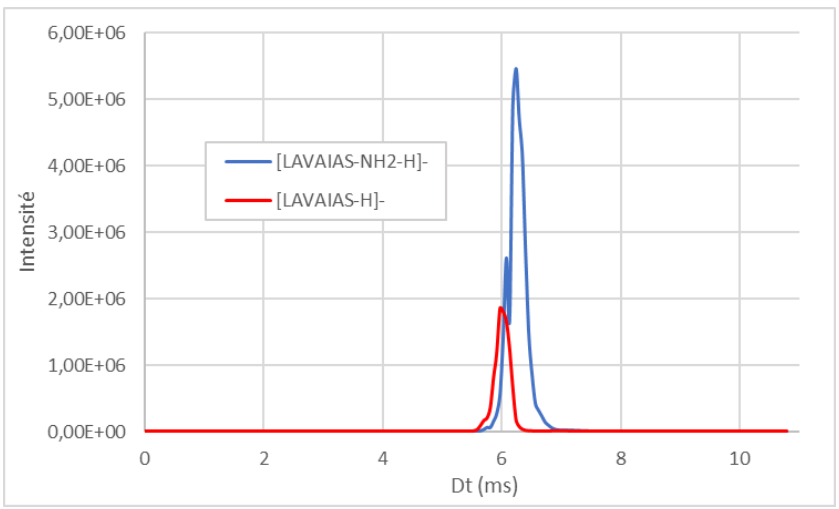


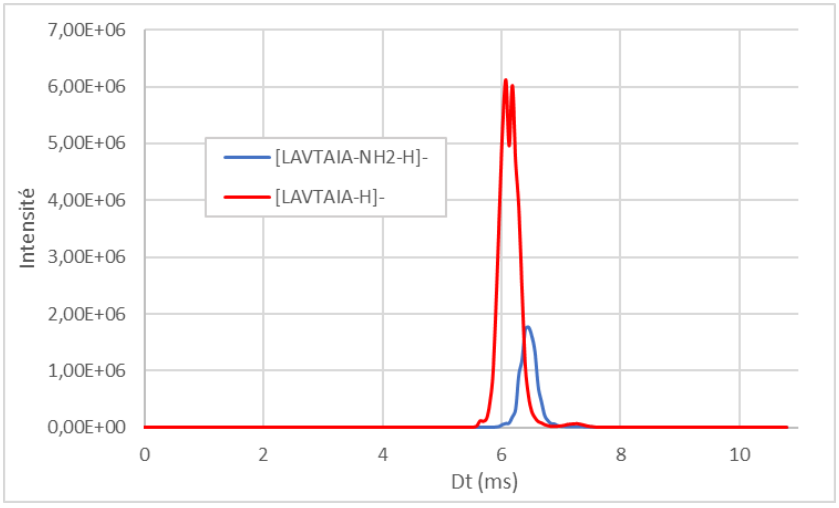
&

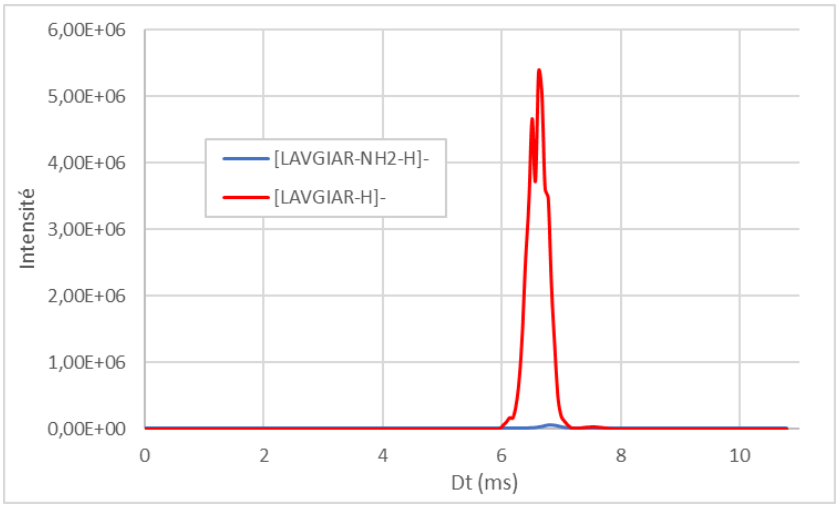



5,00E+06
4,50E+06
4,00E+06
3,50E+06
3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAE-NH2-H]-
[LAVGIAE-H]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

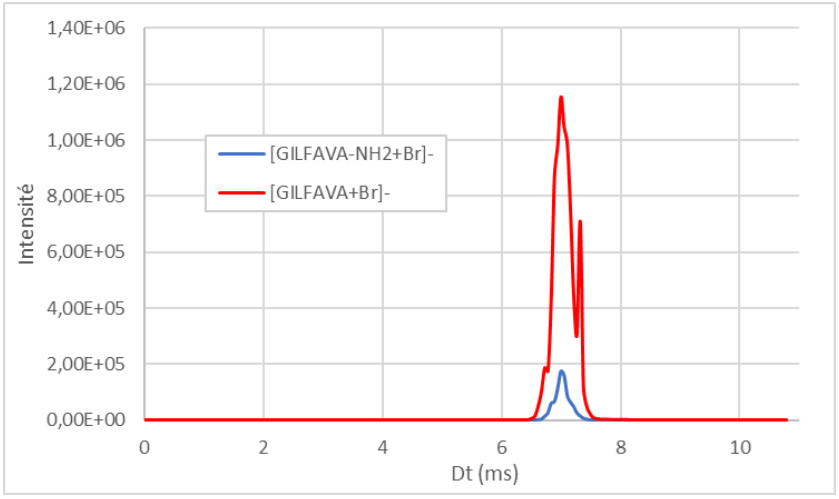

4,50E+06
4,00E+06
3,50E+06
3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[FDAVAIA-NH2-H]-
[FDAVAIA-H]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

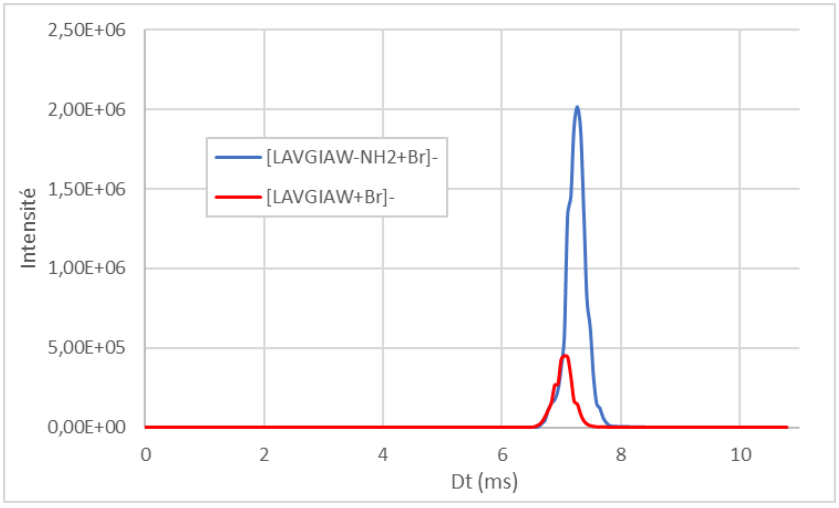

6,00E+06
5,00E+06
4,00E+06
3,00E+06
2,00E+06
1,00E+06
0,00E+00
Intensité
[LAVAIAS-NH2-H]-
[LAVAIAS-H]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

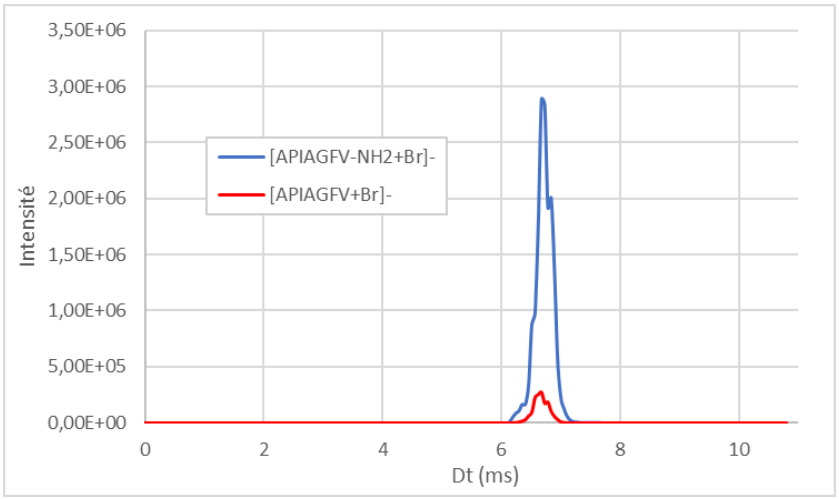

7,00E+06
6,00E+06
5,00E+06
4,00E+06
3,00E+06
2,00E+06
1,00E+06
0,00E+00
Intensité
[LAVTAIA-NH2-H]-
[LAVTAIA-H]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

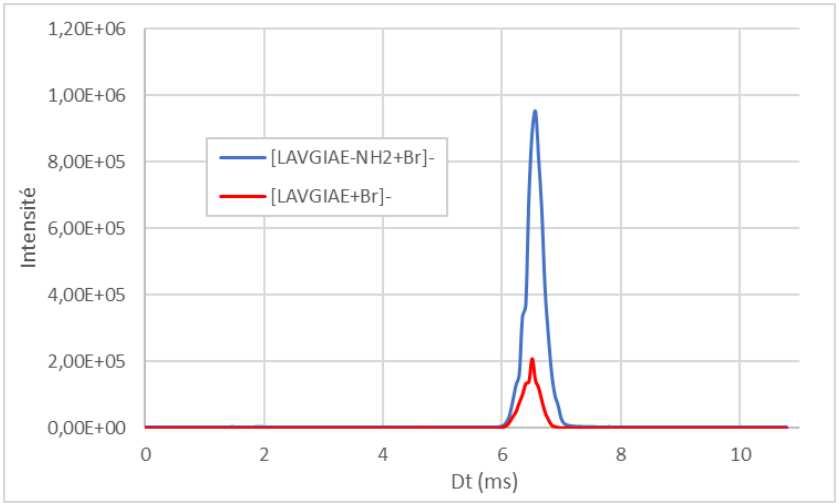

6,00E+06
5,00E+06
4,00E+06
3,00E+06
2,00E+06
1,00E+06
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAR-NH2-H]-
[LAVGIAR-H]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

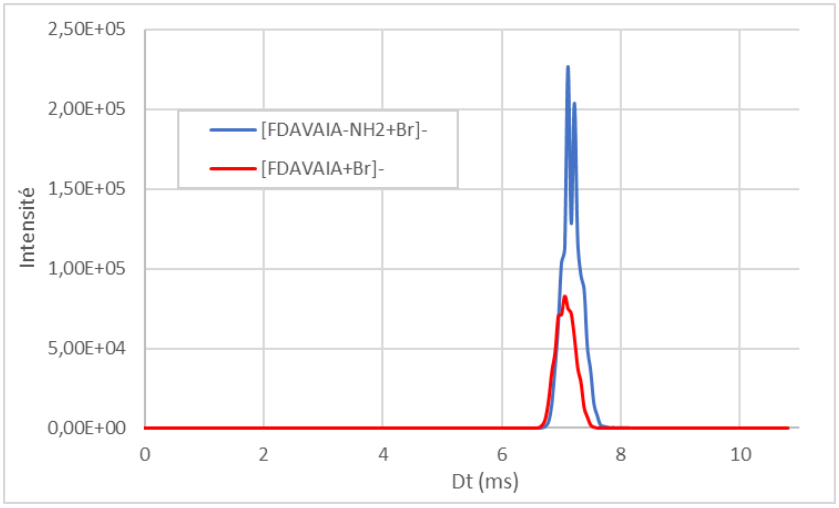
Ion Br^-

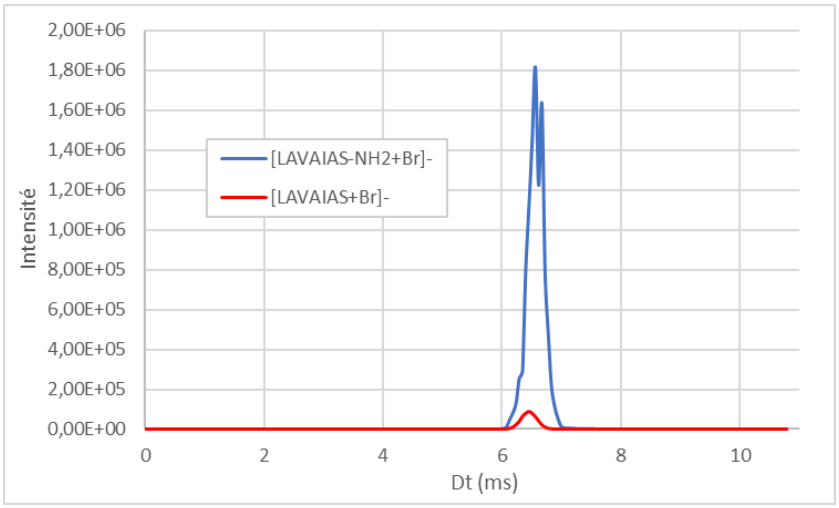

1,40E+06
1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
Intensité
[GILFAVA-NH2+Br]-
[GILFAVA+Br]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

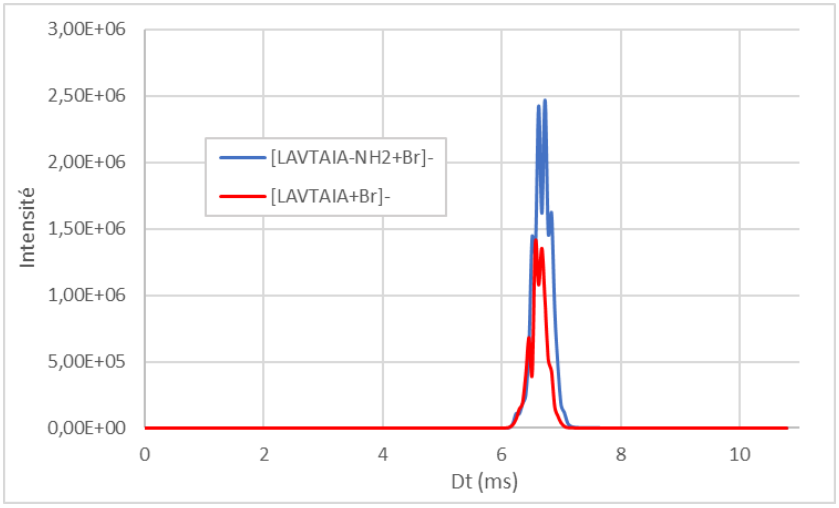

2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAW-NH2+Br]-
[LAVGIAW+Br]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

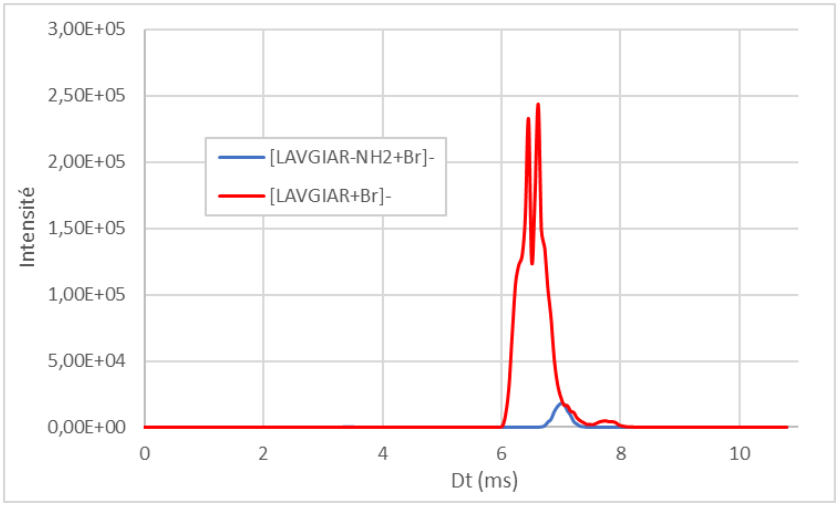

3,50E+06
3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[APIAGFV-NH2+Br]-
[APIAGFV+Br]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)


1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAE-NH2+Br]-
[LAVGIAE+Br]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

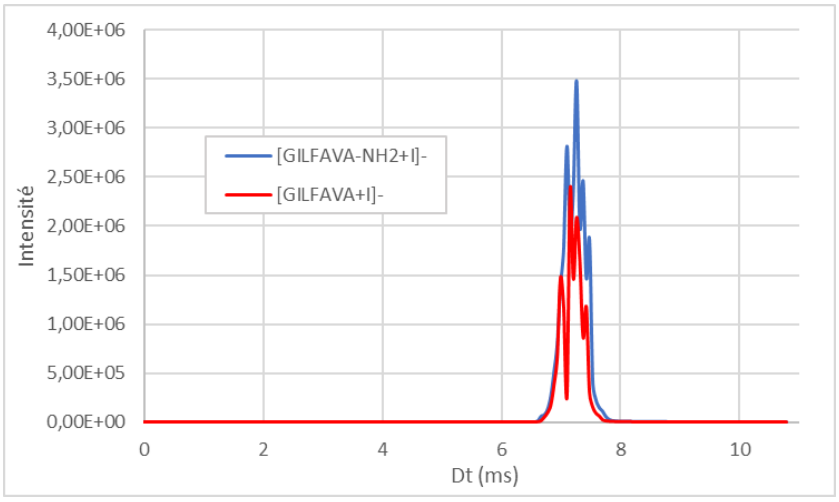

2,50E+05
2,00E+05
1,50E+05
1,00E+05
5,00E+04
0,00E+00
Intensité
[FDAVAIA-NH2+Br]-
[FDAVAIA+Br]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

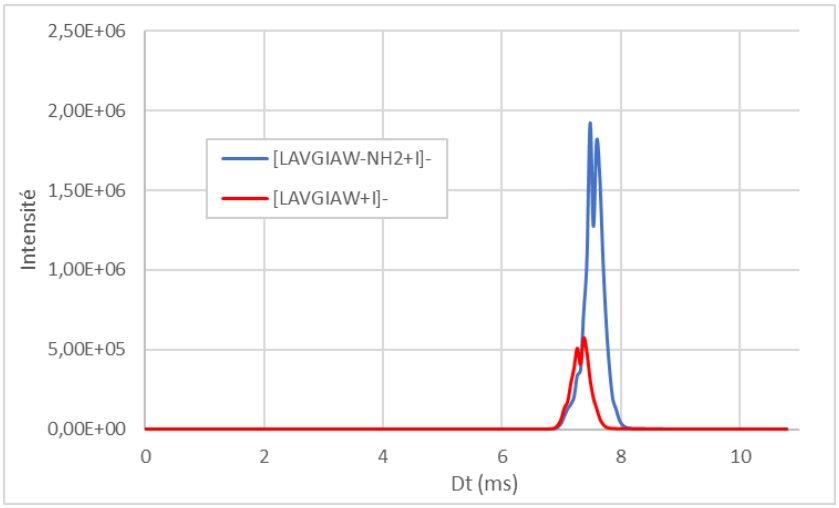

2,00E+06
1,80E+06
1,60E+06
1,40E+06
1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVAIAS-NH2+Br]-
[LAVAIAS+Br]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

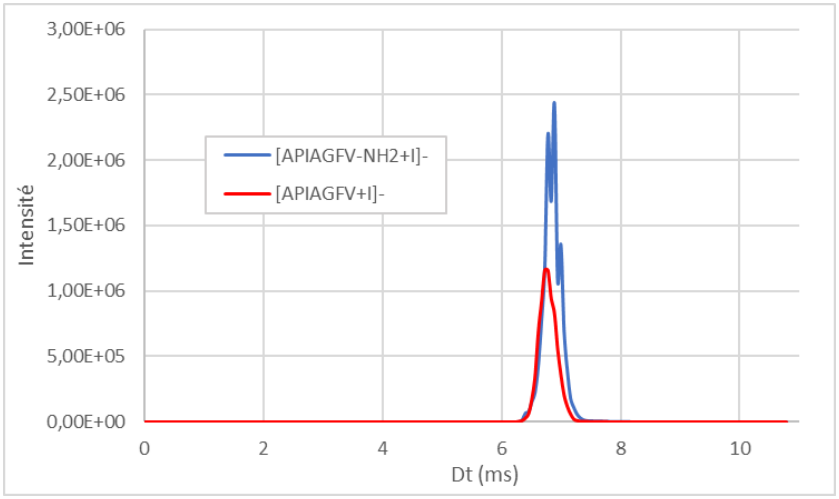

3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVTAIA-NH2+Br]-
[LAVTAIA+Br]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

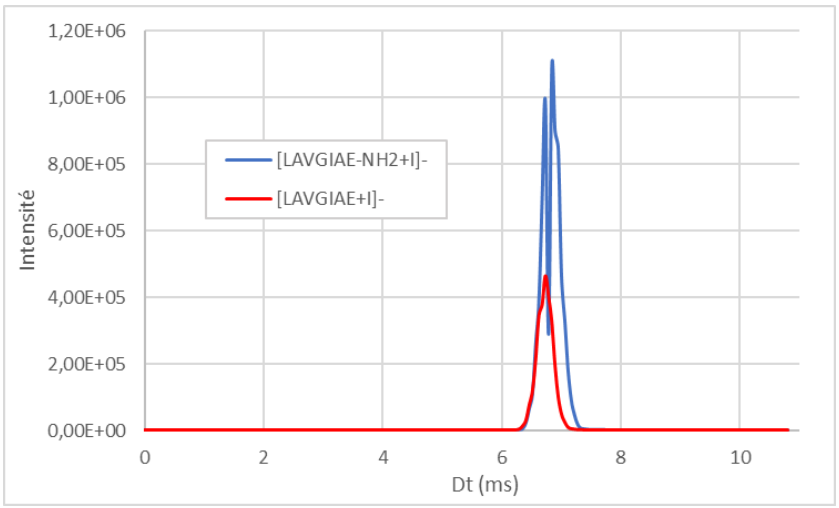

3,00E+05
2,50E+05
2,00E+05
1,50E+05
1,00E+05
5,00E+04
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAR-NH2+Br]-
[LAVGIAR+Br]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)

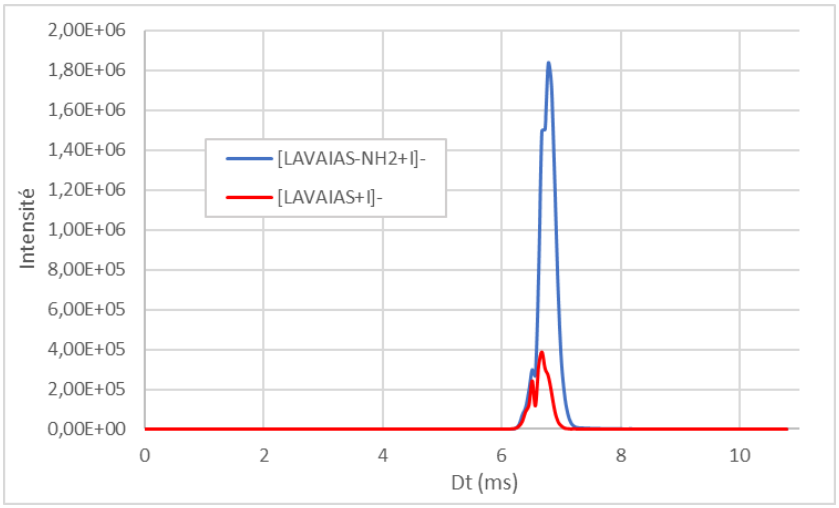
Ion I^-

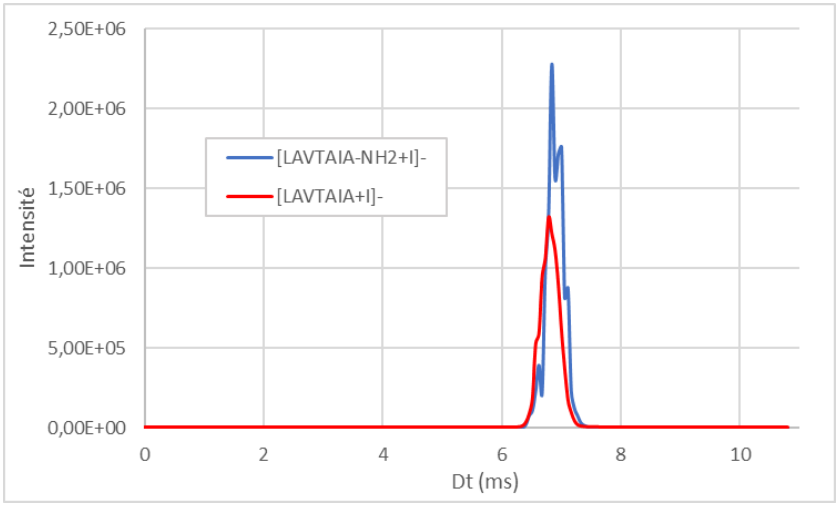

4,00E+06
3,50E+06
3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[GILFAVA-NH2+I]-
[GILFAVA+I]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)


2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAW-NH2+I]-
[LAVGIAW+I]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)


3,00E+06
2,50E+06
2,00E+06
1,50E+06
1,00E+06
5,00E+05
0,00E+00
Intensité
[APIAGFV-NH2+I]-
[APIAGFV+I]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)


1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVGIAE-NH2+I]-
[LAVGIAE+I]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)


2,00E+06
1,80E+06
1,60E+06
1,40E+06
1,20E+06
1,00E+06
8,00E+05
6,00E+05
4,00E+05
2,00E+05
0,00E+00
Intensité
[LAVAIAS-NH2+I]-
[LAVAIAS+I]-
0
2
4
6
8
10
Dt (ms)



5) Liste Figures et Tableaux

Figure 1 : Mobilogrammes des peptides n°8a et 8b sodés

Tableau 1 : Séquences et masses (protonés, déprotonés, adduits) des peptides sélectionnés pour les expériences de mobilité ionique

V. Chapitre 4

Comparaison de recouvrements de séquence de peptides activés par CID ou ETD

V. Comparaison de recouvrements de séquence de peptides activés par CID ou ETD

I) Introduction

La protéomique consiste à étudier un protéome qui est un ensemble de protéines exprimées par un génome dans un organisme, un tissu, un fluide biologique ou encore une cellule à un instant t. En fonction des conditions intra ou extra cellulaires, le contenu des protéines est modifié en permanence. De plus, par l'intermédiaire de l'épissage alternatif de l'ARNm et des modifications post-traductionnelles, un gène peut mener à la production de plusieurs protéines. On compte donc un nombre bien plus important de protéines que le génome ne contient de gènes. Les protéines peuvent être étudiées en fonction de leur quantité, de leur variété et de leurs interactions avec d'autres protéines. Ces paramètres sont par exemple exploités dans le cadre clinique, lorsqu'il s'agit d'étudier les protéines impliquées dans différentes pathologies [1,2].

Ainsi, l'un des objectifs de la protéomique est d'identifier, de caractériser voire de quantifier les protéines présentes dans un échantillon à un instant donné afin d'améliorer les connaissances en biologie, et de participer aux diverses stratégies de découvertes de biomarqueurs et de conception de nouveaux médicaments pour des applications diagnostiques et thérapeutiques. Face à la complexité d'un protéome, plusieurs technologies ont été mises en place afin d'atteindre ces objectifs recourant à la spectrométrie de masse couplée à des techniques séparatives [1]. Plusieurs méthodes ont donc été développées : les stratégies « Bottom-Up », « Middle-Down » et « Top-Down » (voir Figure 1).

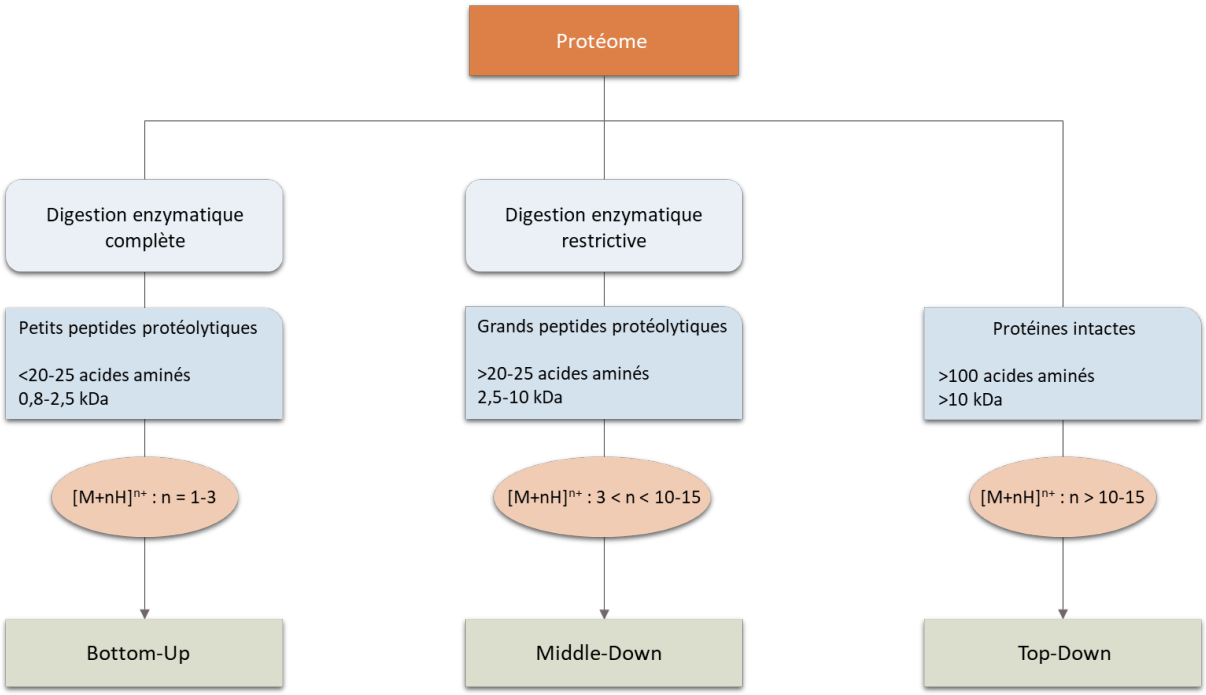


Figure 1 : Résumés des différentes approches utilisées pour l'analyse par spectrométrie de masse en protéomique [3]

La stratégie Bottom-Up est la plus couramment utilisée pour l'identification et la quantification à haut débit de protéines. Cette méthode consiste à utiliser des protéases (généralement la trypsine) pour

générer des petits peptides trypsiques (<20-25 acides aminés), dont le résidu C-terminal est connu (R ou K) [1]. Les peptides sont ensuite engagés dans des expériences LC-MS/MS de type shotgun [4,5]. Cette stratégie repose sur les divers avantages que proposent les peptides : solubilité, séparation aisée par chromatographie liquide, bonne ionisation en spectrométrie de masse, divers logiciels bio-informatiques développés pour l'identification des peptides [6]. Cependant, dans le cadre de caractérisation structurale, la stratégie Bottom-Up ne permet généralement pas d'obtenir un recouvrement de séquence complet des peptides trypsiques ni d'accéder aux informations sur les modifications post-traductionnelles, d'où le développement d'autres stratégies afin de compléter les données générées [7]. Diverses stratégies de quantification relatives ou absolues de peptides d'intérêt (renseignant des protéines biomarqueurs) ont été développées [8–13].

La stratégie Top-Down propose quant à elle d'analyser les protéines intactes, ainsi que des complexes protéiques, et permet l'identification et la localisation des modifications post-traductionnelles ou encore la quantification relative des niveaux d'expression des différentes formes protéiques [6,14]. L'analyse de protéines présente cependant d'autres challenges comme la solubilité de l'échantillon, la complexité du protéome, l'analyse des données ou encore le débit analytique [15]. Une protéine intacte peut également exister sous différentes formes ioniques car elle existe sous divers isoformes (par exemple oxydée), sous différents états de charge, ce qui génère une « division du signal » [15] et diminue le rapport signal/bruit.

Afin de combiner les avantages des deux stratégies précédentes, la stratégie Middle-Down génère des peptides (comme la technique Bottom-Up) supérieur à 20-25 acides aminés allant jusqu'à 100 résidus. Pour générer ces peptides de plus grande longueur, des digestions dites restrictives sont réalisées à partir des enzymes GluC ou AspN par exemple, en optimisant le temps de digestion entre autre [3]. De ce fait, le nombre de peptides protéolytiques est moindre par rapport au nombre de peptide trypsiques générés par l'approche Bottom-Up, décomplexifiant ainsi l'échantillon et augmentant la probabilité de détecter des peptides uniques permettant d'augmenter la couverture de séquences des peptides analysés et donc globalement des protéines (comme en Top-Down).

Cependant, la protéomique reste limitée à l'analyse de protéines de poids moléculaires supérieurs à 10 kDa, alors qu'il existe également des protéines de plus bas poids moléculaires voire des peptides qui ne peuvent pas être analysés selon les méthodes précédemment citées pour des raisons méthodologiques. En particulier, on retrouve parmi ces peptides bioactifs les hormones, les facteurs de croissance qui sont tout aussi importants biologiquement parlant que les protéines. Comme explicité en introduction, les peptides présentant une activité biologique sont présents dans de très nombreuses ressources naturelles (plantes, animaux). De fait, leurs études constituent un pan spécifique de l'analyse des classes de biomolécules. La notion de peptidomique est ainsi introduite pour la description des peptides [16,17]. L'objectif est donc le même que celui de la protéomique mais à une autre échelle : l'échelle des peptides.

Il existe cependant des différences entre ces deux approches. Comme précédemment vu, les études protéomiques passent généralement par une étape de digestion enzymatique pour réaliser par la suite des expériences MS/MS. En peptidomique, cette étape n'est pas nécessaire, les peptides sont analysés dans leur état natif comprenant donc les modifications post-traductionnelles. Cependant, contrairement à la protéomique où il n'est pas nécessaire d'identifier tous les peptides protéolytiques pour revenir à la protéine initiale, il est nécessaire d'identifier le maximum de peptides possibles car chacun d'entre eux peut avoir une fonction biologique bien particulière [18]. Une autre difficulté de la

peptidomique est la faible quantité de ces peptides bioactifs par rapport aux protéines majeures ou aux autres composants qui peuvent masquer les signaux plus faibles des peptides d'intérêt. Il est alors possible d'enrichir les peptides sur des colonnes d'affinité [19], ou d'ajouter une étape de séparation des peptides des protéines à haut poids moléculaire (>10-20 kDa).

Que ce soit en protéomique ou en peptidomique, le couplage LC-MS/MS est une méthode analytique de choix pour identifier et caractériser les biomolécules présentes. Plusieurs méthodes d'activation peuvent être utilisées lors des expériences de fragmentation (MS/MS) selon la configuration d'analyseurs de masse utilisée [1,7] :

- CID
- ECD/ETD
- HCD

Il existe également d'autres méthodes d'activation hybrides dédiées à l'analyse de protéines intactes appelées AI-ETD (Activated Ion Electron Transfer Dissociation) et EThcD (Electon-Transfer dissociation/higher collisional dissociation). Pour chacune de ces méthodes, les ions sont activés par une énergie collisionnelle ou par bombardement de photons avant d'être engagés dans des réactions ion-ion, afin d'améliorer la fragmentation [6,20,21].

Malgré le développement de toutes ces technologies d'activation, la méthode d'activation CID est la plus généralement utilisée, les logiciels d'interprétation étant optimisés pour l'analyse de spectres issus de la fragmentation de peptides trypsiques selon le modèle du proton mobile décrit en introduction. Ces logiciels sont donc moins performants pour identifier les peptides endogènes, les séquences non trypsiques ou issues d'une stratégie Middle-Down [22]. Cependant, l'activation par CID ne permet pas d'obtenir un recouvrement de séquence complet comme explicité précédemment, ce qui constitue un écueil notable dans le cadre d'études peptidomiques. En effet, il est possible de retrouver des ions de même masse mais renseignant les extrémités N- et C-terminales ayant pour conséquence une mauvaise interprétation du spectre de masse (problèmatique séquence/rétro-séquence). L'utilisation de spectromètre de masse ultra-haute résolution comme les FT-ICR ne constitue pas forcément une solution puisque ces ions peuvent avoir exactement la même masse. Les collisions basse énergie ne permettent également pas de distinguer les résidus isomères Leu/Ile. Dans ce cas, il est nécessaire de générer des fragmentations secondaires afin d'obtenir des ions d et w spécifiques des chaines latérales. Enfin, le CID présente le désavantage de cliver les modifications post-traductionnelles labiles [22–24].

La méthode d'activation ETD a donc été envisagée dans le but d'augmenter la couverture de séquence de peptides par rapport au CID, les mécanismes de fragmentation étant différents entre les deux méthodes d'activation. Un grand avantage de l'utilisation de l'ETD est de ne pas induire la perte des modifications post-traductionnelles labiles comme les phosphorylations, glycosylations, acétylations, ou méthylations entre autres, permettant ainsi de les identifier et les localiser sur la séquence peptidique [15,23–29]. Un des avantages majeurs de l'ETD par rapport au CID est l'analyse de peptides de séquences plus longues (voire des protéines en stratégie Top-Down), ainsi que des peptides non trypsiques [7,15,23,26]. Malgré ces différents points forts, l'ETD ne peut systématiquement remplacer l'utilisation du CID. Premièrement d'un point de vue instrumental, la méthode d'activation CID est plus facile à mettre en œuvre que l'ETD, qui est également plus coûteux. Deuxièmement, bien que les ions fragments produits soient spécifiques à chaque méthode d'activation comme détaillé en introduction,

les ions b et y obtenus en CID peuvent aussi être générés en ETD mais avec des valeurs de m/z pouvant varier de +/- 1 Da dû au réarrangement de l'hydrogène décrit dans les mécanismes proposés de Cornell et Utah-Washington, diminuant donc la certitude de l'assignation des ions, ce qui devient problématique dans le cas d'un séquençage *de novo* [23].

Enfin, la comparaison des spectres MS/MS enregistrés avec les deux méthodes d'activation a montré que beaucoup d'ions fragments sont obtenus en CID informant sur la séquence du peptide analysé, mais pouvant compliquer l'interprétation des données par production d'ions secondaires et de non-séquences comme détaillé en introduction, tandis que les spectres ETD sont plus simples car ils contiennent moins d'ions, qui sont alors plus facile à assigner [30]. Il existe également des particularités de fragmentations préférentielles entre les deux méthodes d'activation. Le CID semble générer préférentiellement des ions fragments issus du clivage de liaisons peptidiques situées à l'intérieur de la séquence, tandis que l'ETD semble produire majoritairement des ions issus de la fragmentation des extrémités [31]. Une autre différence significative entre les deux méthodes d'activation réside dans la couverture de séquence. L'ETD permettrait d'identifier moins de peptides que le CID, mais avec une plus grande couverture de séquence. Cela peut s'expliquer par l'intensité des ions générés en ETD qui sont 5 à 10 fois moins intenses que ceux retrouvés en CID ainsi que par une fragmentation ETD plus uniforme [15,31]. L'état de charge sélectionné pour réaliser les fragmentations semble également avoir un impact sur le séquençage des peptides selon la méthode d'activation choisie. La couverture de séquence atteinte en CID est grande lorsque les ions dichargés sont sélectionnés, tandis que l'état de charge en ETD doit être supérieur à 2 pour atteindre les plus grands recouvrements de séquence (états de charge 3 et 4) [32,33]. Une équipe de l'université de Wisconsin a établi un schéma décisionnel de la méthode d'activation à choisir selon l'état de charge ainsi que la masse du peptide à fragmenter [34]. A tout cela, on peut ajouter que contrairement au CID, il n'existe pas de préférence de clivage au niveau de certains résidus pour l'ETD (excepté dans une certaine mesure pour la proline, seul imino acide, comme évoqué en introduction). Les résultats obtenus en CID et en ETD sont donc complémentaires : la combinaisons des deux méthodes d'activation permet d'augmenter la couverture de séquence [30,31,35,36].

Certains spectromètres de masse sont capables de réaliser ces deux fragmentations simultanément [36–38]. Les spectres générés contiennent des ions typiques de l'activation CID (b, a, y) ainsi que des ions produits par ETD (c, z) [36]. L'avantage de l'association de ces deux méthodes d'activation est l'élargissement du domaine d'application : les petits peptides qui se fragmentent peu en ETD se fragmenteront préférentiellement en CID et inversement pour les plus gros peptides. De plus, pour les peptides doublement protonés qui ne se fragmentent pas en ETD, l'alliance du CID et de l'ETD permet d'atténuer ce problème [36]. La combinaison ETD/CID peut donc devenir une stratégie de fragmentation efficace pour séquencer des peptides en peptidomique mais aussi dans le cadre d'une méthode Bottom-Up en protéomique pour localiser des modifications post-traductionnelles [37]. Cependant, les ions précurseurs réagissant peu avec le réactif de l'ETD ont une abondance telle que les ions fragments apparaissent avec une faible intensité sur le spectre MS/MS. Pour pouvoir réaliser le séquençage du peptide, les ions précurseurs sont enlevés par traitement spectral pour ainsi mettre les ions fragments à une nouvelle échelle d'abondance relative [37]. Afin d'éviter les réarrangements en phase gazeuse des ions qui reforment les ions précurseurs, une technologie alliant un faisceau infra-rouge et l'ETD a été développée (AI-ETD).

Toujours dans l'optique d'augmenter le recouvrement de séquence, la méthode d'activation HCD (spécifique au spectromètre de masse ultra-haute résolution Orbitrap™) a été ajoutée pour obtenir une acquisition multispectre (CID+HCD+ETD). Cette association a permis de réaliser des séquençages *De Novo* presque complet de mélanges de protéines (entre 60 et 200 acides aminés) avec une précision de détermination de séquençage de 99%, permettant ainsi d'envisager la caractérisation de petites protéines telles que des toxines issues de venins [39]. De plus, ces méthodes d'activation complémentaires sont également adaptées aux modifications post-traductionnelles. Il a par exemple été démontré que le CID/HCD a permis de caractériser la structure peptidique d'un peptide glycosylé ainsi que d'identifier la structure du sucre, tandis que l'ETD a permis de localiser la modification en maintenant la liaison entre le sucre et le squelette peptidique [40]. Il existe des différences de rapidité de balayage entre les méthodes d'activation (notamment entre l'ETD et l'HCD) qui pourraient limiter le recouvrement de séquence [39–41]. Néanmoins, l'ajout de l'ETD dans la séquence MS/MS CID/HCD a permis d'obtenir des séquençages *de novo* plus long et plus précis que le CID ou l'HCD seuls [39]. Le compromis entre le taux de balayage et le nombre de peptides identifiés pourra technologiquement être levé avec une nouvelle génération de spectromètres de masse. Pourtant, malgré le fait que la combinaison des différentes méthodes d'activation soit déjà utilisée depuis un certain nombre d'années [42], les logiciels d'interprétation ne permettent pas encore d'assigner les ions issus des diverses méthodes d'activation sur un même spectre ce qui peut devenir une limite à l'utilisation de cette technologie [43].

Il a été discuté précédemment que l'utilisation de certains agents d'ionisation comme le sodium ou le magnésium permet d'obtenir des ions complémentaires à la fragmentation des peptides monoprotonés en CID, augmentant ainsi la couverture de séquence. En ETD, la cationisation par certains métaux a également été étudiée. Pour ce faire, différents peptides ont été cationisés par divers ions métalliques alcalino-terreux divalents (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, et Ba^{2+}) [44], par des éléments du groupe IIB (Zn^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}) [45] ou encore par les métaux de transitions suivants : Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} et Cu^{2+} [46].

Les spectres MS/MS générés à partir de la cationisation des alcalino-terreux sont similaires quel que soit l'agent d'ionisation, mais sont surtout complémentaires aux spectres des peptides protonés correspondant. Des adduits métalliques (sous forme $[M+Cat]^{2+}$ et $[M+Cat-H]^{+}$) et non métalliques sont observés sur ces spectres, ces derniers peuvent être expliqués par une forme zwitterionique impliquant le groupe amino N-terminal ou des fonctions sur les chaine latérales des résidus [44].

Concernant la cationisation par les ions métalliques du groupe IIB, les spectres générés selon l'agent d'ionisation sont quant à eux différents. La fragmentation des peptides cationisés par le Zn^{2+} a généré des ions classiques de l'ECD/ETD soient les ions c et z, tandis que la cationisation par Cd^{2+} et Hg^{2+} a permis de produire des ions de type a ainsi que des ions issus de perte de neutres [45]. Néanmoins, aucune amélioration pour le recouvrement de séquence n'a été gagnée.

Pour la fragmentation des peptides cationisés par les différents métaux de transition précédemment cités, ainsi que par le Mn^{2+} tout comme pour le Zn^{2+} et les alcalino-terreux, des ions c et z classiquement retrouvés sur les spectres MS/MS ECD/ETD ont été générés. Concernant Fe^{2+}, Co^{2+}, et Ni^{2+}, des ions de type a et y contenant le métal sont retrouvés sur les spectres MS/MS tandis que la cationisation par le Cu^{2+} permet de produire des adduits métalliques de type b et y, qui sont généralement retrouvés sur des spectres MS/MS CID [46,47]. Il semblerait que la configuration électronique des ions métalliques soit un facteur important dans la fragmentation de ces peptides [46].

En outre, la dissociation en ECD/ETD de peptides de poids moléculaire d'environ 1000 Da produisant des ions monochargés en ESI a également été approfondie en les cationisant par des métaux de la famille des lanthanides. Ces éléments étant trivalent génèrent des peptides dichargés voir des peptides trichargés pour les séquences plus longues, afin de pouvoir les analyser en ECD. La capture d'électron se réalise alors par le site de protonation situé à distance de l'ion métallique et génère la formation d'ions c et z [48].

Plus classiquement, la cationisation au sodium de peptoïdes en ECD a également été étudiée sous forme doublement protonés et mixtes protonés-sodés. Les voies de fragmentations de ces ions se sont avérées être différentes, tout en gardant des ions de type c et z : selon l'emplacement du sodium sur l'ion mixte, les fragments N- ou C-terminaux sembleraient être stabilisés ; aucun ion de type y est observé sur le spectre MS/MS des peptoïdes ; et l'emplacement du résidu basique ne semble pas avoir d'influence sur les schémas de fragmentation [49].

D'après cette étude bibliographique, en appoint des résultats obtenus précédemment en fragmentation CID de petits peptides sodés (chapitre 1), nous avons poursuivi nos investigations de méthodologies d'amélioration de recouvrement de séquence pour des peptides de taille moyenne. Ainsi, 14 séquences de masses de 1500 Da à 3000 Da ont été fragmentés en CID ainsi qu'en ETD, sous forme protonée ou mixte (sodé-protoné) à différents états de charge. Les peptides ont été regroupés selon différentes problématiques qui sont pertinentes en peptidomique et/ou protéomique :

- Peptides trypsiques
- Peptides amides, mimant des peptides endogènes potentiellement actifs biologiquement
- Quelques couples de peptides sous forme amide et acide, permettant ainsi d'étudier l'impact de la fonction C-terminale

2) Matériel et méthode

Les peptides analysés (voir Tableau 1) ont été synthétisés selon les protocoles conventionnels de synthèse en phase solide et purifiés par de la chromatographie liquide préparative en phase inverse. Dans le cadre des analyses, ils ont été dilués dans un mélange H_2O/CH_3CN (50/50, v/v) à 10^{-5}M. Une solution de NaCl a été ajoutée artificiellement (ratio molaire 1:1) afin d'augmenter l'intensité des adduits sodium sur les spectres MS.

Les échantillons ont été caractérisés sur un spectromètre de masse QTof Synapt G2-S (Waters, Milford, CA, USA) couplé à une source ESI. L'injection dans la source a été réalisée à l'aide d'un pousse seringue, avec un débit en moyenne de 10 µL.min^{-1}. La tension du capillaire a été adaptée à chaque ion analysé, allant de 0.7 à 2.5 kV. La source a été chauffée à 100 °C. L'azote composait le gaz nébulisant ainsi que le gaz de désolvatation, ce dernier étant chauffé à 250°C. Concernant l'analyseur, celui-ci a été calibré sur une méthode de 1 acquisition.s^{-1} sur une gamme de masse allant de 50 à 3000 Da en mode positif pendant 3 minutes. Ainsi, une centaine de spectres ont été additionnés pour générer les spectres MS/MS finaux. Les données ont été enregistrées et traitées sur le logiciel MassLynx (Waters).

Des expériences de MS/MS sur des ions multichargés (2^+, 3^+ et 4^+ selon les peptides) cationisés par des protons ou un ion sodium ont été réalisées avec les méthodes d'activation CID et ETD. Pour la première, l'argon a été utilisé comme gaz de collision dans la partie quadripôle de l'analyseur. L'énergie de collision appliquée a été modifiée pour chaque peptide individuellement. Afin de fragmenter les peptides par la méthode d'activation ETD, du 1,4-dicyanobenzene est injecté dans la source pour

générer une source d'anions, puis les ions produits sont fragmentés dans la cellule Trap de l'analyseur (hauteurs de vague comprises entre 0.1 et 0.3 V). Afin d'étoffer les spectres MS/MS obtenus suite à une activation ETD, une énergie de collision a été appliquée sur certains peptides dans la cellule Transfer du spectromètre de masse.

Tableau 1 : Séquences de peptides amides et acides fragmentés selon deux méthodes d'activation (CID et ETD), sous différents états de charge (2^+, 3^+, 4^+), ionisés par des protons ou cation sodium

	N°	Séquence	$[M+2H]^{2+}$		$[M+H+Na]^{2+}$		$[M+3H]^{3+}$		$[M+2H+Na]^{3+}$		$[M+4H]^{4+}$		$[M+3H+Na]^{4+}$	
			CID	ETD	CID	ETD	CID	ETD	CID	ETD	CID	ETD	CID	ETD
Peptides non trypsiques amidés	1a	VLHDFAFAMVGPLAEYK-NH_2*	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	2	GFITDWAGIRWVGFIVPK-NH_2	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	○	○	○	○
	3a	YENGLIFMLAFAPLVHIWEAGAPFK-NH_2*	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	4	GFITDWAGIRWVGFIVPR-NH_2	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	5a	CLVAHIGSWVAAWAYGIPVIHVGR-NH_2*	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	6	GFITDWAGIRWVGFIVPS-NH_2	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	○	○	○	○
	7	IGLAGWIVFAPIGLVWFAGLPVIAP-NH_2	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	8	VGLGAVPIWGLVFPALGWAIFGV-NH_2	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	○	○	○	○
Peptides trypsiques	1b	VLHDFAFAMVGPLAEY**K***	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	9	GFITDWAGILWVGFIVP**K**	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	○	○	○	○
	3b	YENGLIFMLAFAPLVHIWEAGAPF**K***	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	10	GVAFGGVHMALGHFTAWV**K**	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	11	GFITDWAGILWVGFIVP**R**	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	○	○	○	○
	5b	CLVAHIGSWVAAWAYGIPVIHVG**R***	✓	○	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

✓ Spectre MS/MS généré

○ Ion non présent sur le spectre

* Peptides présents sous forme amide (a) et acide (b)

3) Résultats

a) Exemple d'interprétation des résultats pour un peptide

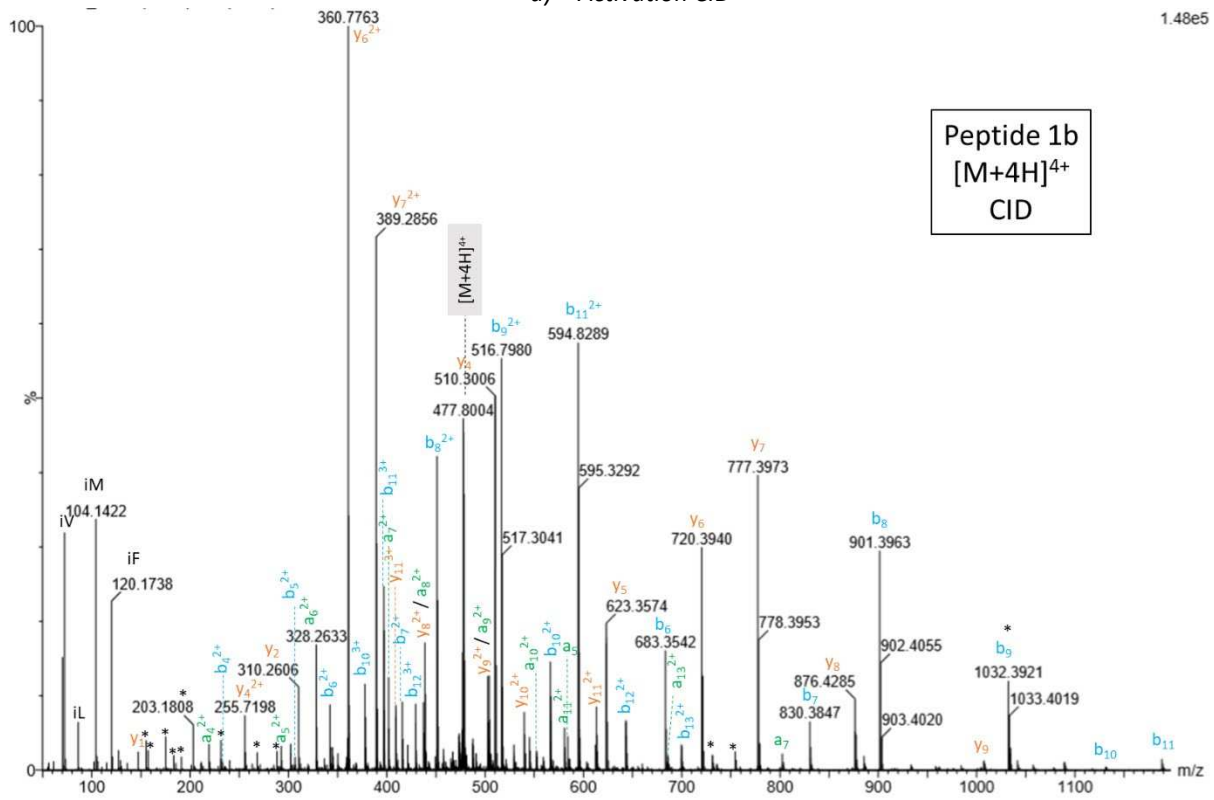
Chaque spectre MS/MS issu de la dissociation des peptides du Tableau 1 sous différents états de charges et différentes activations a été interprété manuellement. Seuls les ions de séquence attendus pour chaque méthode d'activation comme décrit en introduction ont donc été recherchés sur les spectres MS/MS (b, a et y pour une activation CID ; c, z et y pour une activation ETD). La dissociation des peptides sodés ayant démontré la possibilité de produire en CID des ions de type c (chapitre 1), ces ions seront également recherchés (ainsi que les ions z complémentaires) lors de l'ajout d'un cation sodium pour l'ionisation du peptide.

A partir de ces spectres, plusieurs données ont été extraites, concernant le recouvrement de séquence, le nombre d'ions assignés, la quantité d'ions C- ou N-terminaux, le nombre d'ions par type de fragments de séquence ainsi que l'état de charge de ces ions. Les résultats obtenus sont illustrés par l'intermédiaire d'un seul peptide représentatif (1b dans le Tableau 1).

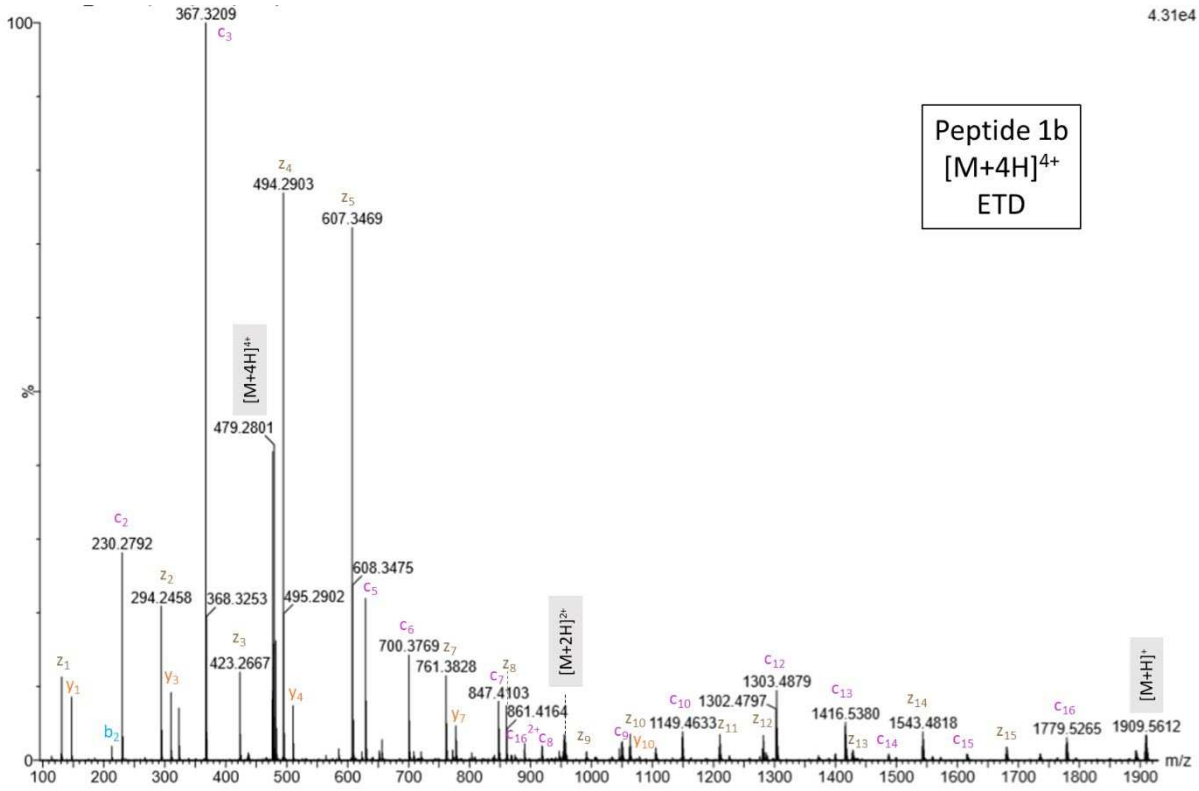
Ci-dessous, des exemples de spectre obtenus sous activation CID et ETD du peptide 1b multiprotoné (Figure 2) (les spectres MS/MS issus de la dissociation des autres états de charges sont montrés en **Annexe 4-3.1**).

Figure 2 : Spectres MS/MS du peptide 1b du Tableau 1 sous forme $[M+4H]^{4+}$

a) Activation CID



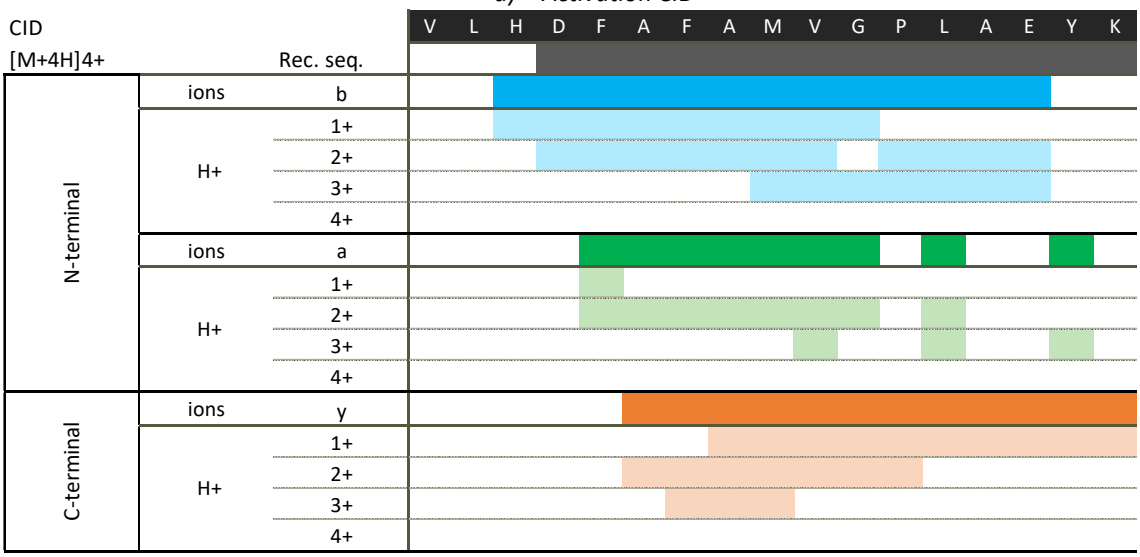
b) Activation ETD



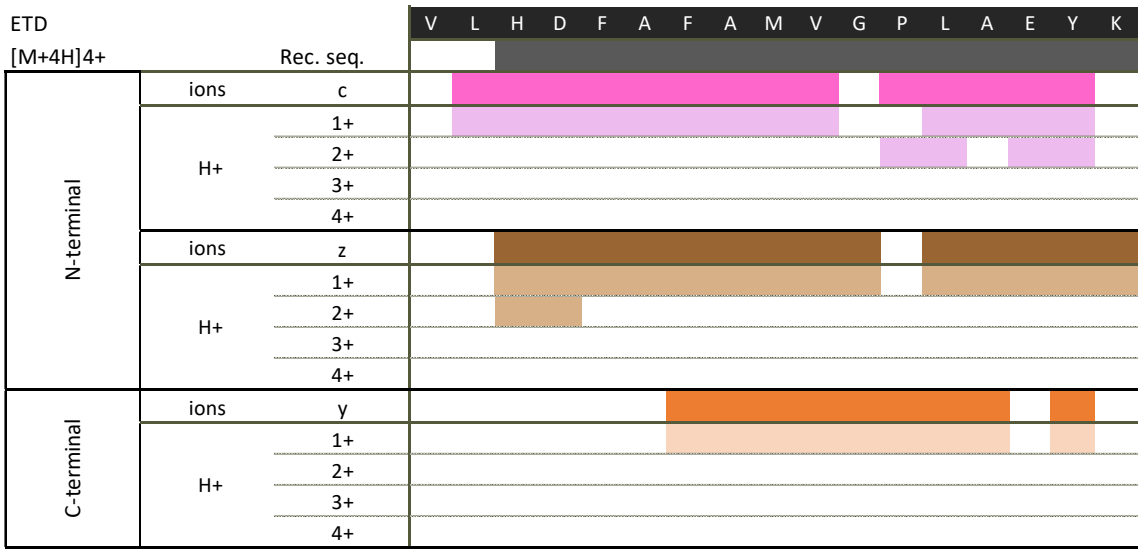
Si l'ensemble des spectres sont comparés entre eux, on remarque que l'ajout d'un cation sodium augmente la quantité d'ion à assigner, compliquant alors l'interprétation du spectre MS/MS. Cependant, cela pourrait permettre d'améliorer le recouvrement de séquence. De ce fait, une représentation de recouvrement de séquence a été réalisée pour chaque spectre MS/MS, en prenant en compte la contribution de chaque type d'ion, ainsi que de son état d'ionisation (voir Figure 3 pour les recouvrements de séquence correspondant aux spectres de la Figure 2 ; les autres sont retrouvés en **Annexe 4-3.2**).

<u>Figure 3 :</u> Recouvrement de séquence du peptide 1b du Tableau 1 dissocié sous forme [M+4H]$^{4+}$

a) Activation CID



b) Activation ETD



L'activation du peptide sous forme $[M+3H]^{3+}$ en ETD permet de légèrement améliorer le recouvrement de séquence comme démontré dans la Figure 3. De plus, à partir de ces représentations, il est possible de voir que l'ajout d'un cation sodium permet de générer des ions de plus grande masse que lorsque le peptide est totalement protoné. Ces ions sodés permettent de compléter le recouvrement de séquence obtenu à partir des ions protonés, qui eux sont généralement de plus petite masse. Néanmoins, cet ajout de cation sodium ne permet globalement pas de générer des successions d'ions suffisantes pour pouvoir retrouver des grands morceaux de séquence. Cela peut gêner pour retrouver la séquence d'un peptide inconnu, en plus d'ajouter un certain nombre d'ions à assigner sur les spectres MS/MS.

Cependant, ces résultats doivent être confirmés par l'analyse d'autres peptides afin de voir si certains comportements sont récurrents ou non, pour ainsi essayer de tirer une conclusion fiable. Pour cela, des représentations plus simplifiées de ces résultats ont été conçues afin de rendre plus lisible l'analyse des résultats (voir **Annexe 4-3.3**).

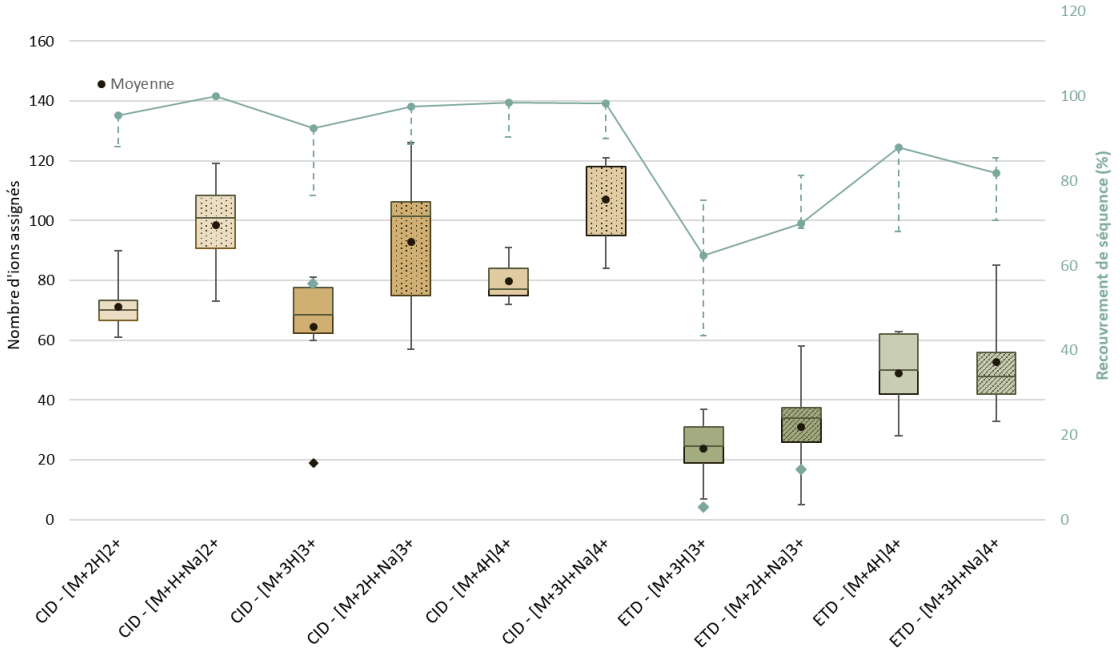
b) Dissociations de peptides trypsiques et non trypsiques amidés

Le nombre d'ions assignés sur chaque spectre MS/MS a été comparé au recouvrement de séquence pour les peptides trypsiques ou non trypsiques amidés (voir Figure 4).

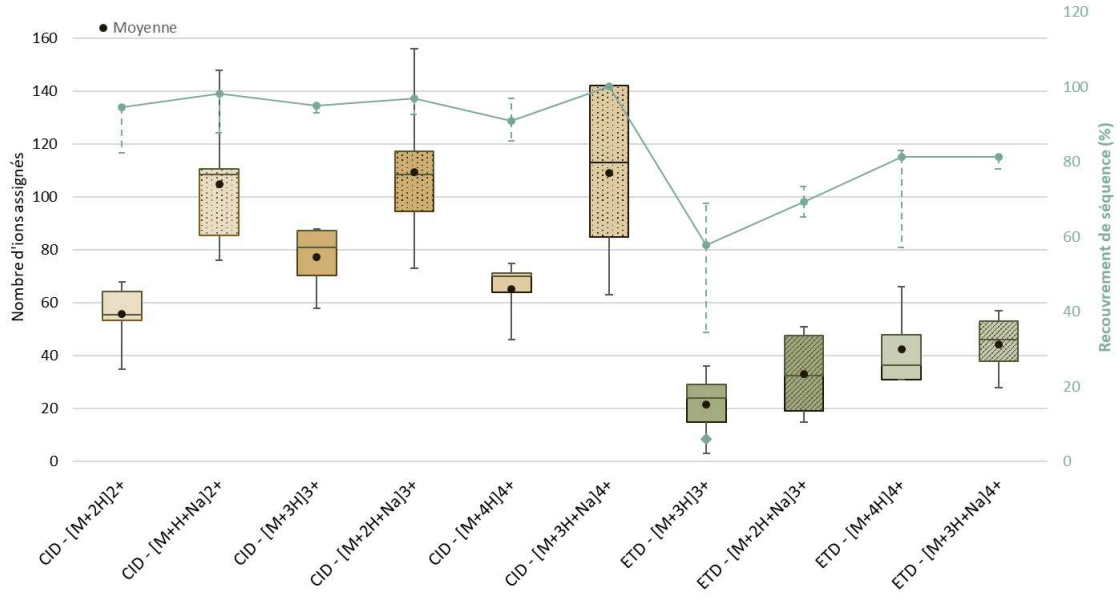
Il ne semble pas exister de différences majeures entre la dissociation des peptides trypsiques et non trypsiques amidés. Par ailleurs, la dissociation des ions trichargés et quadrichargés protonés ou mixtes ne s'avère pas plus bénéfique que la dissociation des ions dichargés par rapport aux recouvrements de séquence, qui sont dans une certaine mesure identiques. De plus, la quantité d'ions à assigner augmente avec le nombre de charge lorsque l'ion précurseur se trouve sous forme mixte. Les spectres MS/MS sont donc plus compliqués à interpréter, pour obtenir un résultat similaire à la dissociation du peptide dichargé avec un ion sodium. En CID, la dissociation des ions précurseurs avec des charges plus élevées ne permet donc pas d'améliorer le recouvrement de séquence contrairement aux peptides dissociés en ETD.

<u>Figure 4 :</u> Nombre d'ions assignés par état de charge et selon le mode d'activation employé par rapport au recouvrement de séquence

a) Peptides non trypsiques amidés



b) Peptides trypsiques



Parallèlement, l'ajout d'un cation sodium permet d'obtenir de meilleurs recouvrements de séquence lors de l'utilisation de la méthode d'activation CID par rapport à l'ETD. Cela peut s'expliquer par le fait que pour la majorité des peptides dissociés en ETD, la production du peptide à des états de charges inférieurs est majoritaire comparée à la génération d'ions fragments (formation de l'ion $[M+3H]^{3+}$ et $[M+2H]^{2+}$ à partir de la dissociation de l'ion précurseur $[M+4H]^{4+}$ par exemple). De plus, comme le montre la Figure 2, si les ions fragments sont formés, leurs intensités relatives sont faibles et il devient donc difficile de les distinguer du bruit de fond dans certains cas.

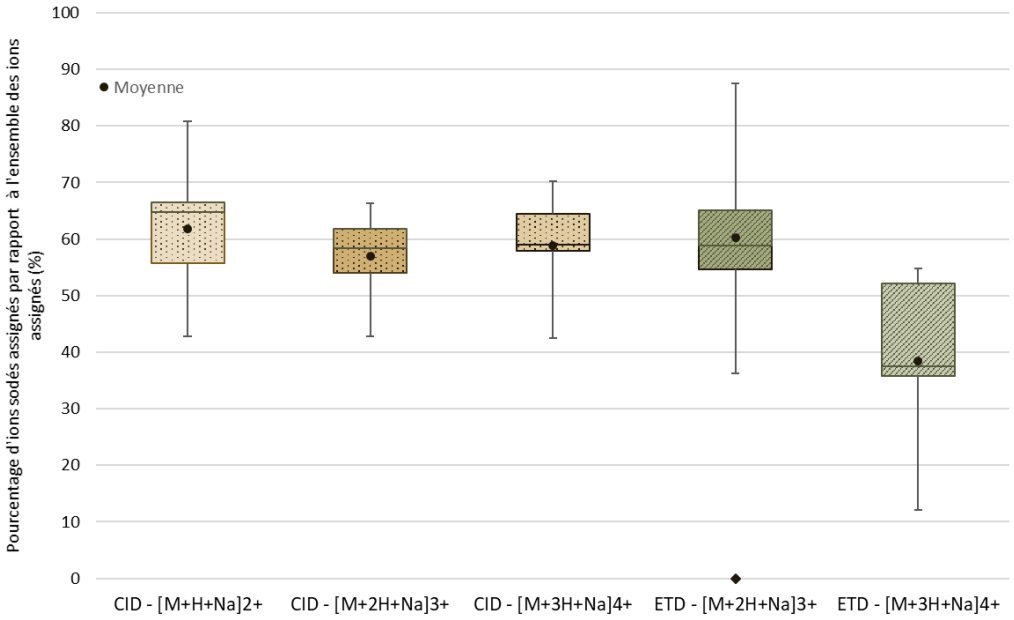
Cependant, sur les 46 états de charge mixtes dissociés en CID et ETD pour l'ensemble des peptides étudiés (voir Tableau 1), l'activation ETD a permis de compléter les données issues de l'activation CID pour seulement 7 états de charges (ce qui correspond à 15.2 % des cas). Parmi ces états de charge, 4 correspondent à des ions de peptides trypsiques et 3 à des peptides non trypsiques sodés, ce qui confirme qu'il n'y a pas de différence de fragmentation entre les deux types de peptides. De plus, sur la totalité des états de charges décrits, 6 sont totalement protonés et un seul contient un cation sodium. Ce résultat permet alors de valider le fait que l'adduit sodium permet d'obtenir de plus grands recouvrements de séquence principalement lorsque le peptide est simplement protoné.

De plus, la dissociation des peptides sodés en CID présente également une autre particularité. En effet, des ions c et z, normalement issus de la fragmentation de peptides suite à une activation ECD/ETD, sont retrouvés sur les spectres MS/MS sous forme protonée ou sodée. Toutefois, la présence de ces ions c qui sont majoritaires par rapport aux ions z ne semblent pas spécifiques à un type de résidu en particulier. En effet, ils peuvent être issus de la fragmentation de la liaison amide en position C- ou N-terminale de résidus aromatiques (F, Y, W), acides (D, E), amides (N, Q), basiques (R, H) ou encore au niveau du résidu G. Certaines dissociations sont cependant retrouvées systématiquement : en C-ter du résidu R ou en C-ter de la proline. Dans le cas d'un séquençage *de novo*, la dissociation d'un peptide sodé en CID et ETD pourrait alors permettre d'indiquer la présence d'une proline puisque la fragmentation de la liaison C-ter du résidu se ferait suite à une activation CID, tandis que celle de la liaison N-ter serait annihilée par l'activation ETD.

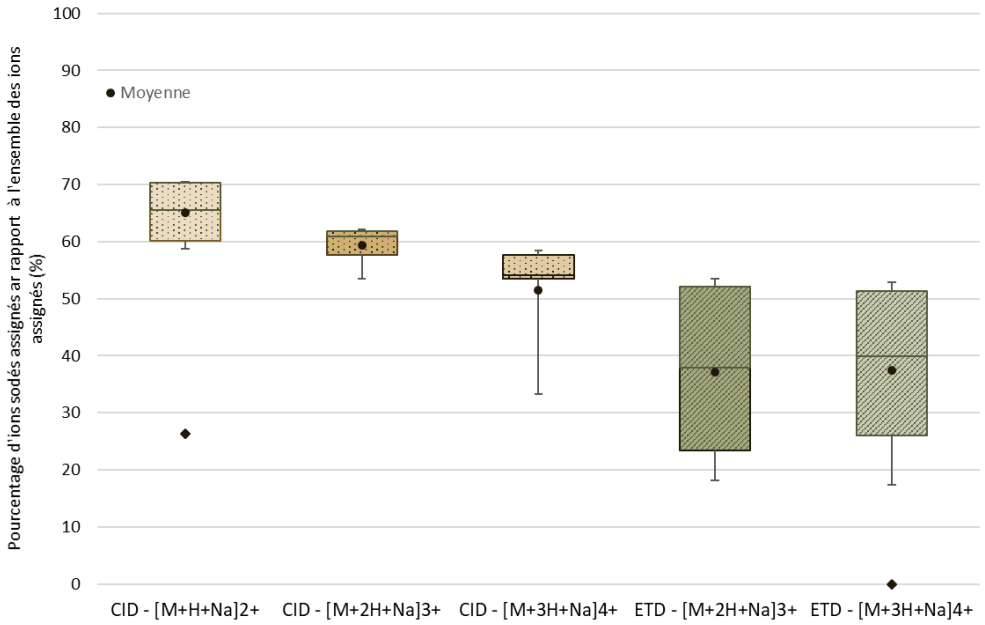
Bien que l'ajout d'un cation sodium permette d'améliorer le recouvrement de séquence plus ou moins significativement selon les peptides, ce protocole n'induit aucune dégradation de la performance de séquençage, le recouvrement de séquence n'est jamais abaissé peu importe la méthode d'activation utilisée (CID et ETD). La proportion d'ions sodés assignés issus de la dissociation des ions précurseurs mixtes sodés a été représentée en Figure 5.

Figure 5 : Pourcentage d'ions sodés selon état de charge et la méthode d'activation employée par rapport au nombre d'ions assignés

a) Peptides non trypsiques amidés

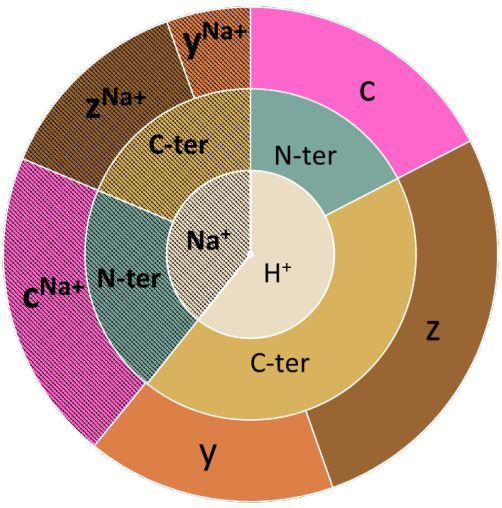


b) Peptides trypsiques

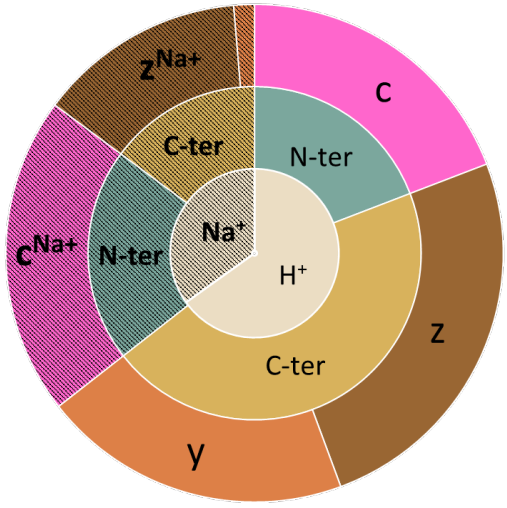


La dissociation des ions précurseurs mixtes génère des ions fragments sodés à hauteur de 60% en moyenne, permettant alors des améliorations de recouvrement de séquence démontrés en Figure 6. On peut cependant noter une différence pour les peptides trypsiques activés en ETD, qui présentent beaucoup plus de disparité par rapport aux peptides non trypsiques amidés. Cette différence pourrait être expliquée par la présence du résidu Arg C-terminal des peptides trypsiques, qui possède une forte affinité avec le cation sodium par la fonction guanidine de la chaine latérale. Cette interaction du métal alcalin avec ce résidu basique empêcherait alors la génération d'une plus grande diversité d'ions fragments sodés. La proportion d'ions sodés N- et C-terminaux a alors été examinée pour évaluer cette hypothèse (voir Figure 6 ; les autres proportions d'ions sodés en fonction de l'état de charge et de la méthode l'activation sont présentés en **Annexe 4-3.4**).

Peptides non trypsiques amidés



Peptides trypsiques



<u>Figure 6 :</u> Proportions d'ions N- et C-terminaux protonés et sodés lors de la dissociation de peptides trypsiques et non trypsiques amidés sous forme $[M+3H+Na]^{4+}$ sous activation ETD

Les ions qui pourraient traduire la séquestration de l'ion sodium par le résidu C-terminal Arg (ions de type z et y) se retrouvent dans les mêmes proportions que pour les peptides trypsiques amidés. De plus, la proportion d'ions sodés par rapport à celle des ions protonés issus d'un ion précurseur mixte sodé diminue légèrement lorsque les peptides trypsiques sont dissociés. Le résidu basique C-terminal ne semble donc pas influer sur la fragmentation de ces peptides sodés.

Afin de voir si la fonction C-terminale du peptide peut avoir une incidence sur les comportements de fragmentation, les dissociations de 3 couples de peptides du Tableau 1 ont été également comparées entre elles.

c) Dissociations de peptides amide et acide

Pour comparer les dissociations des peptides amide et acide, comme précédemment, le nombre d'ions assignés sur chaque spectre MS/MS a été comparé au recouvrement de séquence, en mettant également en évidence la proportion d'ions N- ou C-terminaux (voir Figure 7).

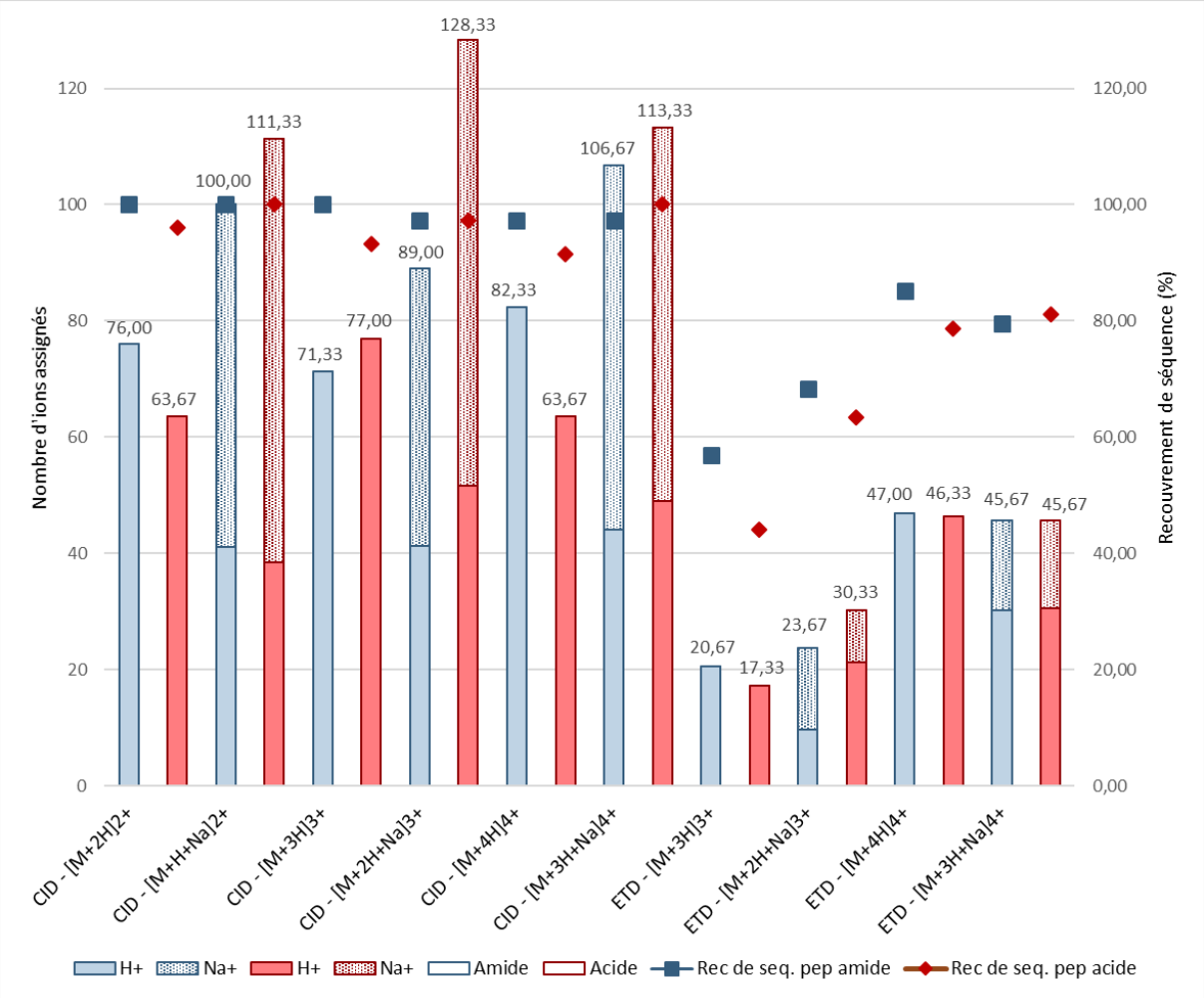


Figure 7 : Nombre d'ions assignés par état de charge et selon le mode d'activation employé par rapport au recouvrement de séquence pour des peptides amide et acide

Suite à une activation CID, les peptides acides sodés semblent produire plus d'ions de séquence par rapport à leurs homologues amides, pour des recouvrements de séquence semblables. En ETD, une telle variation ne semble pas exister. La fonction amide ou acide carboxylique C-terminale ne semble donc pas interférer dans la fragmentation des peptides sodés activés en ETD contrairement au CID. La proportion d'ions N- ou C-terminaux sodés suite à la dissociation de précurseurs mixtes (voir Figure 8 et **Annexe 4-3.5**) ne permet également pas de différencier les deux types de peptides contrairement à la dissociation de peptides amides et acides monochargés sodés qui présentaient de plus grande différence.

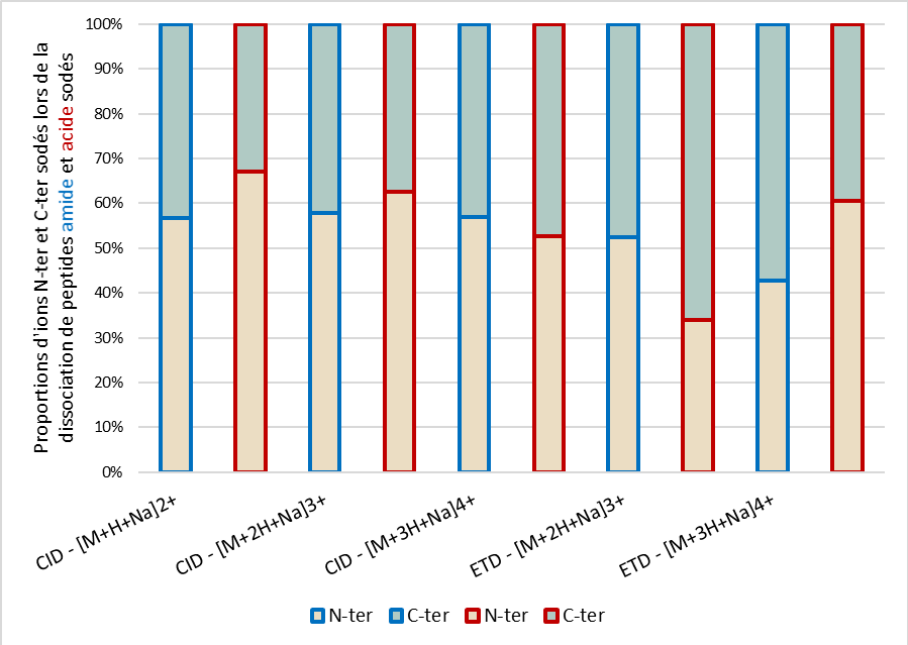


Figure 8 : Proportion d'ions N- et C-terminaux sodés lors de la dissociation de peptides amide et acide sodés, rapporté à 100%

4) Conclusion

La méthode d'activation ETD ne semble pas induire de meilleurs recouvrements de séquence que ceux obtenus lorsque les peptides sodés sont dissociés en CID, dans le cadre d'un séquençage *de novo*. Il devient alors plus avantageux de dissocier les adduits sodium de peptides ayant une masse comprise entre 1500 et 3000 $g.mol^{-1}$ sous forme dichargée que de mettre en oeuvre l'ETD, qui en plus, n'est pas disponible sur tous les spectromètres de masse. De plus contrairement à la dissociation des peptides sodés monochargés, la différenciation des peptides amides et acides n'est pas possible sur des ions multichargés contenant un seul ion sodium. Il reste envisageable de dissocier des peptides ionisés avec plusieurs ions sodium (par exemple $[M+2Na]^{2+}$, $[M+3Na]^{3+}$ ou encore $[M+H+2Na]^{3+}$) ou alors d'utiliser d'autres ions métalliques qui pourraient engendrer des structures tridimensionnelles différentes en phase gazeuse selon la fonction terminale et la taille des peptides sélectionnés.

5) Références

1. Dupree EJ, Jayathirtha M, Yorkey H, Mihasan M, Petre BA, Darie CC. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes*. 2020;8(3):14. doi:10.3390/proteomes8030014

2. Channaveerappa D, Ngounou Wetie AG, Darie CC. Bottlenecks in Proteomics: An Update. In: Woods AG, Darie CC, eds. *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*. Vol 1140. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2019:753-769. doi:10.1007/978-3-030-15950-4_45

3. Pandeswari PB, Sabareesh V. Middle-down approach: a choice to sequence and characterize proteins/proteomes by mass spectrometry. *RSC Adv*. 2019;9(1):313-344. doi:10.1039/C8RA07200K

4. Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther*. 2002;4(3):242-250.

5. McDonald WH, Yates JR. Shotgun Proteomics and Biomarker Discovery. *Disease Markers*. 2002;18(2):99-105. doi:10.1155/2002/505397

6. Brown KA, Melby JA, Roberts DS, Ge Y. Top-down proteomics: challenges, innovations, and applications in basic and clinical research. *Expert Review of Proteomics*. 2020;17(10):719-733. doi:10.1080/14789450.2020.1855982

7. Vinh J. Proteomics and proteoforms: Bottom-up or top-down, how to use high-resolution mass spectrometry to reach the Grail. In: *Fundamentals and Applications of Fourier Transform Mass Spectrometry*. Elsevier; 2019:529-567. doi:10.1016/B978-0-12-814013-0.00017-X

8. Lanucara F, Eyers CE. Mass Spectrometric-Based Quantitative Proteomics Using SILAC. In: *Methods in Enzymology*. Vol 500. Elsevier; 2011:133-150. doi:10.1016/B978-0-12-385118-5.00008-6

9. Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(12):952-958. doi:10.1038/nrm2067

10. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci*. 2017;55(2):182-196. doi:10.1093/chromsci/bmw167

11. Aggarwal K. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 2006;5(2):112-120. doi:10.1093/bfgp/ell018

12. Noirel J, Evans C, Salim M, et al. Methods in Quantitative Proteomics: Setting iTRAQ on the Right Track. *CP*. 2011;8(1):17-30. doi:10.2174/157016411794697408

13. Kirkpatrick DS, Gerber SA, Gygi SP. The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods*. 2005;35(3):265-273. doi:10.1016/j.ymeth.2004.08.018

14. Melby JA, Roberts DS, Larson EJ, et al. Novel Strategies to Address the Challenges in Top-Down Proteomics. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2021;32(6):1278-1294. doi:10.1021/jasms.1c00099

15. Kim MS, Pandey A. Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Proteomics*. 2012;12(4-5):530-542. doi:10.1002/pmic.201100517

16. Schrader M, Schulz-Knappe P. Peptidomics technologies for human body fluids. *Trends in Biotechnology*. 2001;19(10):S55-S60. doi:10.1016/S0167-7799(01)01800-5

17. Schulz-Knappe P, Zucht HD, Heine G, Jürgens M, Hess R, Schrader M. Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2001;4(2):207-217. doi:10.2174/1386207013331246

18. Baggerman G, Boonen K, Verleyen P, De Loof A, Schoofs L. Peptidomic analysis of the larval Drosophila melanogaster central nervous system by two-dimensional capillary liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2005;40(2):250-260. doi:10.1002/jms.744

19. Che FY, Yan L, Li H, Mzhavia N, Devi LA, Fricker LD. Identification of peptides from brain and pituitary of Cpe(fat)/Cpe(fat) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(17):9971-9976. doi:10.1073/pnas.161542198

20. Riley NM, Westphall MS, Coon JJ. Sequencing Larger Intact Proteins (30-70 kDa) with Activated Ion Electron Transfer Dissociation. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2018;29(1):140-149. doi:10.1007/s13361-017-1808-7

21. Riley NM, Westphall MS, Coon JJ. Activated Ion Electron Transfer Dissociation for Improved Fragmentation of Intact Proteins. *Anal Chem*. 2015;87(14):7109-7116. doi:10.1021/acs.analchem.5b00881

22. Kim S, Mischerikow N, Bandeira N, et al. The generating function of CID, ETD, and CID/ETD pairs of tandem mass spectra: applications to database search. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(12):2840-2852. doi:10.1074/mcp.M110.003731

23. Zubarev RA, Zubarev AR, Savitski MM. Electron capture/transfer versus collisionally activated/induced dissociations: Solo or duet? *J Am Soc Mass Spectrom*. 2008;19(6):753-761. doi:10.1016/j.jasms.2008.03.007

24. Kollipara S, Agarwal N, Varshney B, Paliwal J. Technological Advancements in Mass Spectrometry and Its Impact on Proteomics. *Analytical Letters*. 2011;44(8):1498-1520. doi:10.1080/00032719.2010.520386

25. Syka JEP, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(26):9528-9533. doi:10.1073/pnas.0402700101

26. Mikesh LM, Ueberheide B, Chi A, et al. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2006;1764(12):1811-1822. doi:10.1016/j.bbapap.2006.10.003

27. Sobott F, Watt SJ, Smith J, Edelmann MJ, Kramer HB, Kessler BM. Comparison of CID versus ETD based MS/MS fragmentation for the analysis of protein ubiquitination. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2009;20(9):1652-1659. doi:10.1016/j.jasms.2009.04.023

28. Zhang Q, Frolov A, Tang N, et al. Application of electron transfer dissociation mass spectrometry in analyses of non-enzymatically glycated peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007;21(5):661-666. doi:10.1002/rcm.2884

29. Swaney DL, Wenger CD, Thomson JA, Coon JJ. Human embryonic stem cell phosphoproteome revealed by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(4):995-1000. doi:10.1073/pnas.0811964106

30. Juang YM, She TF, Chen HY, Lai CC. Comparison of CID versus ETD-based MS/MS fragmentation for the analysis of doubly derivatized steroids: CID versus ETD for steroids. *J Mass Spectrom*. 2013;48(12):1349-1356. doi:10.1002/jms.3300

31. Bertsch A, Leinenbach A, Pervukhin A, et al. De novo peptide sequencing by tandem MS using complementary CID and electron transfer dissociation. *Electrophoresis*. 2009;30(21):3736-3747. doi:10.1002/elps.200900332

32. Hart SR, Lau KW, Gaskell SJ, Hubbard SJ. Distributions of Ion Series in ETD and CID Spectra: Making a Comparison. In: Hamacher M, Eisenacher M, Stephan C, eds. *Data Mining in Proteomics*. Vol 696. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2011:327-337. doi:10.1007/978-1-60761-987-1_21

33. Good DM, Wirtala M, McAlister GC, Coon JJ. Performance Characteristics of Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Nov;6(11):1942-51. doi: 10.1074/mcp.M700073-MCP200.

34. Swaney DL, McAlister GC, Coon JJ. Decision tree–driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics. *Nat Methods*. 2008;5(11):959-964. doi:10.1038/nmeth.1260

35. Molina H, Matthiesen R, Kandasamy K, Pandey A. Comprehensive Comparison of Collision Induced Dissociation and Electron Transfer Dissociation. *Anal Chem*. 2008;80(13):4825-4835. doi:10.1021/ac8007785

36. Campbell JL, Hager JW, Le Blanc JCY. On performing simultaneous electron transfer dissociation and collision-induced dissociation on multiply protonated peptides in a linear ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2009;20(9):1672-1683. doi:10.1016/j.jasms.2009.05.009

37. Liu CW, Lai CC. Effects of Electron-Transfer Coupled with Collision-Induced Dissociation (ET/CID) on Doubly Charged Peptides and Phosphopeptides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011;22(1):57-66. doi:10.1007/s13361-010-0020-9

38. Datta R, Bern M. Spectrum fusion: using multiple mass spectra for de novo Peptide sequencing. *J Comput Biol*. 2009;16(8):1169-1182. doi:10.1089/cmb.2009.0122

39. Guthals A, Clauser KR, Frank AM, Bandeira N. Sequencing-Grade *De novo* Analysis of MS/MS Triplets (CID/HCD/ETD) From Overlapping Peptides. *J Proteome Res*. 2013;12(6):2846-2857. doi:10.1021/pr400173d

40. Lingdong Quan ML. CID,ETD and HCD Fragmentation to Study Protein Post-Translational Modifications. *Mod Chem Appl*. 2013;01(01). doi:10.4172/2329-6798.1000e102

41. Frese CK, Altelaar AFM, Hennrich ML, et al. Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J Proteome Res*. 2011;10(5):2377-2388. doi:10.1021/pr1011729

42. Horn DM, Zubarev RA, McLafferty FW. Automated de novo sequencing of proteins by tandem high-resolution mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(19):10313-10317. doi:10.1073/pnas.97.19.10313

43. Guthals A, Bandeira N. Peptide Identification by Tandem Mass Spectrometry with Alternate Fragmentation Modes. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(9):550-557. doi:10.1074/mcp.R112.018556

44. Eva Fung YM, Liu H, Chan TWD. Electron capture dissociation of peptides metalated with alkaline-earth metal ions. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2006;17(6):757-771. doi:10.1016/j.jasms.2006.01.014

45. Chen X, Chan WYK, Wong PS, Yeung HS, Chan TWD. Formation of Peptide Radical Cations ($M^{+\cdot}$) in Electron Capture Dissociation of Peptides Adducted with Group IIB Metal Ions. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011;22(2):233-244. doi:10.1007/s13361-010-0035-2

46. Chen X, Fung YME, Chan WYK, Wong PS, Yeung HS, Chan TWD. Transition Metal Ions: Charge Carriers that Mediate the Electron Capture Dissociation Pathways of Peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011;22(12):2232-2245. doi:10.1007/s13361-011-0246-1

47. Chen X, Wang Z, Li W, Wong YLE, Chan TWD. Effect of Structural Parameters on the Electron Capture Dissociation and Collision-Induced Dissociation Pathways of Copper(II)–Peptide Complexes. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*. 2015;21(4):649-657. doi:10.1255/ejms.1382

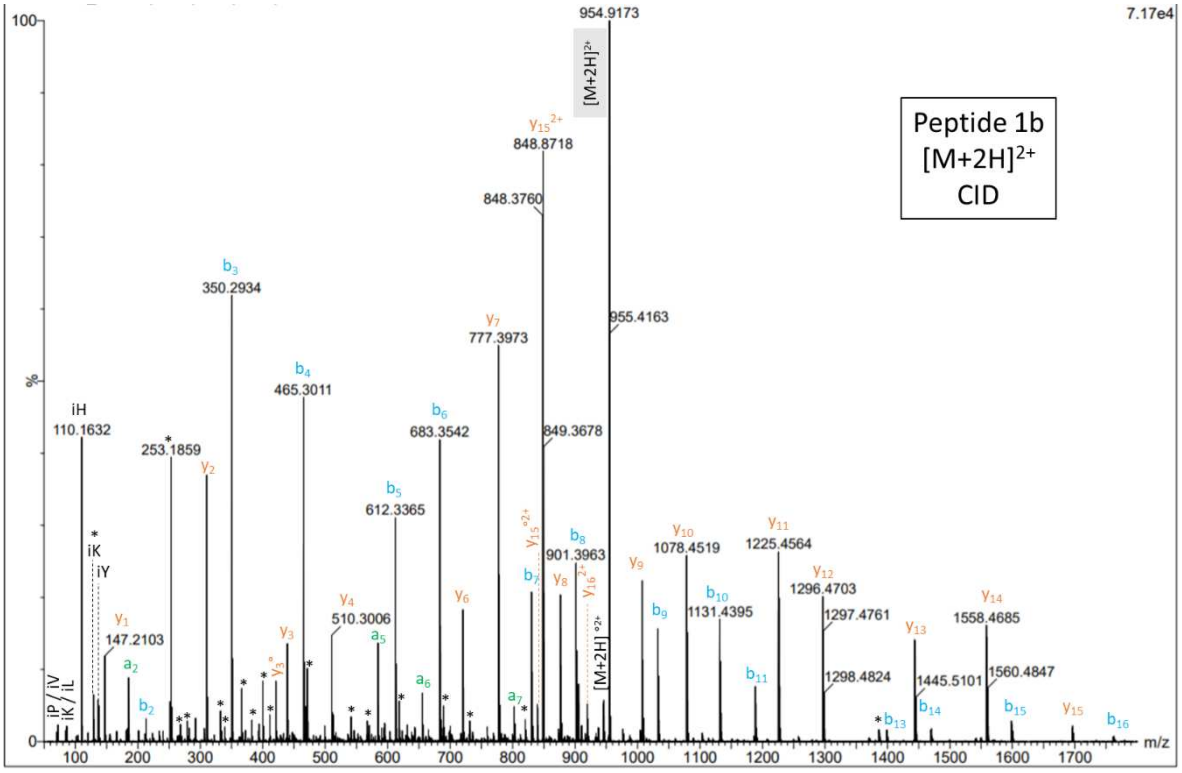
48. Flick TG, Donald WA, Williams ER. Electron Capture Dissociation of Trivalent Metal Ion-Peptide Complexes. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2013;24(2):193-201. doi:10.1007/s13361-012-0507-7

49. Bogdanov B, Zhao X, Robinson DB, Ren J. Electron Capture Dissociation Studies of the Fragmentation Patterns of Doubly Protonated and Mixed Protonated-Sodiated Peptoids. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2014;25(7):1202-1216. doi:10.1007/s13361-014-0869-0

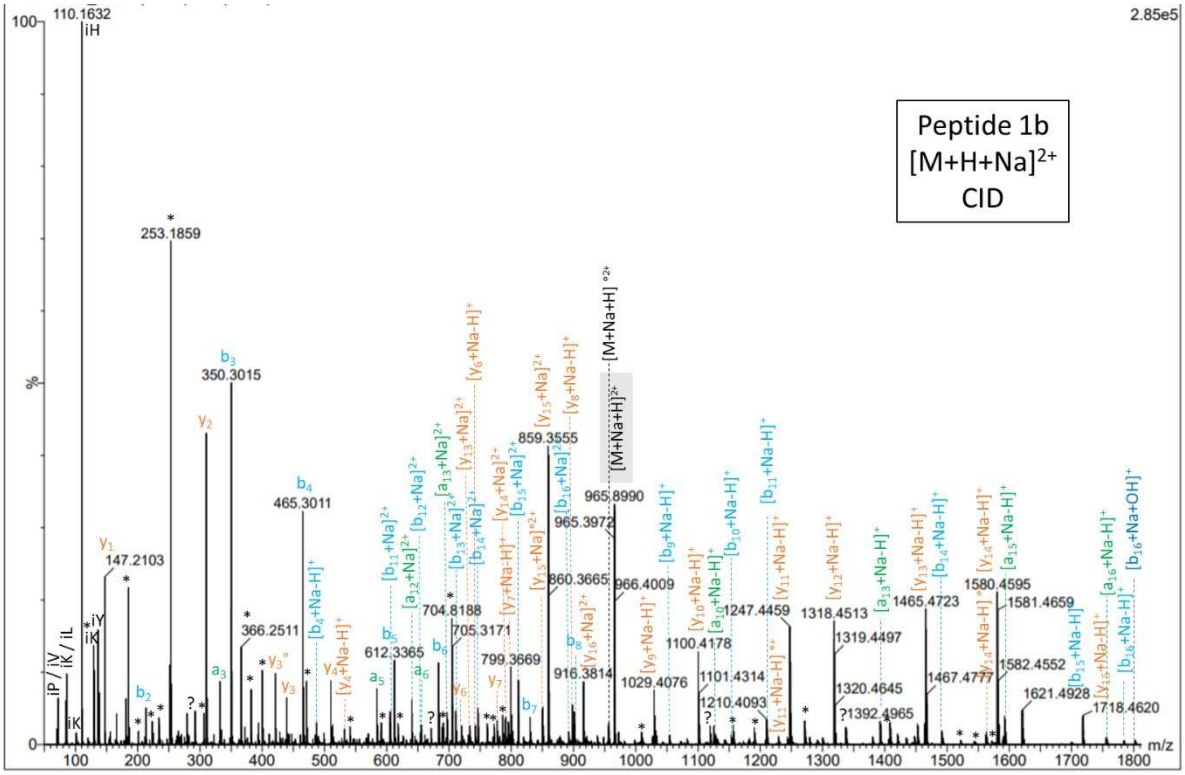
6) Annexes

a) Annexe 4-3.1 : Spectres MS/MS CID et ETD du peptide 1b sous différents états de charge

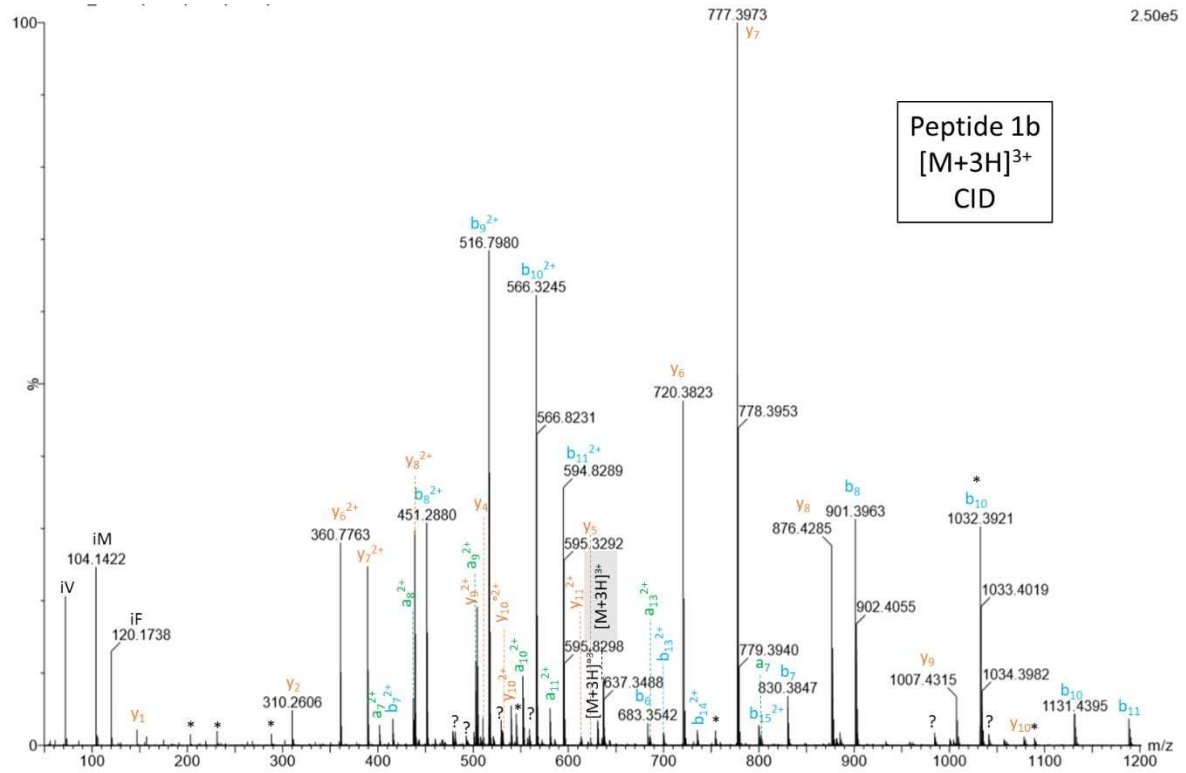
i) $[M+2H]^{2+}$

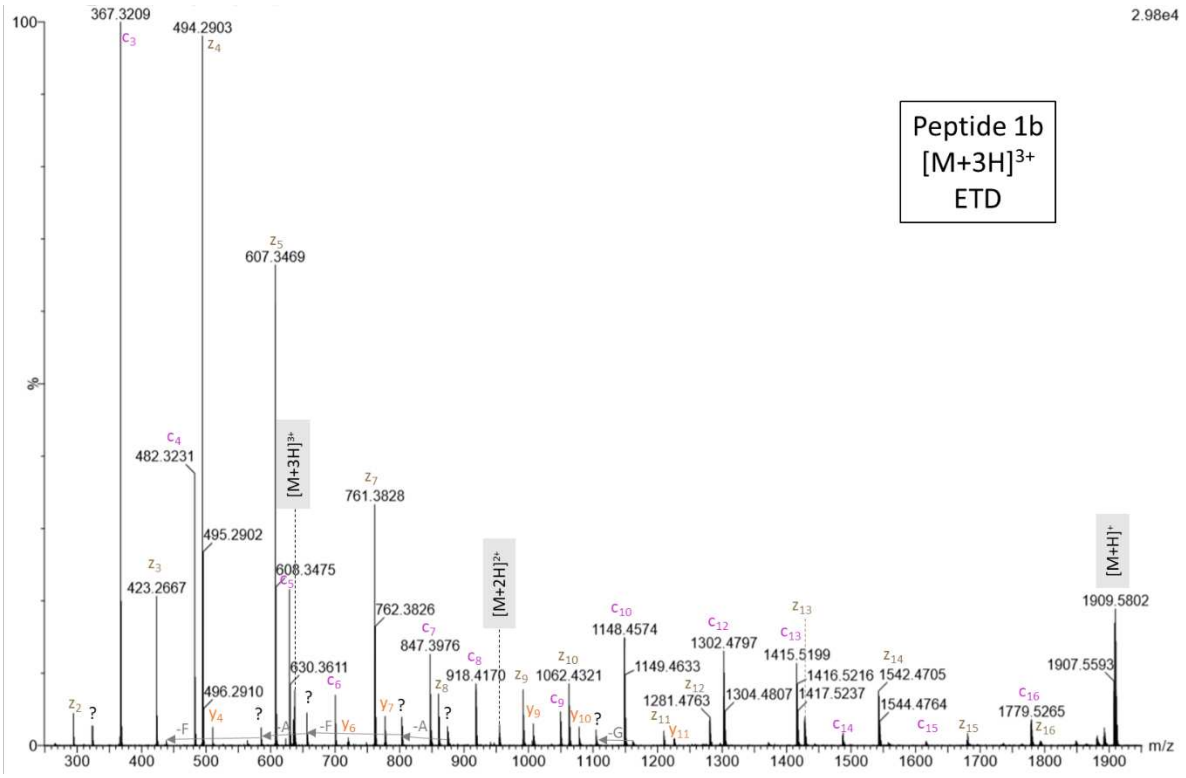


ii) $[M+H+Na]^{2+}$

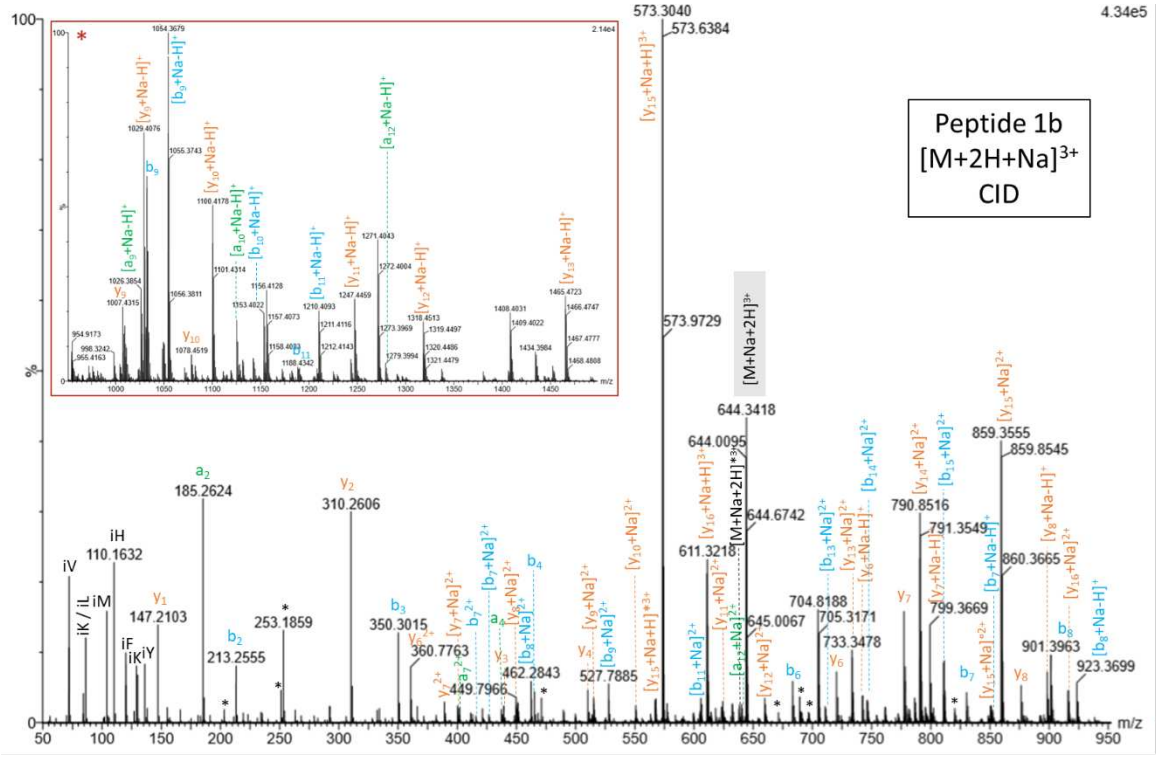


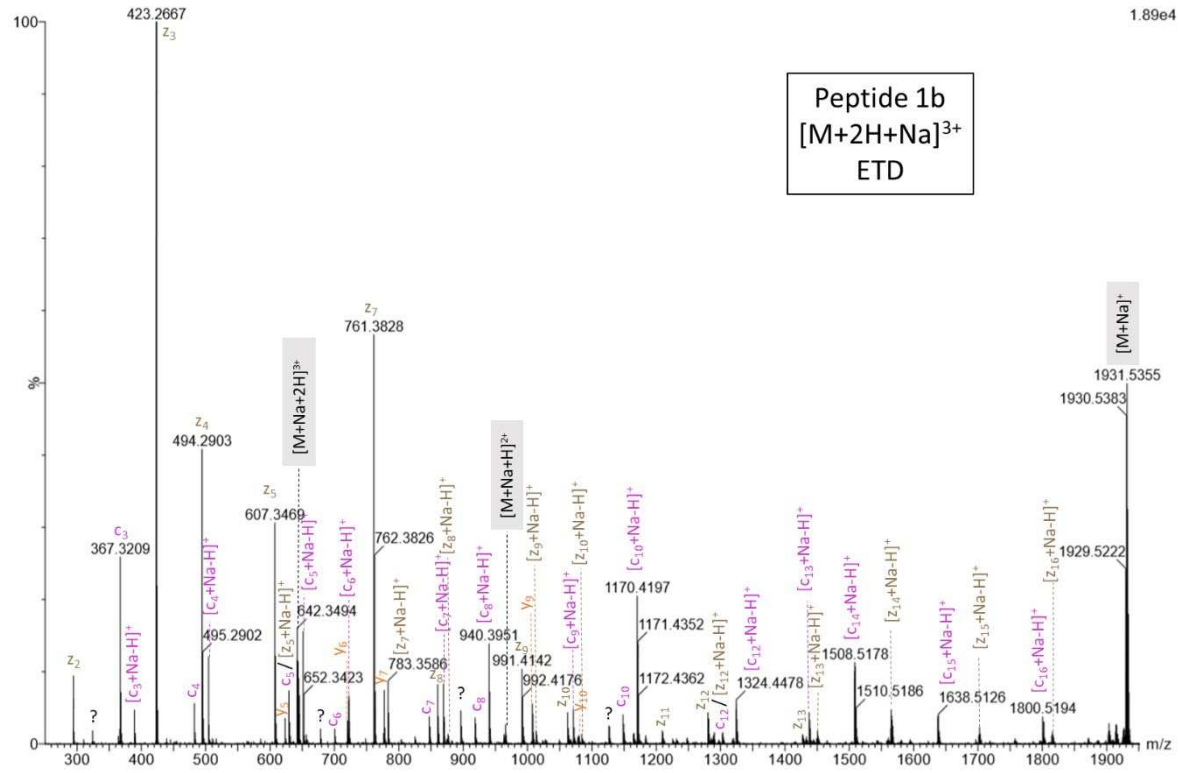
iii) [M+3H]$^{3+}$


Peptide 1b
[M+3H]3+
CID
2.50e5
777.3973
y7
b9 2+
516.7980
b10 2+
566.3245
y6
720.3823
778.3953
566.8231
b11 2+
594.8289
y8 2+
b8 2+
451.2880
y6 2+
360.7763
y4
y5
595.3292
y7 2+
iM
104.1422
iV
iF
120.1738
[M+3H]3+
595.8298
[M+3H]3+-H2O
637.3488
683.3542
779.3940
830.3847
876.4285
b8
901.3963
902.4055
b10
1032.3921
1033.4019
1034.3982
1131.4395
y9
1007.4315
y2
310.2606
y1
b11
m/z

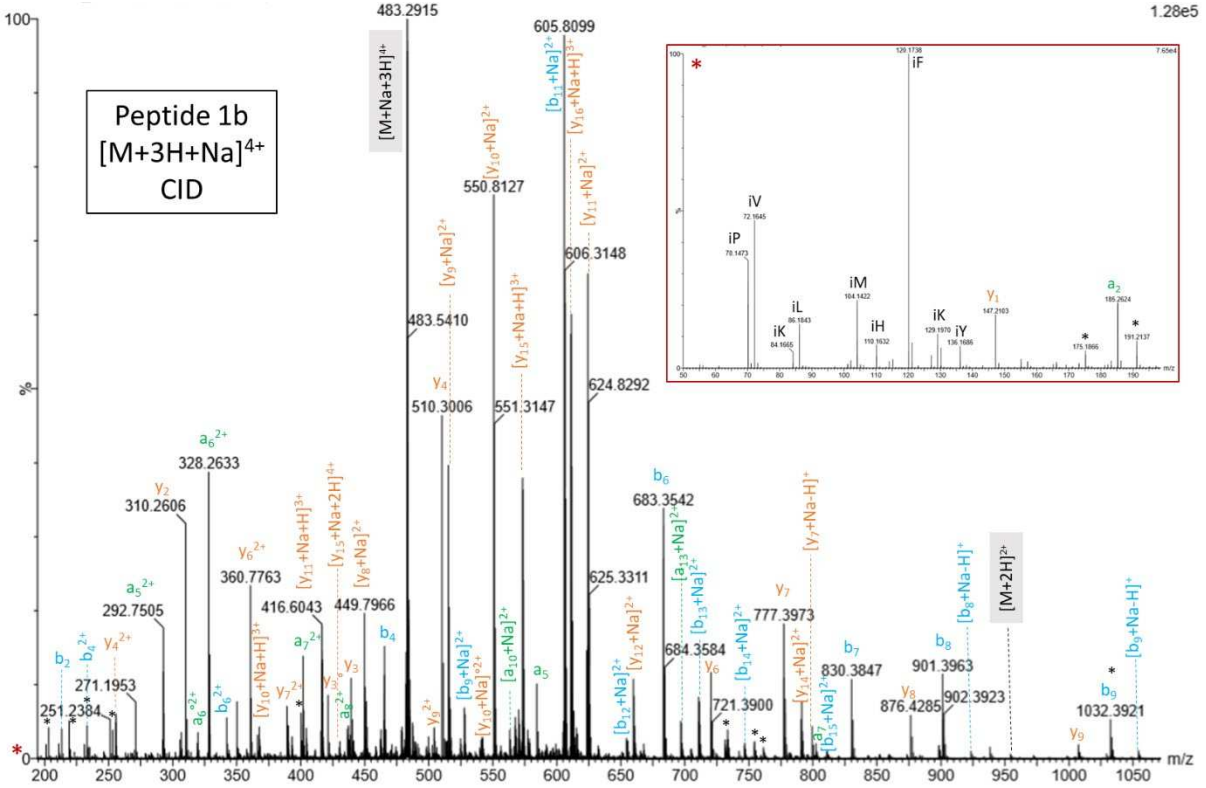

Peptide 1b
[M+3H]3+
ETD
2.98e4
367.3209
c3
494.2903
z4
z5
607.3469
[M+3H]3+
c4
482.3231
z7
761.3828
495.2902
z3
423.2667
608.3475
[M+2H]2+
762.3826
c7
847.3976
c8
918.4170
z10
1062.4321
c10
1148.4574
1149.4633
c12
1302.4797
z13
c13
1415.5199
1416.5216
1417.5237
z14
1542.4705
1544.4764
1907.5593
[M+H]+
1909.5802
c16
1779.5265
z16
630.3611
c6
496.2910
y4
y7
y6
z12
1281.4763
1304.4807
z11
y11
c14
c15
z15
m/z

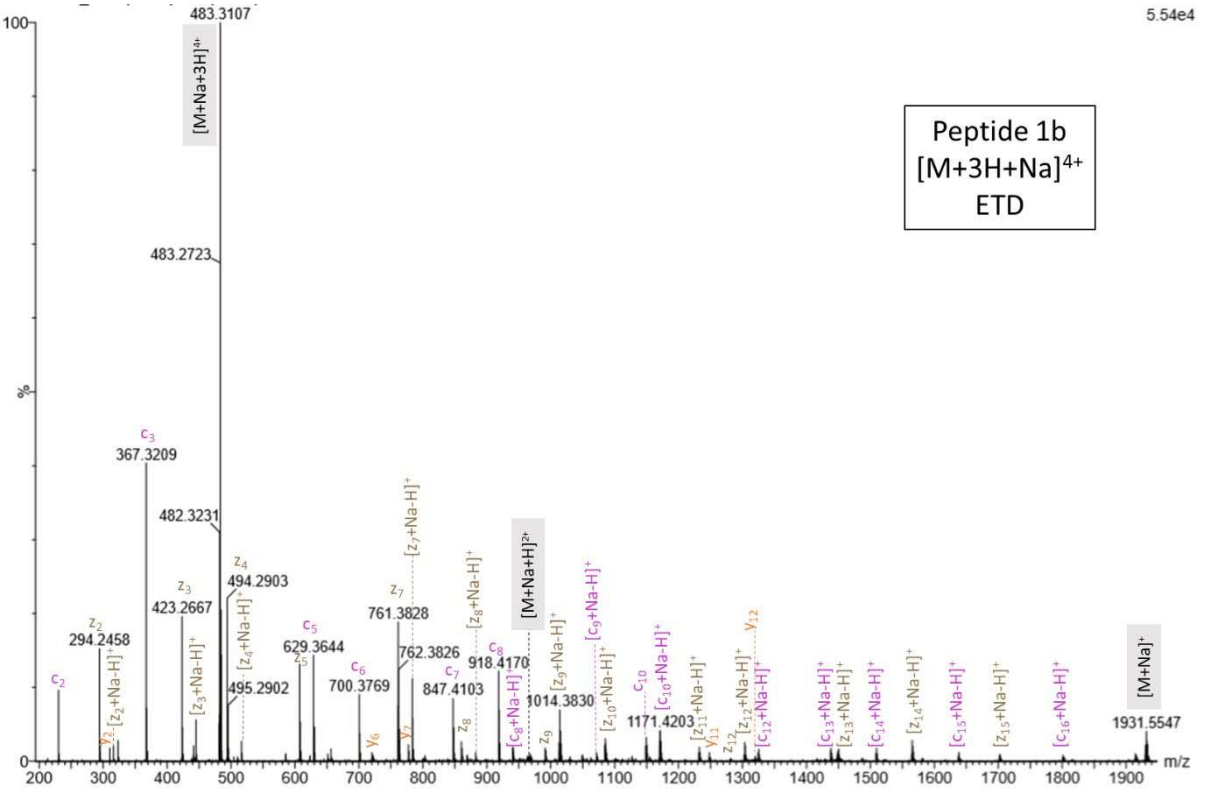
iv) [M+2H+Na]$^{3+}$


Peptide 1b
[M+2H+Na]3+
CID
573.3040
573.6384
573.9729
[M+Na+2H]3+
644.3418
644.0095
644.6742
611.3218
645.0067
704.8188
705.3171
733.3478
790.8516
791.3549
799.3669
859.3555
859.8545
860.3665
901.3963
923.3699
185.2624
310.2606
147.2103
253.1859
213.2555
350.3015
360.7763
449.7966
462.2843
527.7885
110.1632
m/z


Peptide 1b
[M+2H+Na]3+
ETD
423.2667
761.3828
494.2903
607.3469
367.3209
762.3826
642.3494
495.2902
652.3423
783.3586
940.3951
991.4142
992.4176
1170.4197
1171.4352
1172.4362
1324.4478
1508.5178
1510.5186
1638.5126
1800.5194
1929.5222
1931.5355
1930.5383
[M+Na+2H]3+
[M+Na+H]2+
[M+Na]+
m/z

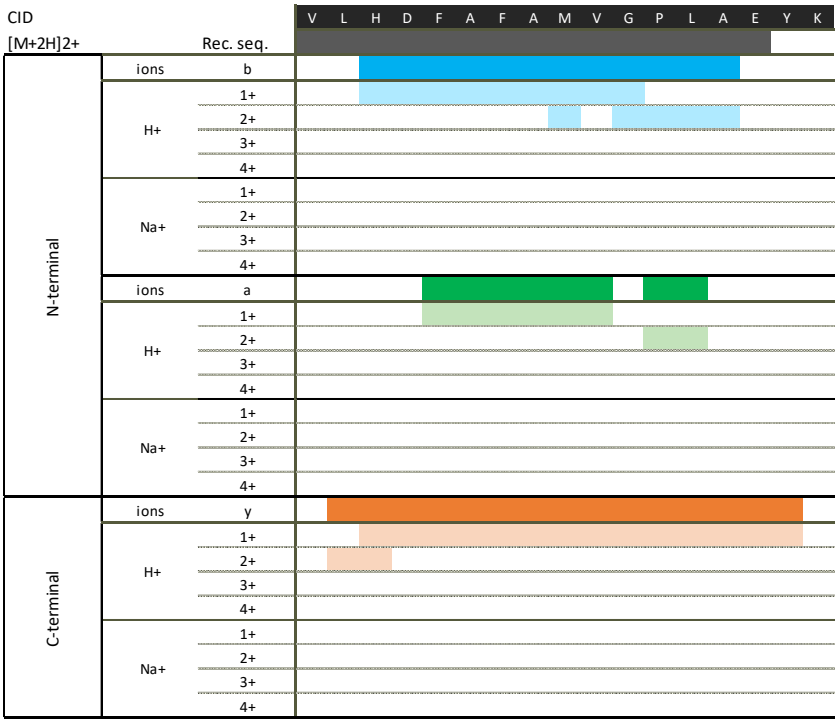
v) [M+3H+Na]$^{4+}$


Peptide 1b
[M+3H+Na]4+
CID
1.28e5
483.2915
605.8099
550.8127
606.3148
483.5410
624.8292
510.3006
551.3147
625.3311
328.2633
683.3542
310.2606
360.7763
292.7505
416.6043
449.7966
777.3973
684.3584
830.3847
271.1953
251.2384
721.3900
901.3963
876.4285
902.3923
1032.3921
[M+Na+3H]4+
[M+2H]2+
iF
iV
iP
iM
iL
iK
iH
iY
m/z

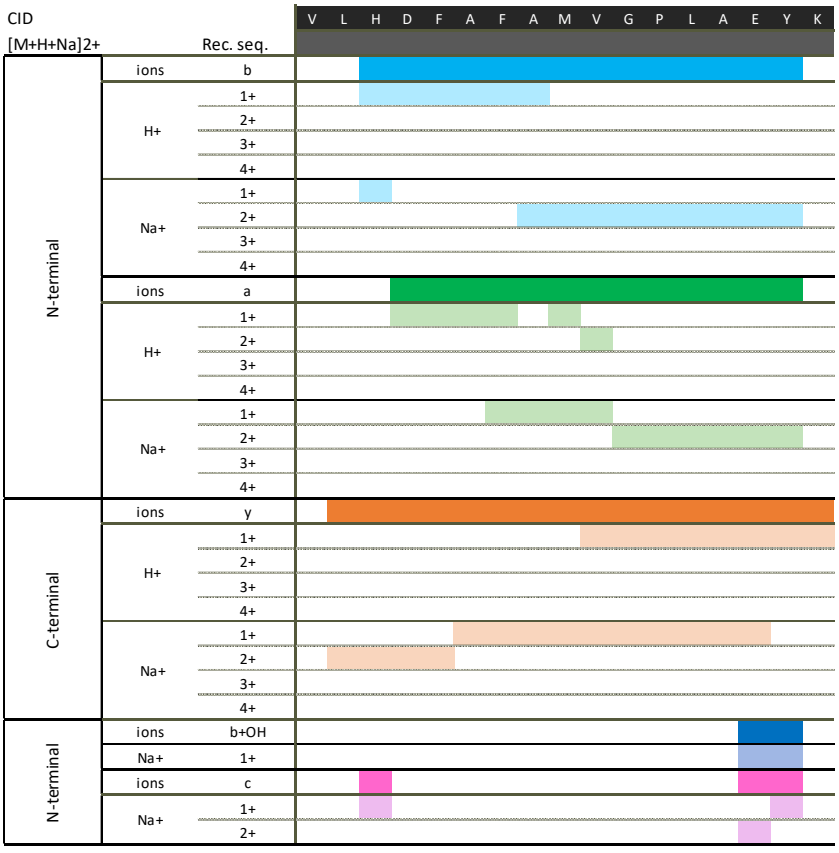

Peptide 1b
[M+3H+Na]4+
ETD
5.54e4
483.3107
483.2723
367.3209
482.3231
494.2903
423.2667
294.2458
761.3828
629.3644
762.3826
700.3769
847.4103
918.4170
495.2902
1014.3830
1171.4203
1931.5547
[M+Na+3H]4+
[M+Na+H]2+
[M+Na]+
m/z

b) Annexe 4-3.2 : Recouvrement de séquence du peptide 1b dissociés sous différents états de charge

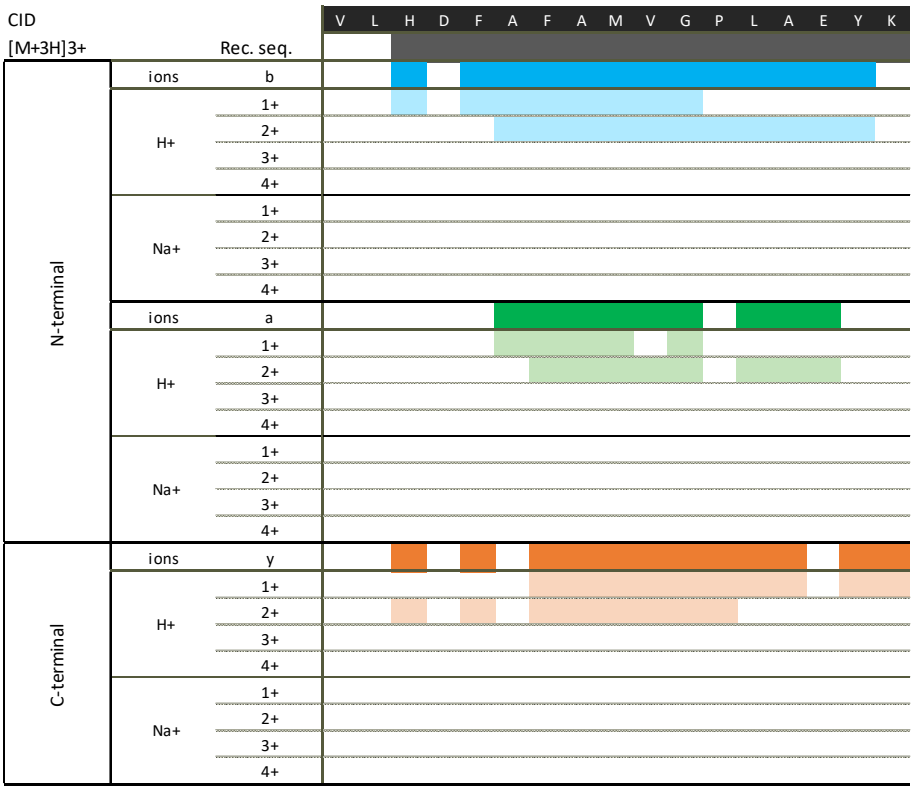
i) $[M+2H]^{2+}$

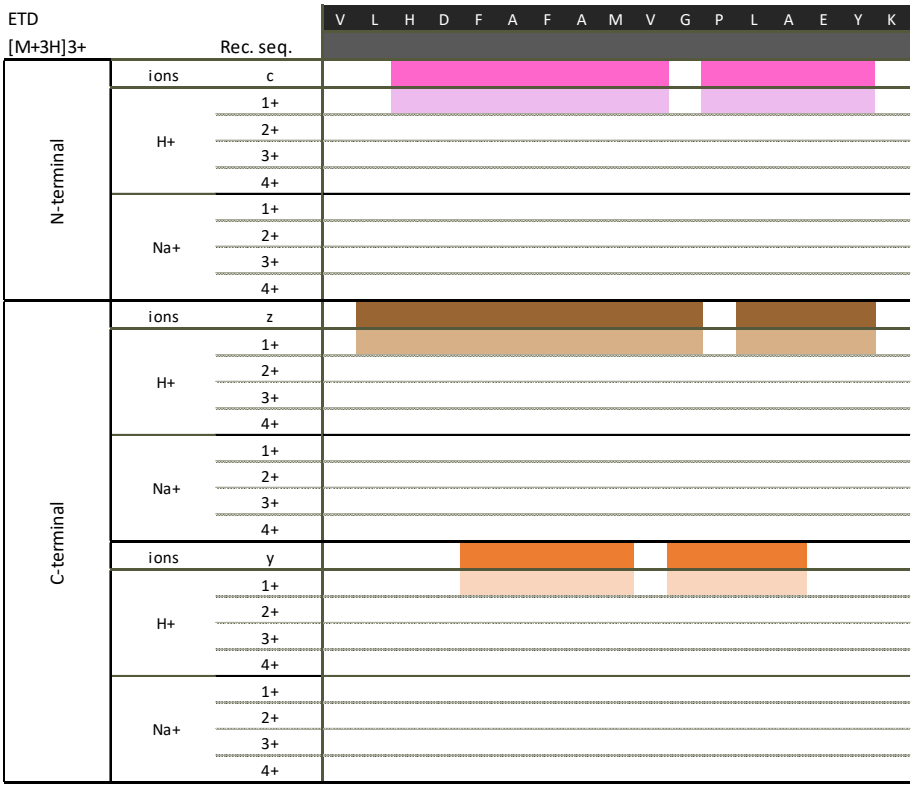


ii) $[M+H+Na]^{2+}$

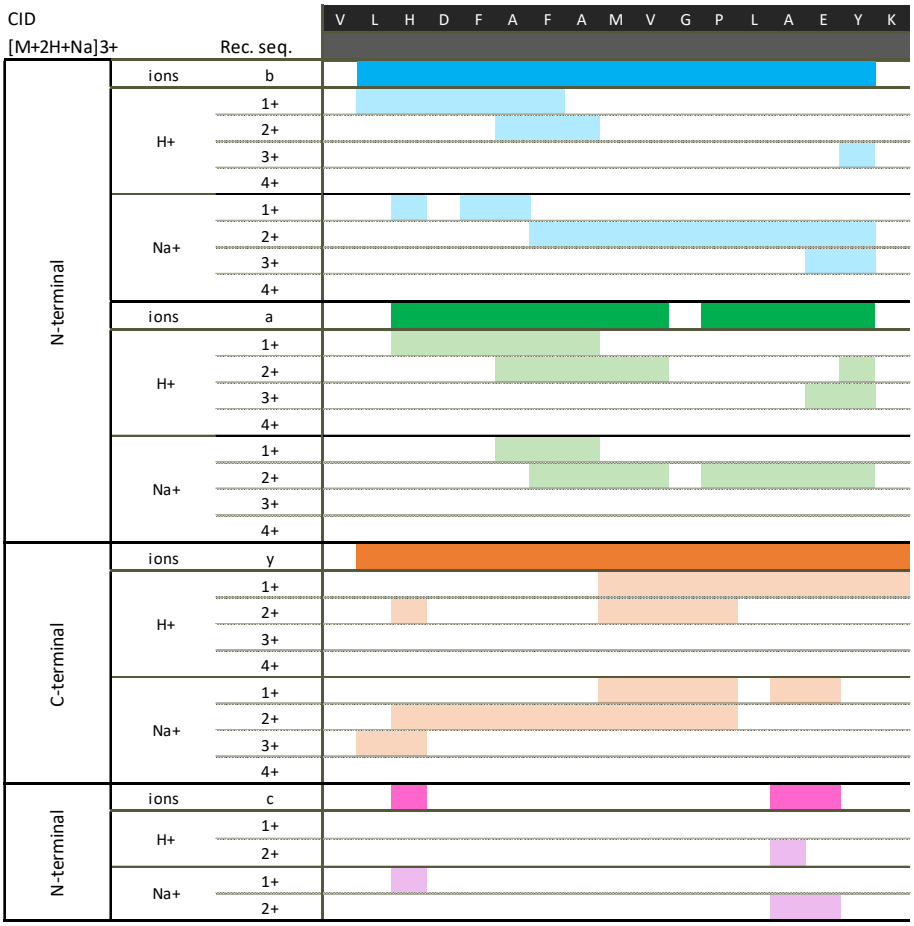


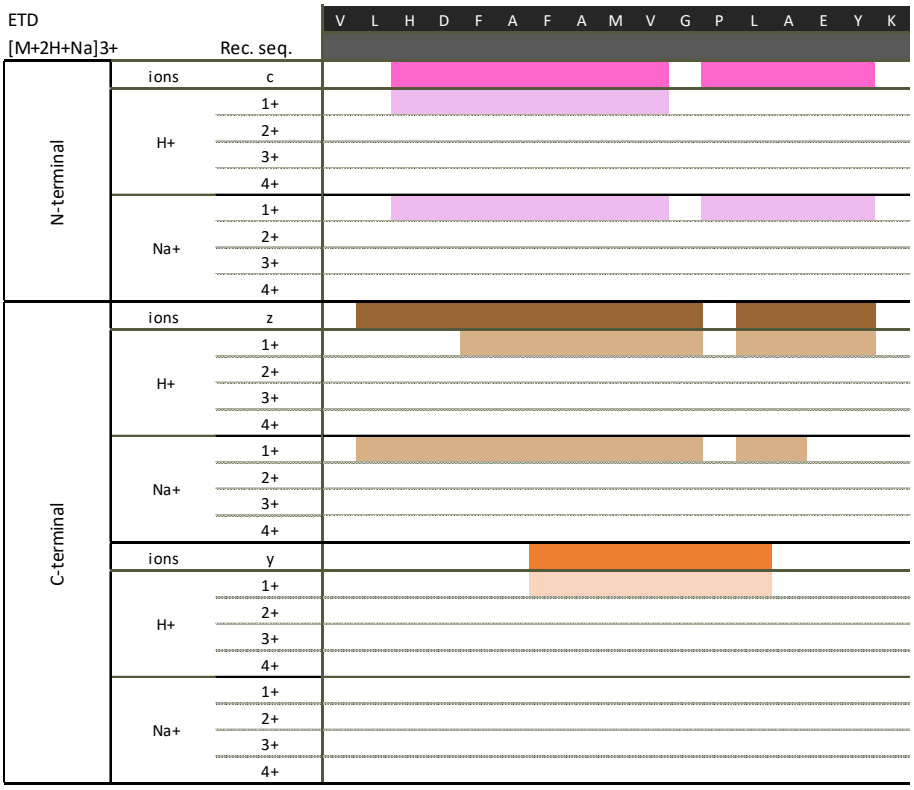
iii) [M+3H]$^{3+}$


CID
[M+3H]3+
Rec. seq.
V L H D F A F A M V G P L A E Y K
N-terminal
ions
b
H+
Na+
1+
2+
3+
4+
ions
a
C-terminal
y


ETD
[M+3H]3+
Rec. seq.
V L H D F A F A M V G P L A E Y K
N-terminal
ions
c
H+
Na+
1+
2+
3+
4+
C-terminal
ions
z
y

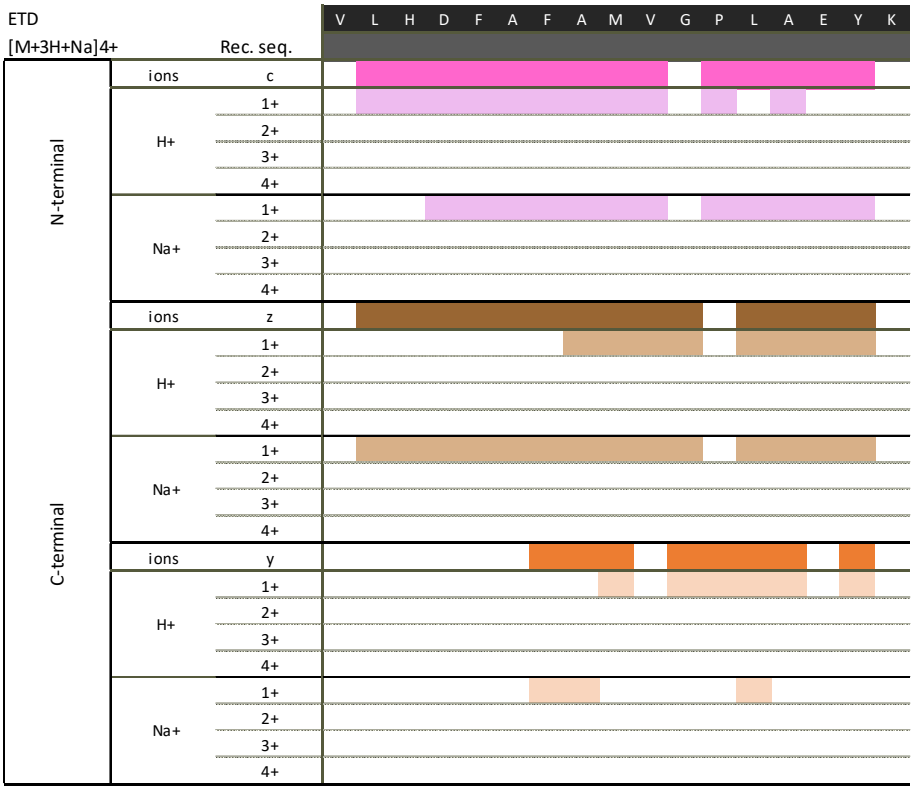
iv) [M+2H+Na]$^{3+}$


CID
[M+2H+Na]3+
Rec. seq.
V L H D F A F A M V G P L A E Y K
N-terminal
C-terminal
N-terminal
ions
H+
Na+
b
a
y
c
1+
2+
3+
4+


ETD
[M+2H+Na]3+
Rec. seq.
V L H D F A F A M V G P L A E Y K
N-terminal
C-terminal
ions
H+
Na+
c
z
y
1+
2+
3+
4+

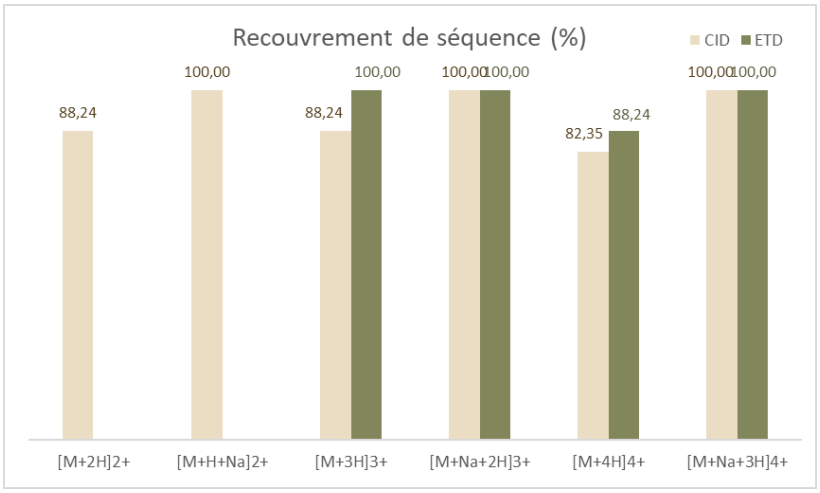
v) [M+3H+Na]$^{4+}$


CID
[M+3H+Na]4+
Rec. seq.
V L H D F A F A M V G P L A E Y K
N-terminal
C-terminal
N-terminal
ions
H+
Na+
b
a
y
c
1+
2+
3+
4+

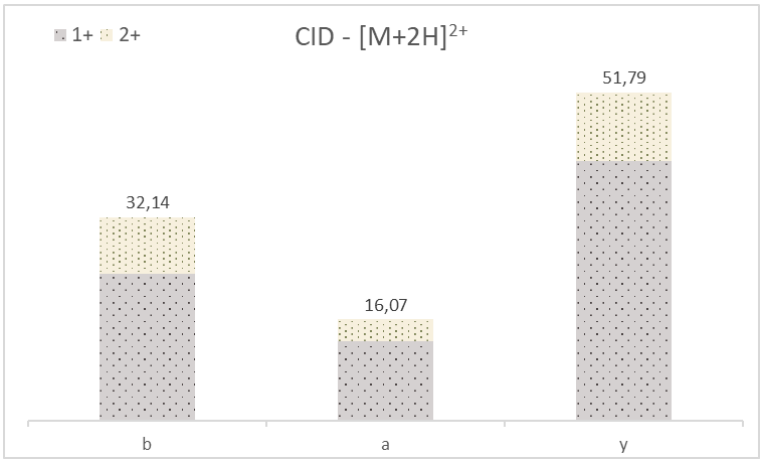

ETD
[M+3H+Na]4+
Rec. seq.
V L H D F A F A M V G P L A E Y K
N-terminal
C-terminal
ions
H+
Na+
c
z
y
1+
2+
3+
4+

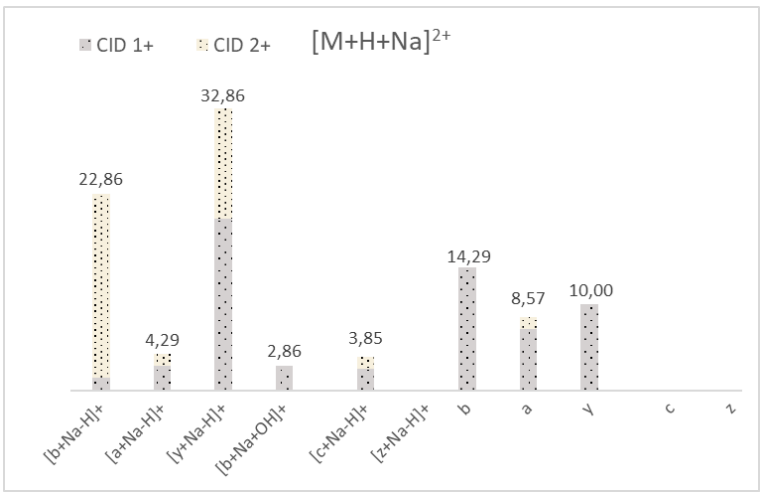
c) Annexe 4-3.3 : Résultats finaux des dissociations du peptide 1b du Tableau 1

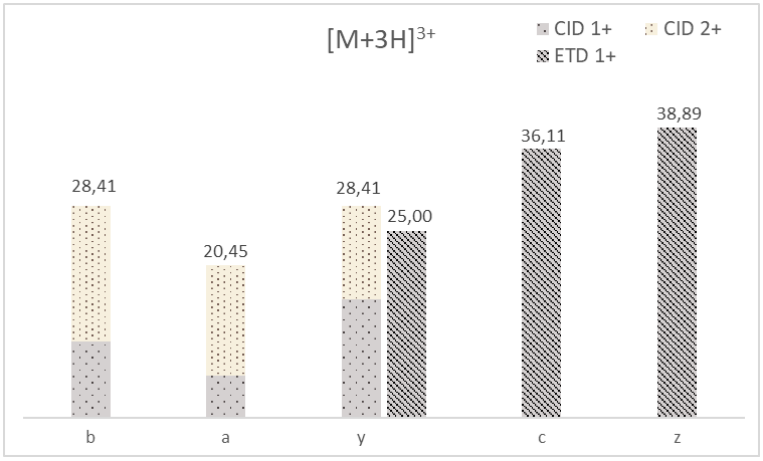
Bilan des recouvrements de séquence

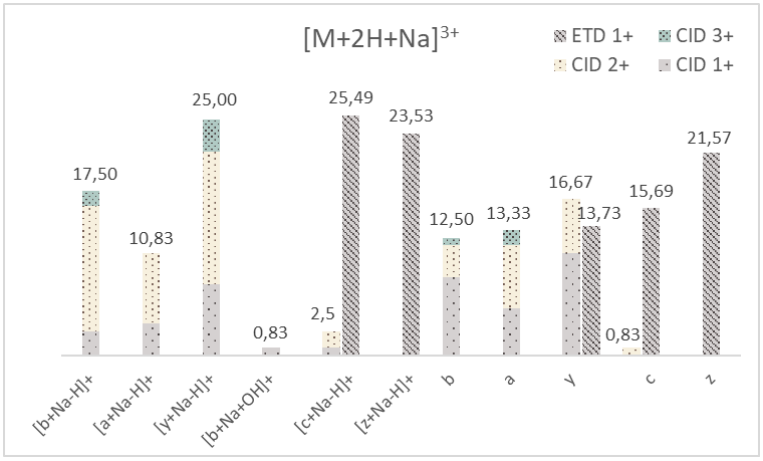


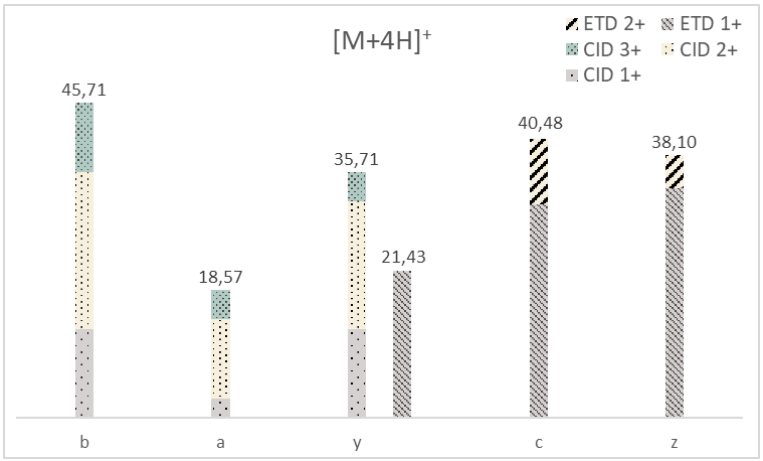
Proportion des ions assignés sur les spectres MS/MS

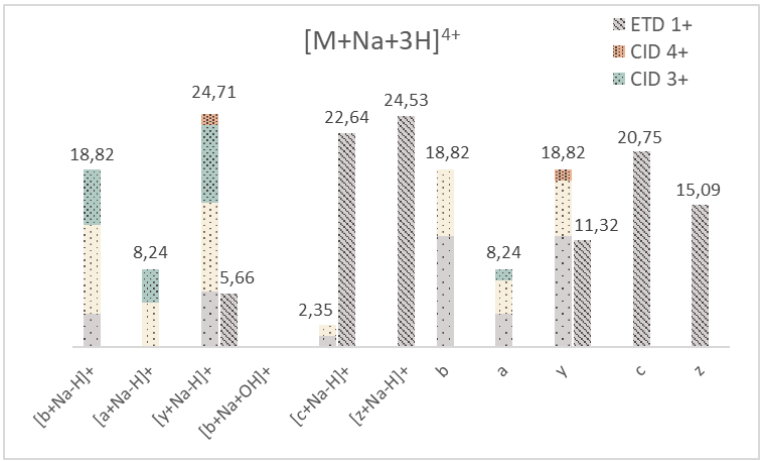





[M+3H]3+
CID 1+
CID 2+
ETD 1+
28,41
20,45
28,41
25,00
36,11
38,89
b
a
y
c
z


[M+2H+Na]3+
ETD 1+
CID 3+
CID 2+
CID 1+
17,50
10,83
25,00
0,83
2,5
25,49
23,53
12,50
13,33
16,67
13,73
0,83
15,69
21,57
[b+Na-H]+
[a+Na-H]+
[y+Na-H]+
[b+Na+OH]+
[c+Na-H]+
[z+Na-H]+
b
a
y
c
z

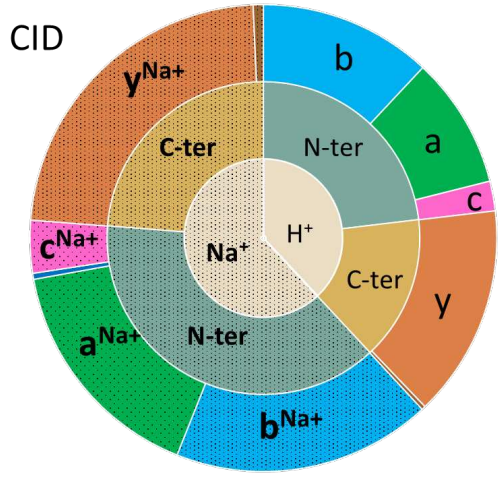

[M+4H]+
ETD 2+
ETD 1+
CID 3+
CID 2+
CID 1+
45,71
18,57
35,71
21,43
40,48
38,10
b
a
y
c
z


[M+Na+3H]4+
ETD 1+
CID 4+
CID 3+
18,82
8,24
24,71
5,66
2,35
22,64
24,53
18,82
8,24
18,82
11,32
20,75
15,09
[b+Na-H]+
[a+Na-H]+
[y+Na-H]+
[b+Na+OH]+
[c+Na-H]+
[z+Na-H]+
b
a
y
c
z

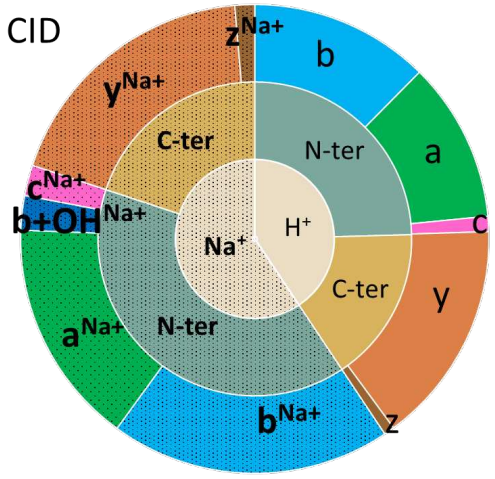
d) Annexe 4-3.4 : Proportions d'ions N- et C-terminaux protonés et sodés lors de la dissociation de peptides trypsiques et non trypsiques amidés sous différents états d'ionisation (CID et ETD)

i) $[M+H+Na]^{2+}$

Peptides non trypsiques amidés

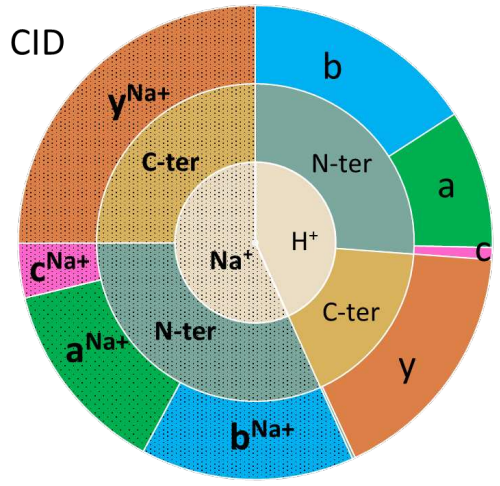


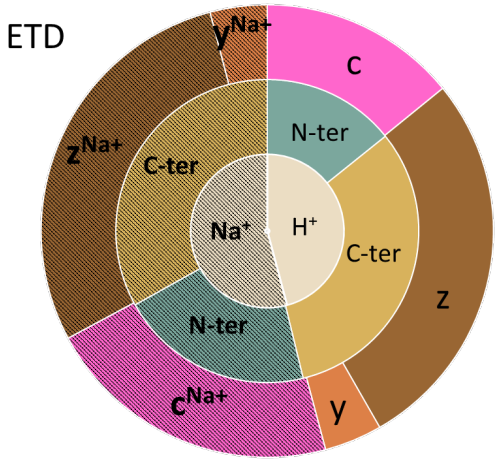
Peptides trypsiques



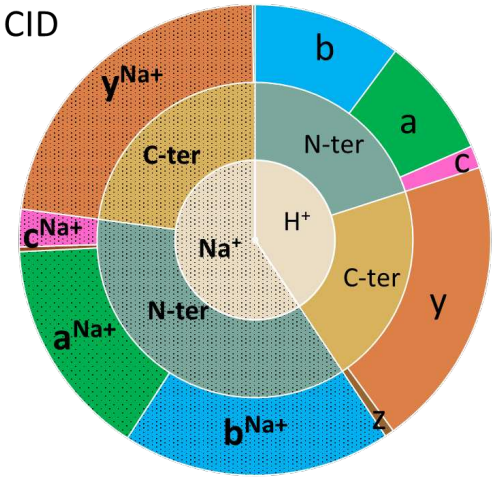
ii) $[M+2H+Na]^{3+}$

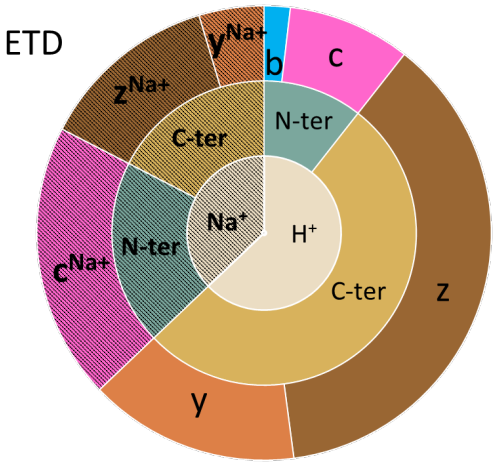
Peptides non trypsiques amidés





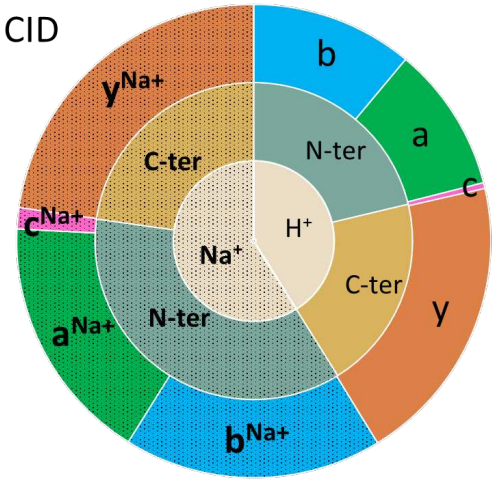
Peptides trypsiques



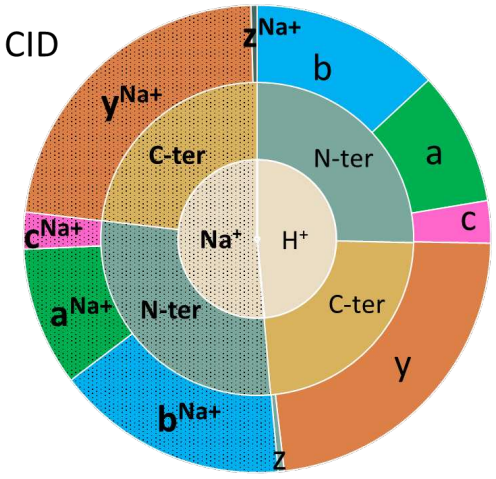


iii) [M+3H+Na]$^{4+}$

Peptides non trypsiques amidés



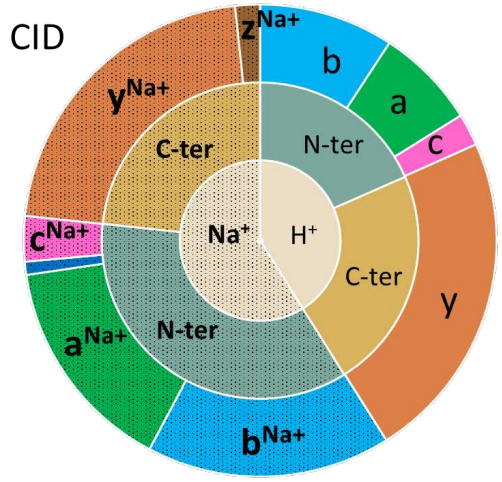
Peptides trypsiques



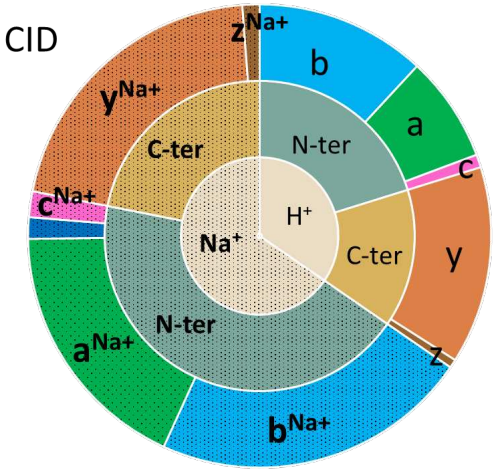
e) Annexe 4-3.5 : Proportions d'ions N- et C-terminaux protonés et sodés lors de la dissociation de peptides amide et acide sous différents états d'ionisation (CID et ETD)

i) $[M+H+Na]^{2+}$

Peptides amides

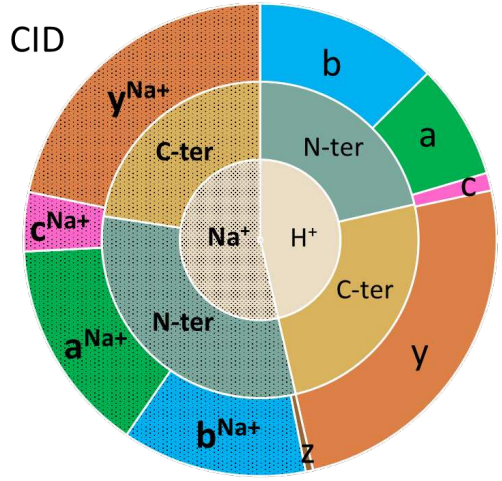


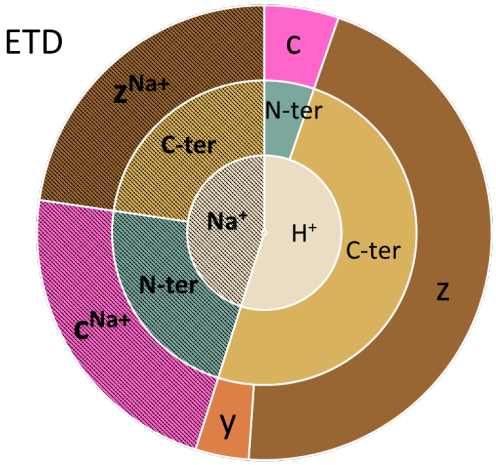
Peptides acides



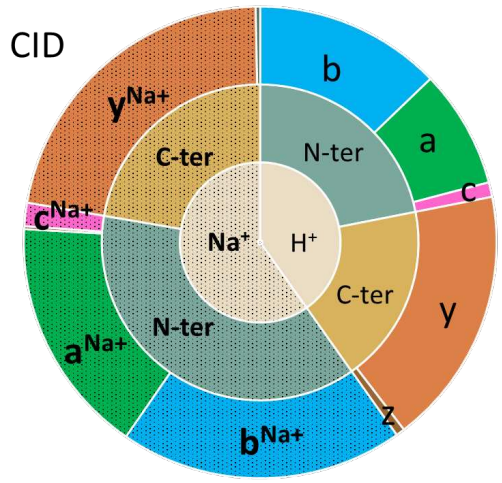
ii) $[M+2H+Na]^{3+}$

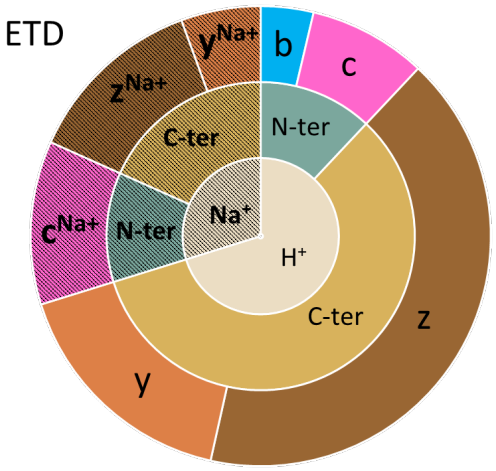
Peptides amides





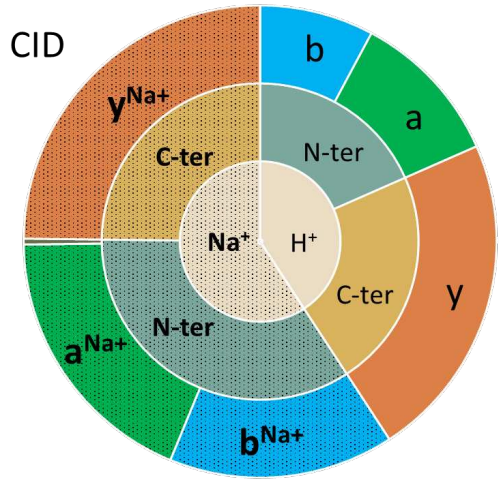
Peptides acides

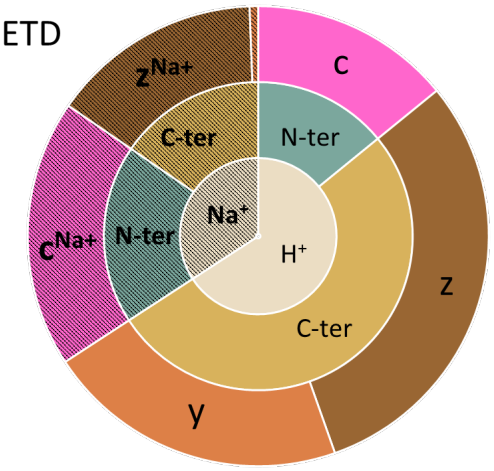




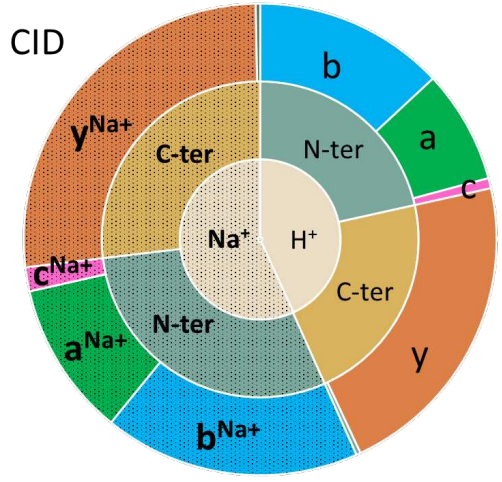
iii) [M+3H+Na]$^{4+}$

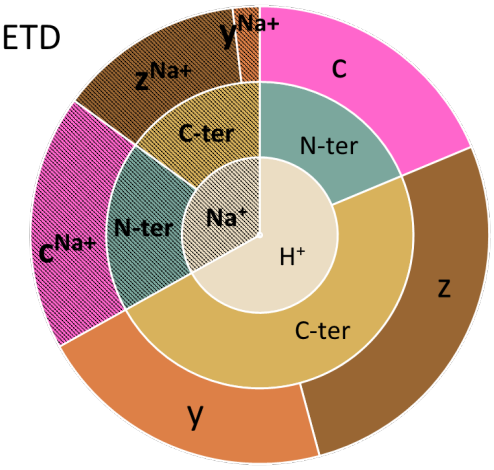
Peptides amides





Peptides acides





7) Liste Figures et Tableaux

Figure 1 : Résumés des différentes approches utilisées pour l'analyse par spectrométrie de masse en protéomique

Figure 2 : Spectres MS/MS du peptide 1b du Tableau 1 sous forme $[M+4H]^{4+}$

Figure 3 : Recouvrement de séquence du peptide 1b du Tableau 1 dissocié sous forme $[M+4H]^{4+}$

Figure 4 : Nombre d'ions assignés par état de charge et selon le mode d'activation employé par rapport au recouvrement de séquence

Figure 5 : Pourcentage d'ions sodés selon état de charge et la méthode d'activation employée par rapport au nombre d'ions assignés

Figure 6 : Proportions d'ions N- et C-terminaux protonés et sodés lors de la dissociation de peptides trypsiques et non trypsiques amidés sous forme $[M+3H+Na]^{4+}$ sous activation ETD

Figure 7 : Nombre d'ions assignés par état de charge et selon le mode d'activation employé par rapport au recouvrement de séquence pour des peptides amide et acide

Figure 8 : Proportion d'ions N- et C-terminaux sodés lors de la dissociation de peptides amide et acide sodés, rapporté à 100%

Tableau 1 : Séquences de peptides amides et acides fragmentés selon deux méthodes d'activation (CID et ETD), sous différents états de charge (2+, 3+, 4+), ionisés par des protons ou cation sodium

VI. Perspectives

VI. Perspectives

En capitalisant sur les travaux de cette thèse traitant de fragmentations de peptides de différentes tailles cationisés par des métaux alcalins (Na^+) et alcalino-terreux (Mg^{2+}) sous activations CID et ETD pour des applications en identification et quantification de structures très proches (modification acide/amide, 0.984 Da d'écart), il semble judicieux de s'intéresser à la distinction ultime de séquences diastéréoisomériques (même formule élémentaire, même structure primaire) par différentes approches de spectrométrie de masse. Bien que la stéréochimie des composés analysés en spectrométrie de masse constitue une information difficilement accessible, des pistes d'investigation sont envisagées pour déterminer la présence d'un résidu de configuration D dans une séquence connue identifiée au préalable. Ce questionnement est particulièrement pertinent dans le cadre d'analyse de peptides naturels qui font l'objet de recherche au sein de l'équipe. Par ailleurs, l'ensemble des données de dissociation obtenues pour une centaine de peptides étudiés dans le cadre de cette thèse ont permis de dégager des comportements particuliers de dissociation pour le résidu glycine qui, par la présence d'un atome d'hydrogène en chaine latérale, est le seul résidu protéinogénique non chiral. En sus de cette spécificité de la glycine qui a été mentionnée dans certaines publications mais relativement peu explorée, l'histidine est aussi connue pour son incidence sur les voies de fragmentation. Elle induit la production de nombreux fragments (en particulier des ions internes dont son ion immonium qui est très intense servant de diagnostic de la présence de ce résidu en séquençage *de novo*).

Les perspectives énoncées sont discutées plus en détail ci-dessous avec un bref état de l'art et quelques résultats préliminaires pour l'effet de la glycine.

I) Peptides contenant des résidus de série D

Les acides aminés, à l'exception de la glycine, possèdent un atome de carbone chiral (carbone alpha) qui permet la stéréoisomérie. D'autres résidus comme la thréonine portent un deuxième centre de chiralité. La majorité des résidus peuvent exister sous deux formes (énantiomères) : S ou R, selon les règles de Cahn-Ingold-Prelog. Pour les acides aminés, on parle plutôt d'énantiomère de la série L ou D (voir Figure 1), sauf pour dans le cas de la cystéine qui possède un atome de souffre en position γ.

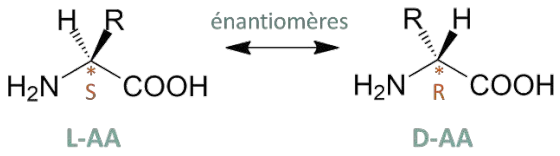


Figure 1 : Chiralité des acides aminés, excepté dans le cas de la cystéine

Lorsque les résidus de série D (D-AA) ont été observés la première fois dans des protéines de plusieurs organismes (par exemple la présence d'octopine dans des muscles de poulpe en 1927 [1] ou encore dans des coquilles Saint-Jacques en 1937 [2]), ils étaient considérés comme des cas particuliers. Cependant, à partir des années 1980, des protéines contenant un D-AA ont été trouvées dans plusieurs organismes vertébrés et invertébrés [3,4]. Par exemple, le D-Asp a été retrouvé dans plusieurs protéines humaines, comme la dentine [5], l'αA-cristalline dans le cristallin de patients atteints de cataracte [6], ou encore le

peptide β-amyloïde trouvé dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer [7]. Un seul D-AA est présent dans chaque séquence peptidique, près d'une extrémité, du coté N-terminal ou C-terminal selon l'espèce [3,8].

Il est possible de former ces résidus selon plusieurs mécanismes. Le premier résulte de la conversion d'un résidu de série L (L-AA) en son homologue D. La géochronologie, qui permet entre autres de dater des fossiles, repose sur ce principe. Suite à la mort d'un organisme, les acides aminés de série L contenus dans les os et les dents se transforment lentement en série D. Ce rapport augmente avec le temps et la température. Grâce à cette racémisation, il est possible de dater des organismes âgés jusqu'à 1 000 000 d'années [9]. Le second processus passe par une transformation enzymatique, grâce à une isomérase (voir Figure 2). Seuls les peptides avec une séquence particulière pourront servir de substrat, puisque le site actif d'une enzyme est spécifique [8].

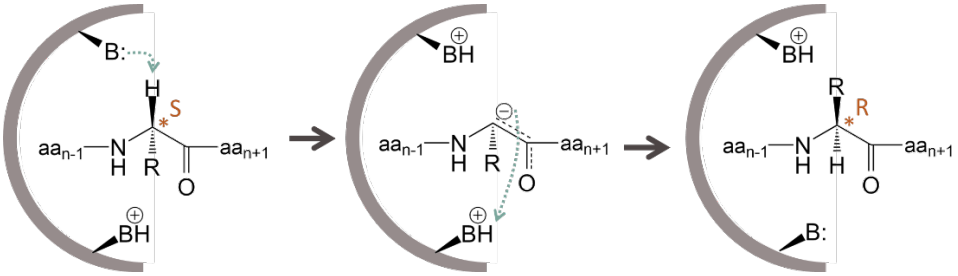


Figure 2 : Mécanisme enzymatique proposé par Paramjit et al. [8] qui permet de convertir des résidus de série L en D

Suite à la modification de la chiralité d'un résidu dans une séquence peptidique, les deux peptides correspondants sont des diastéréoisomères (voir Figure 3)

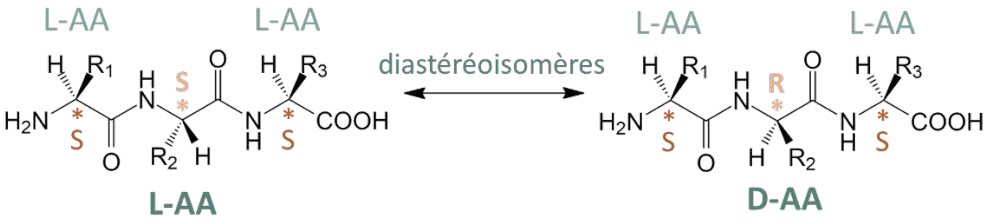


Figure 3 : Peptides diastéréoisomères

Les peptides contenant des résidus de série D assurent entre autre la stabilisation de conformations inhabituelles, ainsi qu'une meilleure résistance à la protéolyse [10]. En effet, ces peptides sont rarement des substrats des protéases endogènes en raison de l'inadéquation de la chiralité avec l'orientation des chaines latérales des résidus d'intérêt dans la poche de l'enzyme. Cette résistance améliore ainsi le temps de demi-vie *in vivo*, ce qui rend ces D-peptides plus attractifs pour l'administration de peptides médicaments [10–12]. Ces D-peptides peuvent également avoir un intérêt dans l'industrie alimentaire (comme édulcorants plus puissants que ceux dépourvus de résidus D-AA, agents aromatiques, additifs alimentaires,…) ou dans l'industrie cosmétique (effet antioxydant du DD-Asp par exemple) [12].

L'analyse de ces D-peptides implique la caractérisation du diastéréoisomère. Ces isomères peptidiques ont été différenciés par des techniques séparatives avec succès en HPLC (RPLC, phases stationnaires chirales, ajout de sélecteurs chiraux…), en CE (avec ou sans recouvrement du capillaire, électrochromatographie capillaire, sélecteurs chiraux ajoutés au BGE,…), ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). Une étape de digestion peptidique (hydrolyse acide suivie d'une dérivatisation ou digestion enzymatique) peut également être employée en amont de ces analyses [13].

Cependant, la détection de cette modification dans des peptides naturels reste une tâche difficile car l'isomérisation n'impacte pas la masse moléculaire. Par conséquent, un résidu D-AA est difficile à détecter par spectrométrie de masse, qui reste une méthode analytique de choix pour la caractérisation de biomolécules. En effet, les masses des fragments issus des deux diastéréoisomères sont les mêmes, et aucune perte caractéristique n'est trouvée dans les spectres MS/MS [14]. De ce fait, différentes approches analytiques ont été développées pour répondre à cette problématique.

Pour les analyses réalisées avec une source ESI et une méthode d'activation CID, la distinction des résidus D et L repose sur la différence d'abondance d'ions fragments. Cependant, les abondances d'ions sont soumises aux conditions expérimentales, qui induisent des efficacités d'ionisation et de dissociation non évidentes à anticiper, ce qui complique la détermination de la chiralité des résidus par des techniques de fragmentation traditionnelles [14,15]. Une approche requérant l'usage de systèmes stéréosélectifs non covalents (ion métallique, stéréoisomère d'un peptide, antibiotique) a alors été développée, toujours en CID. Les abondances relatives des fragments ont été utilisées pour déterminer un facteur de reconnaissance chirale R, qui caractérise la capacité à distinguer les isomères. Il est ensuite possible de créer une courbe d'étalonnage à partir de mélanges connus de stéréoisomères, afin de déduire la composition en stéréoisomères d'un mélange. Cependant, cette méthode est limitée aux petites molécules, ce qui restreint son utilisation aux peptides biologiques d'intérêts [14]. L'usage de la mobilité ionique a cependant permis de séparer rapidement les diastéréoisomères, sous différents états de charge (10 paires de diastéréoisomères de 4 à 29 résidus) [16].

D'autres alternatives à la fragmentation CID ont également été envisagées. Ainsi, la technique d'ionisation MALDI a été envisagée. Malgré le fait que la discrimination des diastéréoisomères dépend fortement de la séquence des peptides étudiés, les résultats ont démontré qu'il est possible de discriminer par PSD les isomères de peptides protonés grâce à leurs structures secondaires [17–19]. De la quantification a également pu être réalisée à partir d'étalons synthétiques, en comparant les abondances des fragments majoritaires respectifs des diastéréoisomères [18].

De plus, les spectres MS/MS issus de dissociations de protéines isomères activées par ECD changent significativement lorsque un résidu L-AA est remplacé intentionnellement par un résidu D-AA, permettant ainsi de distinguer la nature des résidus [14,20]. Des expériences de quantification ont également pu être réalisées à partir des résultats obtenus avec cette méthode d'activation [14]. D'autres expériences ont démontré que la fragmentation initiée par la chimie radicalaire (Dissociation Dirigée par les Radicaux, RDD) a permis de discriminer les diastéréoisomères peptidiques, ainsi que mesurer quantitativement les proportions du mélange [21].

Quelle que soit la méthode d'ionisation et d'activation, il est possible de discriminer les peptides diastéréoisomères avec une cationisation par des métaux (Na^+, K^+, Cu^{II}, Fe^{II}, Co^{II}) [16,18,22].

Afin d'apporter une innovation vis-à-vis de l'état de l'art en spectrométrie de masse dans ce domaine, la spectrométrie de masse résolue en énergie qui a été mise en œuvre pour des adduits métalliques

de peptides très similaires pourrait être explorée. On peut alors se demander si des différences de comportements de dissociation CID entre les peptides diastéréoisomères seraient exploitables pour la technique des ions survivants, et ainsi déterminer quelle séquence peptidique contient le résidu D-AA. Cela permettrait de conserver une méthode d'ionisation et d'activation largement répandue (ESI, CID), avec un spectromètre de masse basse ou haute résolution. Les ions métalliques ont à nouveau démontré leur potentialité pour le séquençage de peptides particuliers, et pourraient donc être à nouveau utilisés pour réaliser ces courbes SY.

2) Le résidu Glycine

Le résidu Glycine est un résidu connu pour influencer la fragmentation de peptides protonés. Le clivage de la liaison amide N-terminale de ce résidu est favorisé, tout comme pour celle du résidu Pro [23–25], et particulièrement pour les liaisons amides situées entre les paires de résidus Asn-Gly et Gln-Gly [26,27]. Cet effet ne peut pas être expliqué par la basicité du résidu puisqu'il s'agit du résidu le moins basique de tous [26], mais pourrait être justifié par l'absence de chaine latérale qui pourrait ainsi permettre à la glycine d'adopter des conformations impossibles à atteindre pour d'autres résidus [28]. Au contraire, le clivage en C-terminal du résidu Gly est supprimé, en particulier pour les peptides dont le proton est partiellement mobile [24–26].

D'autres phénomènes liés à la glycine ont pu être observés, notamment des pertes d'eau à partir de peptides ne présentant pas de fonction pouvant générer ces pertes de neutre. Reid et Simpson ont ainsi démontré qu'il est possible de perdre une molécule d'eau à partir d'un dipeptide Gly-Gly-OMe par une réaction Rétro-Ritter à partir de la protonation du carbonyle du squelette peptidique [29].

Dans le cadre de cette thèse, des phénomènes de scrambling ont été observés lors de dissociations de peptides protonés contenant un résidu Gly et d'autres résidus aliphatiques essentiellement (voir Figure 4).

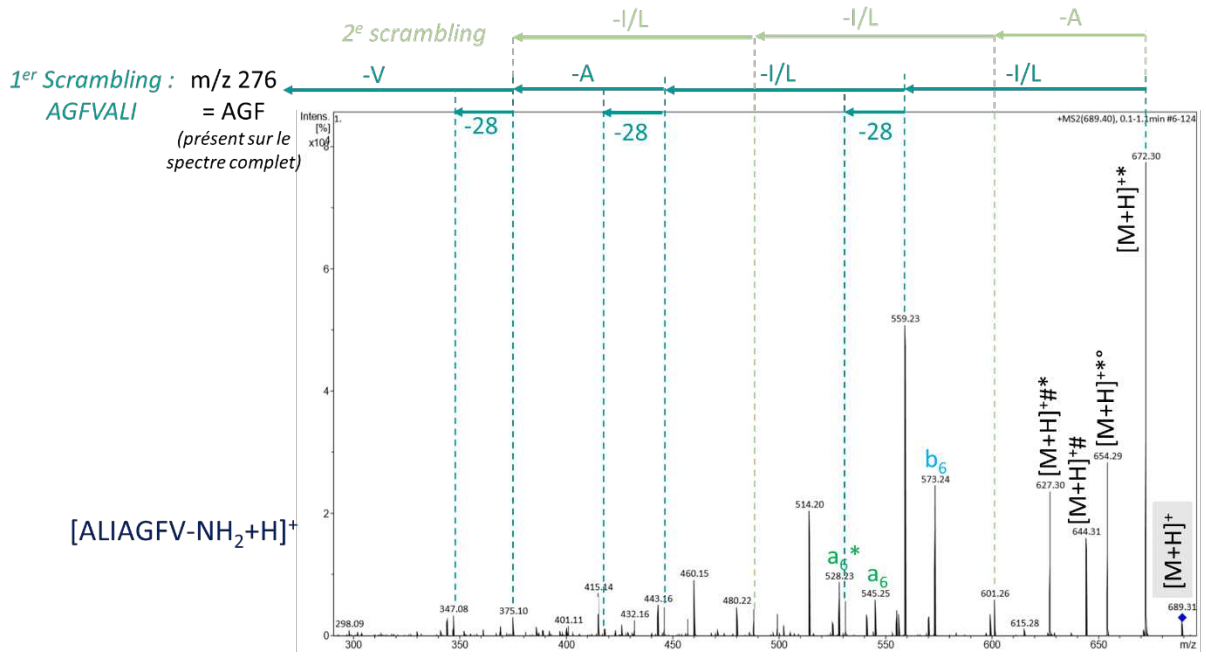


Figure 4 : Dissociation du peptide ALIAGFV-NH_2 protoné sur le spectromètre de masse amaZon speed (IT)

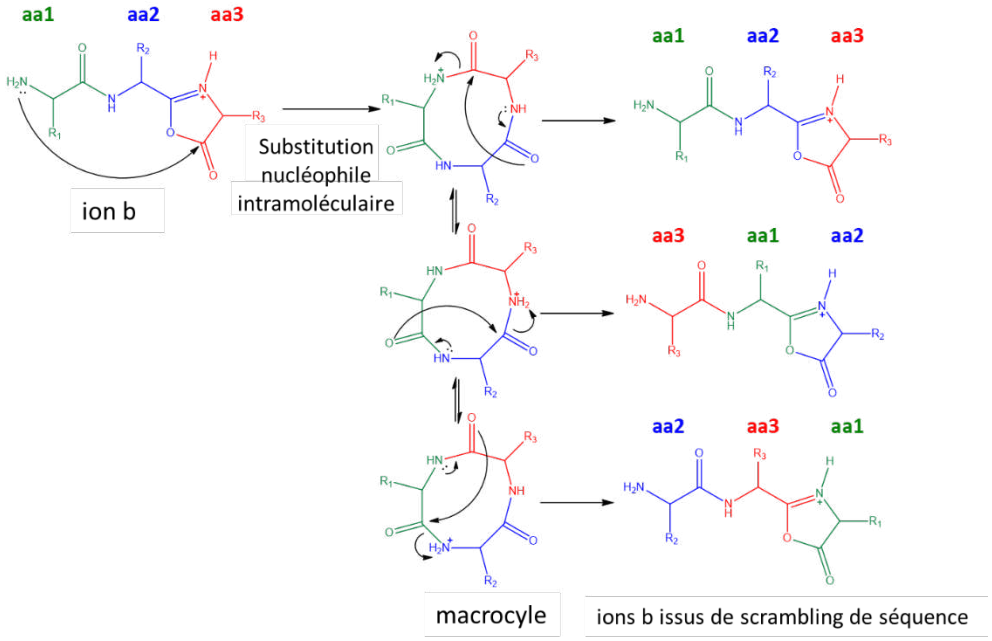


Figure 5 : Mécanisme de scrambling

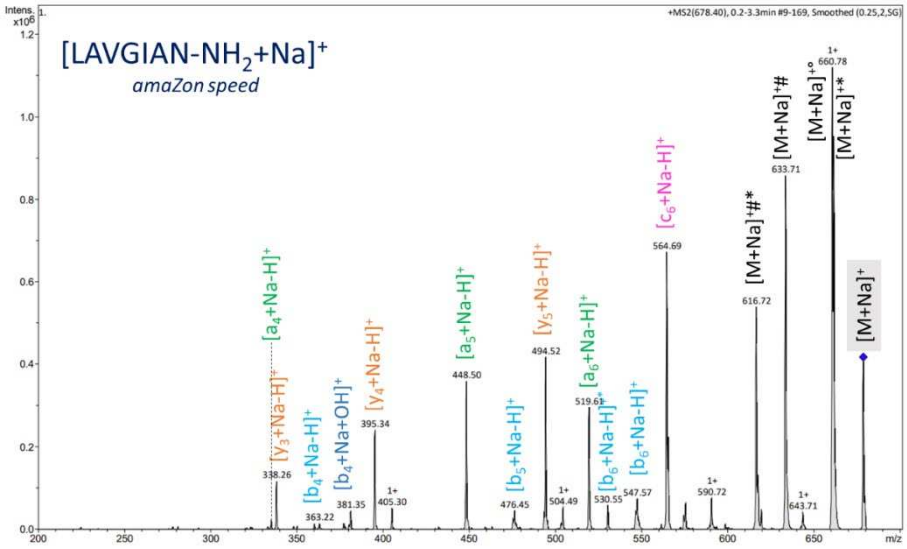
Le phénomène de scrambling correspond à une cyclisation intramoléculaire du peptide qui peut ensuite se rouvrir et donner différentes séquences (Figure 5) [30]. Cependant, les séquences générées se fragmentent elles aussi, donnant des ions fragments pouvant alors noyer l'information de la séquence originelle comme expliqué en introduction. Cet évènement vient donc compliquer l'interprétation de spectres, notamment lors de séquençages *de novo*. Dans le cadre de cette thèse, le résidu Gly semble accentuer cet effet, générant des ions fragments issus de scrambling de haute intensité, contrairement aux spectres MS/MS des peptides présentés dans les chapitres précédents.
Les dissociations de peptides sodés contenant un résidu Gly, réalisés lors de précédentes expériences, n'ont pas montré de tel phénomène. L'ion sodium, une charge fixe contrairement au proton mobile, semble ainsi diminuer cet effet de scrambling. Cependant, la présence de ce résidu semble influencer la fragmentation des peptides amides sodés.

En effet, sur le spectromètre de masse amaZon speed (IT), les dissociations de peptides amides, ne contenant pas au minimum une fonction hydroxyle, ont généré des ions inhabituels de type $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ (voir Figure 6 avec les ions mentionnés notés en bleu foncé et **Annexe 6-2.1** pour la seconde partie des spectres MS/MS sélectionnés pour illustrer ce comportement). Ces ions sont normalement issus d'une attaque nucléophile intramoléculaire d'un hydroxyle (fonction acide carboxylique terminale ou latérale (Asp/Glu) ou fonction hydroxyle Ser/Thr/Tyr) sur le carbonyle du résidu adjacent pour ensuite reformer une fonction acide carboxylique C-terminale (par formation d'un anhydride mixte comme expliqué au Chapitre 1). Or cela n'est pas possible selon ce mécanisme avec les peptides dissociés suivants :

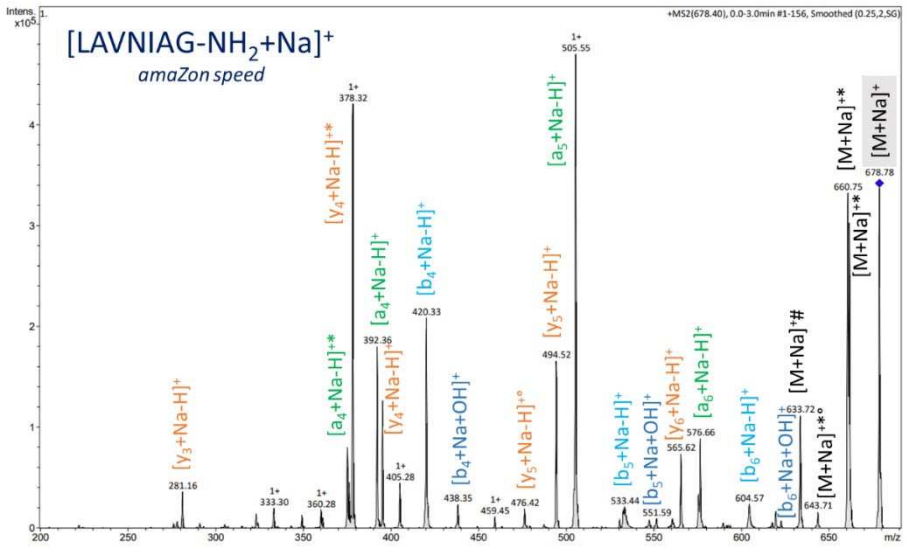
- LAVGIAN-NH_2
- LAVNIAG-NH_2
- LAVGIAQ-NH_2
- LAVQIAG-NH_2

Figure 6 : Dissociations de peptides amides sodés sur le spectromètre de masse amaZon speed (IT)

a) Peptide LAVGIAN-NH_2



b) Peptide LAVNIAG-NH_2



Afin de vérifier la nature de l'ion attribué, les expériences ont été réitérées sur un spectromètre de masse équipé d'un piège d'ions d'ultra-haute résolution (Orbitrap™) par Alexia Fataka, responsable de l'appareil au Laboratoire de Mesures Physiques (voir les spectres MS/MS en **Annexe 6-2.1**). Les formules brutes ont pu être déduites et comparées aux compositions élémentaires théoriques (voir Tableau 1).

Tableau 1 : Comparaisons masses et formules brutes théoriques et expérimentales d'ions de type $[b_{n-1}+Na+OH]^+$

Peptide	Ion	Masse monoisotopique théorique	Formule brute théorique	Masse monoisotopique expérimentale	Formule brute expérimentale	Delta [ppm]
LAVGIAN-NH_2	$[b_4+Na+OH]^+$	381.2110	$C_{16}H_{30}O_5N_4Na$	381.21121	$C_{16}H_{30}O_5N_4{}^{23}Na$	**0.97**
LAVNIAG-NH_2	$[b_6+Na+OH]^+$	622.3534	$C_{27}H_{49}O_8N_7Na$	622.3538	$C_{27}H_{49}O_8N_7{}^{23}Na$	**0.45**
	$[b_5+Na+OH]^+$	551.3163	$C_{24}H_{44}O_7N_6Na$	-	-	-
	$[b_4+Na+OH]^+$	438.2325	$C_{18}H_{33}O_6N_5Na$	438.23276	$C_{18}H_{33}O_6N_5{}^{23}Na$	**1.03**
LAVGIAQ-NH_2	$[b_4+Na+OH]^+$	381.2110	$C_{16}H_{30}O_5N_4Na$	381.21094	$C_{16}H_{30}O_5N_4{}^{23}Na$	**0.25**
LAVQIAG-NH_2	$[b_6+Na+OH]^+$	636.3691	$C_{28}H_{51}O_8N_7Na$	636.36798	$C_{28}H_{51}O_8N_7{}^{23}Na$	**-1.81**
	$[b_5+Na+OH]^+$	565.3320	$C_{25}H_{46}O_7N_6Na$	565.33202	$C_{25}H_{46}O_7N_6{}^{23}Na$	**-0.033**
	$[b_4+Na+OH]^+$	452.2479	$C_{19}H_{35}O_6N_5Na$	452.24795	$C_{19}H_{35}O_6N_5{}^{23}Na$	**-0.122**

L'usage de la spectrométrie de masse ultra-haute résolution a permis de confirmer la nature des ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$.

Pour expliquer cette voie de fragmentation délicate à relier exclusivement à la séquence du peptide, une réaction ion-molécule en phase gazeuse a été envisagée entre l'ion et une molécule d'eau, qui serait présente dans la trappe du piège à ions permettant l'exclusion du résidu en position C-terminale. Ce type de réaction a déjà été répertorié, en CID basse énergie, notamment avec des ions

fragments de la guanosine [31,32], mais également avec d'autres molécules et des ajouts d'eau, d'alcool ou d'ACN [33–38]. Ce phénomène a pareillement été observé pour des ions fragments issus de la dissociations d'ions sodés [39,40]. Ce type de réaction permet ainsi d'expliquer la formation de ces ions à partir de peptides ne possédant pas de fonction hydroxyle : une molécule d'eau est capable d'attaquer une fonction carbonyle d'un peptide sodé.

Comme la Figure 3 ainsi que l'Annexe 6-2.1 le montrent, le résidu glycine semble être un élément essentiel de cette réaction : lorsque ce résidu se trouve en milieu de séquence, un ion $[b_{n-1}+Na+OH]^+$se forme en C-terminal du résidu. Au contraire, si le résidu se trouve en position C-terminale, une série de ces ions inattendus est observée. L'absence de chaine latérale permettrait certainement une meilleure approche de la molécule d'eau sur le carbonyle contrairement à d'autres résidus qui ajouteraient une gêne stérique. Cependant, ce phénomène ne semble pas être systématique. En effet, selon le spectromètre de masse utilisé, ces ions atypiques ne sont pas observés : les dissociations de ces mêmes peptides ont été réalisées sur le Synapt G2-S (ESI-QTof) et les spectres MS/MS ne présentent pas ces ions (voir les spectres en **Annexe 6-2.3**).

Cela pourrait être expliqué par le temps de résidence des ions dans la trappe des pièges à ions qui est plus long, augmentant ainsi la probabilité de réaction ion-molécule, même si la concentration d'eau dans le spectromètre de masse est faible [38]. De plus, il a été démontré que l'intensité relative des pics issus de ces réactions est directement influencée par la pression de la cellule de collision : lorsque la pression est diminuée, les réactions avec les molécules d'eau sont moins prononcées. Au contraire, lorsque cette pression est augmentée, la quantité d'eau dans la cellule de collision augmente également [41]. Il est donc possible de trouver des traces d'eau dans tous les spectromètres de masse. En supplément, il se peut que la nature du gaz de collision ait un impact sur la quantité d'eau présente dans les spectromètres de masse (He pour amZon speed et Orbitrap et N_2 utilisé pour le Synapt G2-S) [41].

Au premier abord, lors d'un séquençage *de novo*, la présence d'ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$ indique une fonction acide carboxylique C-terminale, ou alors la présence d'un résidu Asp/Glu/Ser/Thr/Tyr dans la séquence d'un peptide amide. Dans ce cas-là, ces ions peuvent venir fausser l'interprétation du spectre MS/MS. Cependant, il n'est pas possible d'annihiler ces réactions ion-molécules. En effet, des expériences ont été menées afin de déterminer s'il s'agit d'eau issue de l'échantillon ou de la source. De l'eau deutérée a alors remplacé l'eau des échantillons par Neta et al., ou l'eau à l'entrée du spectromètre de masse par Tuytten et al. : si l'eau provient de l'échantillon ou de la source, il faudrait ainsi s'attendre à un gain neutre de D_2O [31,41]. Cependant aucun ion fragment ne présentait cet incrément, indiquant que la source d'eau provient probablement de l'humidité à l'intérieur du spectromètre de masse.

L'utilisation de plusieurs spectromètres de masse devient alors nécessaire pour s'assurer de la présence ou non d'une glycine. Si le passage d'un spectromètre de masse de type piège à ions à un QTof génère des spectres MS/MS différents, notamment par l'absence ou présence d'ions $[b_{n-1}+Na+OH]^+$, il devient alors possible de statuer sur la présence de ce résidu, ainsi que la séquence du peptide inconnu.

Néanmoins, il serait intéressant de pousser l'étude un peu plus loin, en synthétisant d'autres peptides contenant une glycine avec des séquences spécifiques, pour voir les limites des effets de ce résidu, notamment au niveau de sa position de la séquence, ou alors en présence d'autres résidus.

3) Références

1. Morizawa K. The extractive substances in Octopus octopodia. *Acta Scholae Medicinalis Universitatis Imperialis in Kioto*. 1927:285-298.

2. Moore E, Wilson DW. Nitrogenous Extractives of Scallop Muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 1937;119(2):573-584. doi:10.1016/S0021-9258(18)74403-7

3. Ollivaux C, Soyez D, Toullec JY. Biogenesis of D -amino acid containing peptides/proteins: where, when and how?: D -Amino Acid Containing Peptides/Proteins. *J Pept Sci*. 2014;20(8):595-612. doi:10.1002/psc.2637

4. Jilek A, Kreil G. d-Amino Acids in Animal Peptides. *Monatsh Chem*. 2008;139(1):1-5. doi:10.1007/s00706-007-0780-5

5. Helfman PM, Bada JL. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(8):2891-2894. doi:10.1073/pnas.72.8.2891

6. Fujii N, Satoh K, Harada K, Ishibashi Y. Simultaneous Stereoinversion and Isomerization at Specific Aspartic Acid Residues in αA-Crystallin from Human Lens. *The Journal of Biochemistry*. 1994;116(3):663-669. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124577

7. Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, et al. Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 1993;268(5):3072-3083.

8. Bansal PS, Torres AM, Crossett B, et al. Substrate Specificity of Platypus Venom L-to-D-Peptide Isomerase. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(14):8969-8975. doi:10.1074/jbc.M709762200

9. Rutter NW, ed. *Dating Methods for Quaternary Deposits*. Geol. Ass. of Canada; 1996.

10. Mitchell JBO, Smith J. D-amino acid residues in peptides and proteins. *Proteins*. 2003;50(4):563-571. doi:10.1002/prot.10320

11. Feng Z, Xu B. Inspiration from the mirror: D-amino acid containing peptides in biomedical approaches. *Biomolecular Concepts*. 2016;7(3):179-187. doi:10.1515/bmc-2015-0035

12. Gao X, Ma Q, Zhu H. Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of d-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(8):3341-3349. doi:10.1007/s00253-015-6507-3

13. Bai L, Sheeley S, Sweedler JV. Analysis of endogenous D-amino acid-containing peptides in Metazoa. *Bioanal Rev*. 2009;1(1):7-24. doi:10.1007/s12566-009-0001-2

14. Adams CM, Zubarev RA. Distinguishing and Quantifying Peptides and Proteins Containing D-Amino Acids by Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2005;77(14):4571-4580. doi:10.1021/ac0503963

15. Serafin SV, Maranan R, Zhang K, Morton TH. Mass Spectrometric Differentiation of Linear Peptides Composed of L -Amino Acids from Isomers Containing One D -Amino Acid Residue. *Anal Chem*. 2005;77(17):5480-5487. doi:10.1021/ac050490j

16. Jeanne Dit Fouque K, Garabedian A, Porter J, et al. Fast and Effective Ion Mobility–Mass Spectrometry Separation of D -Amino-Acid-Containing Peptides. *Anal Chem*. 2017;89(21):11787-11794. doi:10.1021/acs.analchem.7b03401

17. Sachon E, Clodic G, Galanth C, et al. D -Amino Acid Detection in Peptides by MALDI-TOF-TOF. *Anal Chem*. 2009;81(11):4389-4396. doi:10.1021/ac9002886

18. Bai L, Romanova EV, Sweedler JV. Distinguishing Endogenous D -Amino Acid-Containing Neuropeptides in Individual Neurons Using Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2011;83(7):2794-2800. doi:10.1021/ac200142m

19. Koehbach J, Gruber CW, Becker C, Kreil DP, Jilek A. MALDI TOF/TOF-Based Approach for the Identification of D - Amino Acids in Biologically Active Peptides and Proteins. *J Proteome Res*. 2016;15(5):1487-1496. doi:10.1021/acs.jproteome.5b01067

20. Adams CM, Kjeldsen F, Zubarev RA, Budnik BA, Haselmann KF. Electron capture dissociation distinguishes a single D-amino acid in a protein and probes the tertiary structure. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2004;15(7):1087-1098. doi:10.1016/j.jasms.2004.04.026

21. Tao Y, Quebbemann NR, Julian RR. Discriminating D -Amino Acid-Containing Peptide Epimers by Radical-Directed Dissociation Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2012;84(15):6814-6820. doi:10.1021/ac3013434

22. Lagarrigue M, Bossée A, Afonso C, Fournier F, Bellier B, Tabet JC. Diastereomeric differentiation of peptides with CuII and FeII complexation in an ion trap mass spectrometer. *J Mass Spectrom*. 2006;41(8):1073-1085. doi:10.1002/jms.1066

23. Tabb DL, Smith LL, Breci LA, Wysocki VH, Lin D, Yates JR. Statistical Characterization of Ion Trap Tandem Mass Spectra from Doubly Charged Tryptic Peptides. *Anal Chem*. 2003;75(5):1155-1163. doi:10.1021/ac026122m

24. Huang Y, Triscari JM, Tseng GC, et al. Statistical Characterization of the Charge State and Residue Dependence of Low-Energy CID Peptide Dissociation Patterns. *Anal Chem*. 2005;77(18):5800-5813. doi:10.1021/ac0480949

25. Medzihradszky KF, Chalkley RJ. Lessons in *de novo* peptide sequencing by tandem mass spectrometry: Lessons in *De* Novo Peptide Sequencing. *Mass Spec Rev*. 2015;34(1):43-63. doi:10.1002/mas.21406

26. Kapp EA, Schütz F, Reid GE, et al. Mining a Tandem Mass Spectrometry Database To Determine the Trends and Global Factors Influencing Peptide Fragmentation. *Anal Chem*. 2003;75(22):6251-6264. doi:10.1021/ac034616t

27. Jonsson AP, Bergman T, Jörnvall H, Griffiths WJ. Gln-Gly cleavage: a dominant dissociation site in the fragmentation of protonated peptides: Gln-Gly as a dominant dissociation site in peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2001;15(9):713-720. doi:10.1002/rcm.289

28. Chakrabarti P, Pal D. The interrelationships of side-chain and main-chain conformations in proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2001;76(1-2):1-102. doi:10.1016/S0079-6107(01)00005-0

29. Reid GE, Simpson RJ, O'Hair RAJ. A mass spectrometric and ab initio study of the pathways for dehydration of simple glycine and cysteine-containing peptide [M+H]+ ions. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1998;9(9):945-956. doi:10.1016/S1044-0305(98)00068-3

30. Harrison AG, Young AB, Bleiholder C, Suhai S, Paizs B. Scrambling of Sequence Information in Collision-Induced Dissociation of Peptides. *J Am Chem Soc*. 2006;128(32):10364-10365. doi:10.1021/ja062440h

31. Tuytten R, Lemière F, Van Dongen W, et al. Intriguing Mass Spectrometric Behavior of Guanosine Under Low Energy Collision-Induced Dissociation: H_2O Adduct Formation and Gas-Phase Reactions in the Collision Cell. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2005;16(8):1291-1304. doi:10.1016/j.jasms.2005.03.026

32. Tuytten R, Lemière F, Esmans EL, et al. In-source CID of guanosine: Gas phase ion-molecule reactions. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2006;17(8):1050-1062. doi:10.1016/j.jasms.2006.03.012

33. Lee SK, Kim HJ, Jin C, Lee J. Formation of the unusual $[M+H-11\ Da]^+$ ion peak in the collision-induced dissociation mass spectrum of $[M+H]^+$ ion of hydrochlorothiazide. *J Mass Spectrom*. 2009;44(10):1538-1541. doi:10.1002/jms.1640

34. Cao X, Yu Y, Ye X, Mo W. Solvation in Gas-Phase Reactions of Sulfonic Groups Containing Ionic Liquids in Electrospray Ionization Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*. 2009;15(3):409-413. doi:10.1255/ejms.985

35. Purna Chander C, Raju G, Mathai G, et al. Electrospray ionization tandem mass spectrometry of 3-phenyl- *N* -(3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl)-1 *H* -pyrazole-5-carboxamide derivatives: unusual fragmentation involving loss of 11 u: Letter to the Editor. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2012;26(2):207-214. doi:10.1002/rcm.5318

36. Neta P, Farahani M, Simón-Manso Y, Liang Y, Yang X, Stein SE. Unexpected peaks in tandem mass spectra due to reaction of product ions with residual water in mass spectrometer collision cells:

Reactions of product ions with water. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2014;28(23):2645-2660. doi:10.1002/rcm.7055

37. Chai Y, Wang L, Lu C. Formation of molecular oxygen- and water-attached fragment ions in the fragmentation of protonated 3-(phenylthio)chromones. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2020;34(2). doi:10.1002/rcm.8567

38. Alechaga É, Moyano E, Galceran MT. Ion-molecule adduct formation in tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408(4):1269-1277. doi:10.1007/s00216-015-9237-6

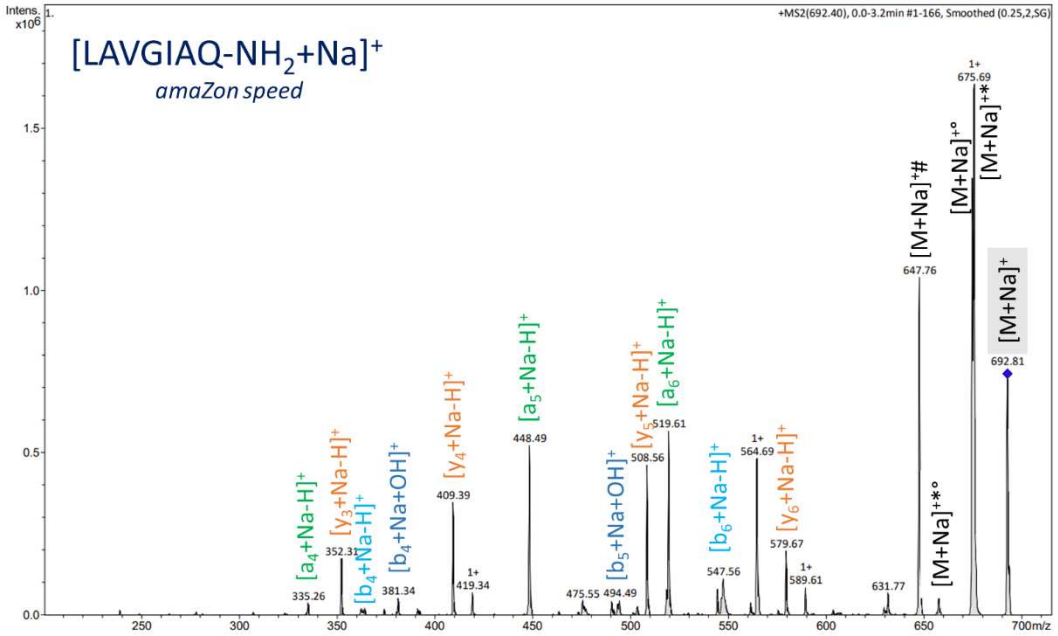
39. Chan CC, Axe FU, Bolgar M, Attygalle AB. Reactivity of gaseous sodiated ions derived from benzene dicarboxylate salts toward residual water in the collision gas. *J Mass Spectrom*. 2010;45(10):1130-1138. doi:10.1002/jms.1792

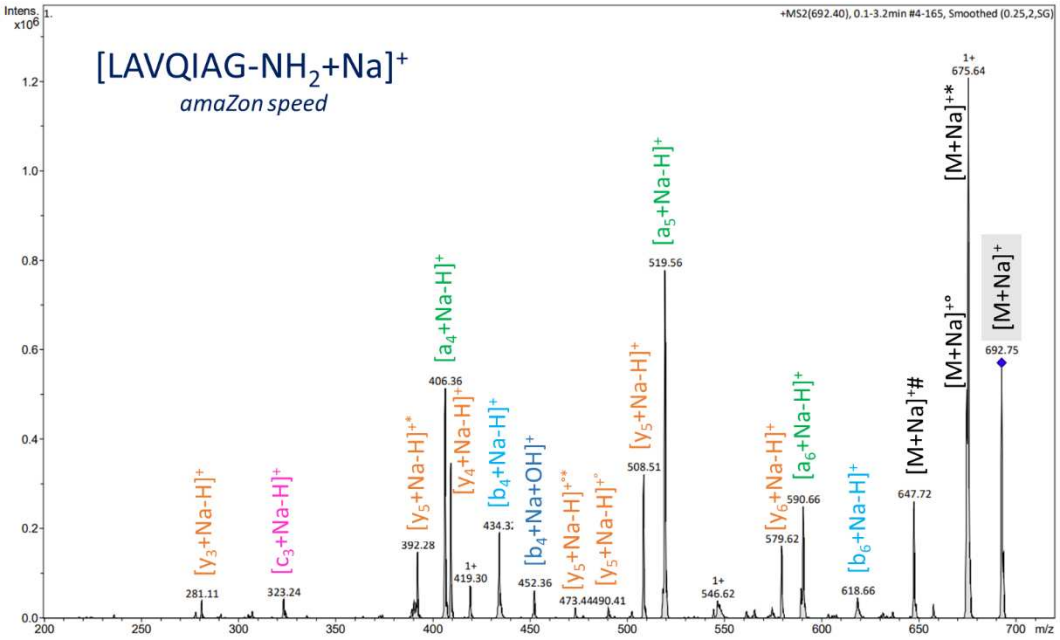
40. Wu YQ, Zhang NW, Li F, Jiang KZ. Deviant Mass Shift of Hydrated Product Ions from Sodiated β-Anilinodidrochalcones Using An Ion-Trap Mass Spectrometer. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*. 2013;19(5):351-359. doi:10.1255/ejms.1244

41. Neta P, Simón-Manso Y, Liang Y, Stein SE. Loss of H_2 and CO from protonated aldehydes in electrospray ionization mass spectrometry: Loss of H_2 and CO from protonated aldehydes. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2014;28(17):1871-1882. doi:10.1002/rcm.6968

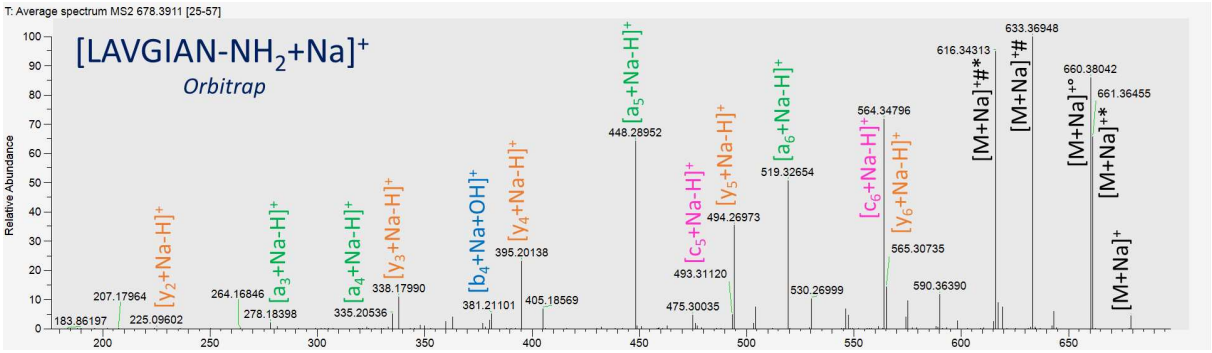
4) Annexes

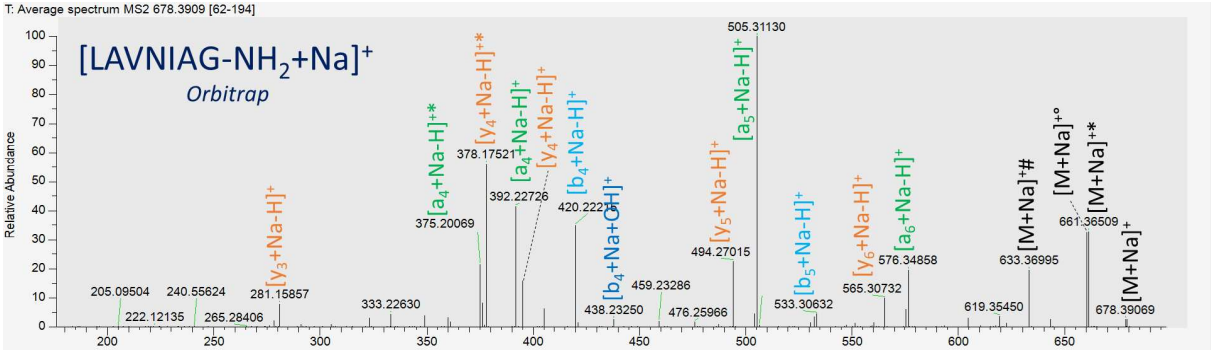
Annexe 6-2.1 : Dissociations de peptides amides sodés contenant une glycine sur le spectromètre de masse amaZon speed (IT)

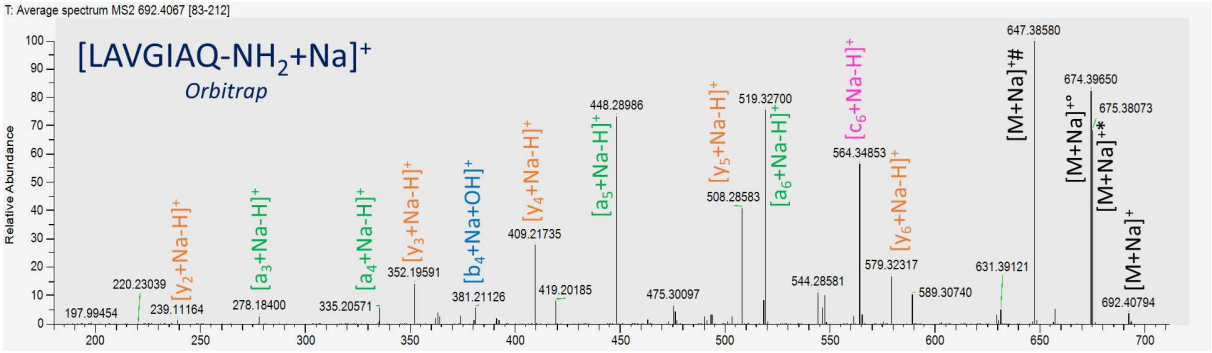


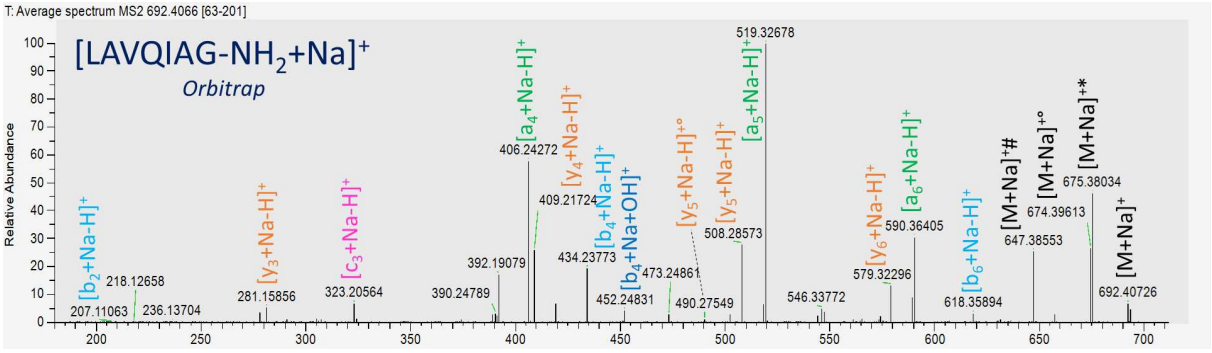


Annexe 6-2.2 : Dissociations de peptides amides sodés contenant une glycine sur le spectromètre de masse Orbitrap™ (IT)

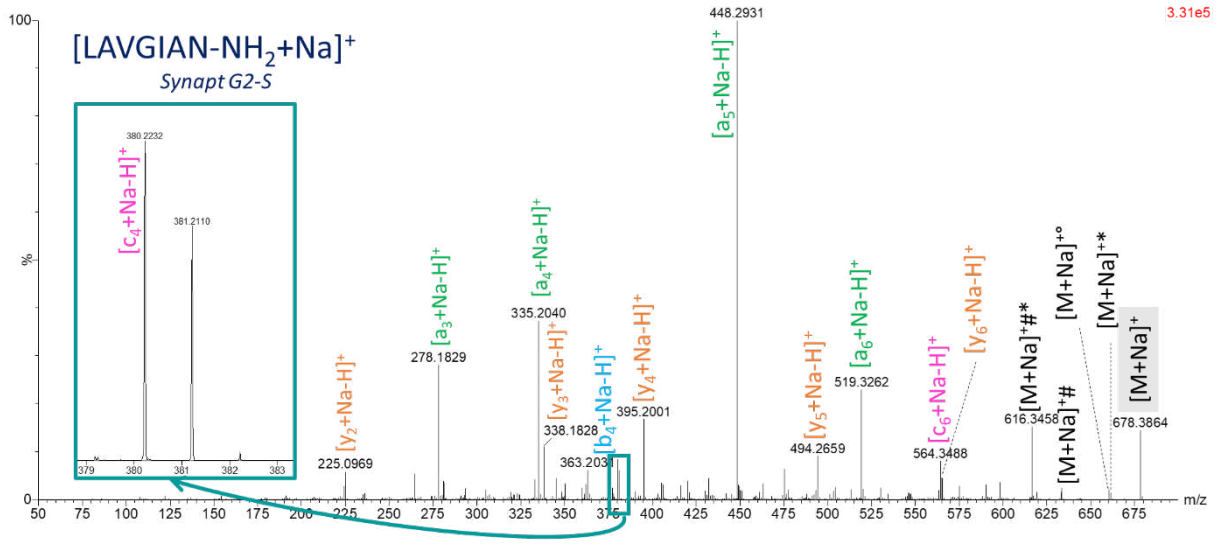


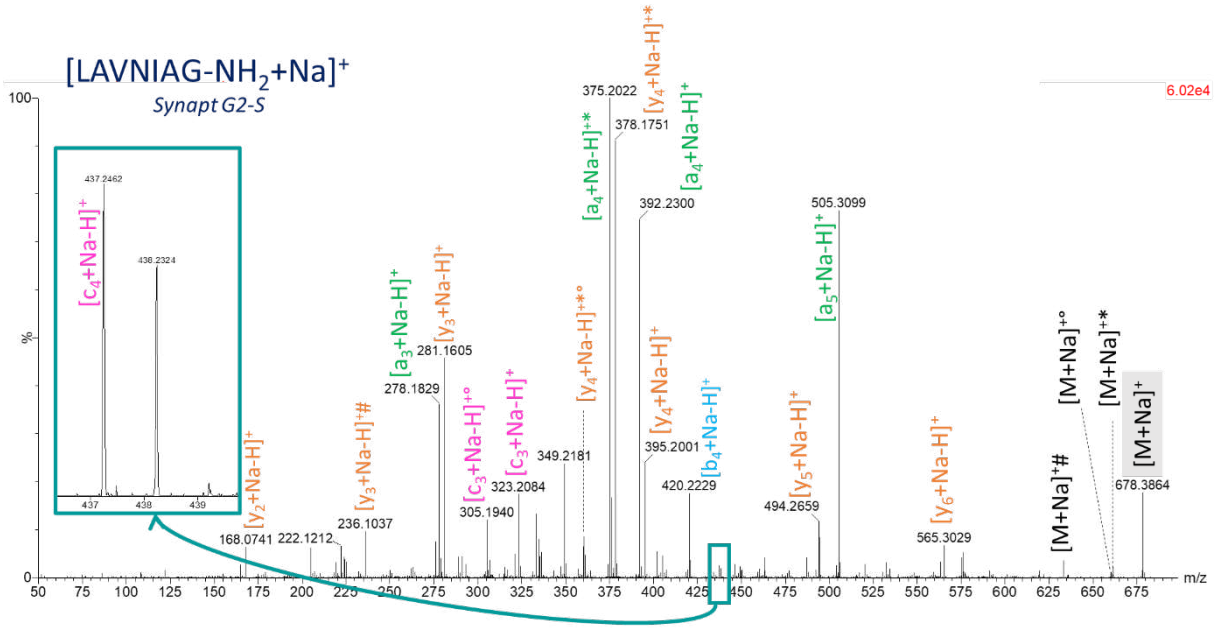


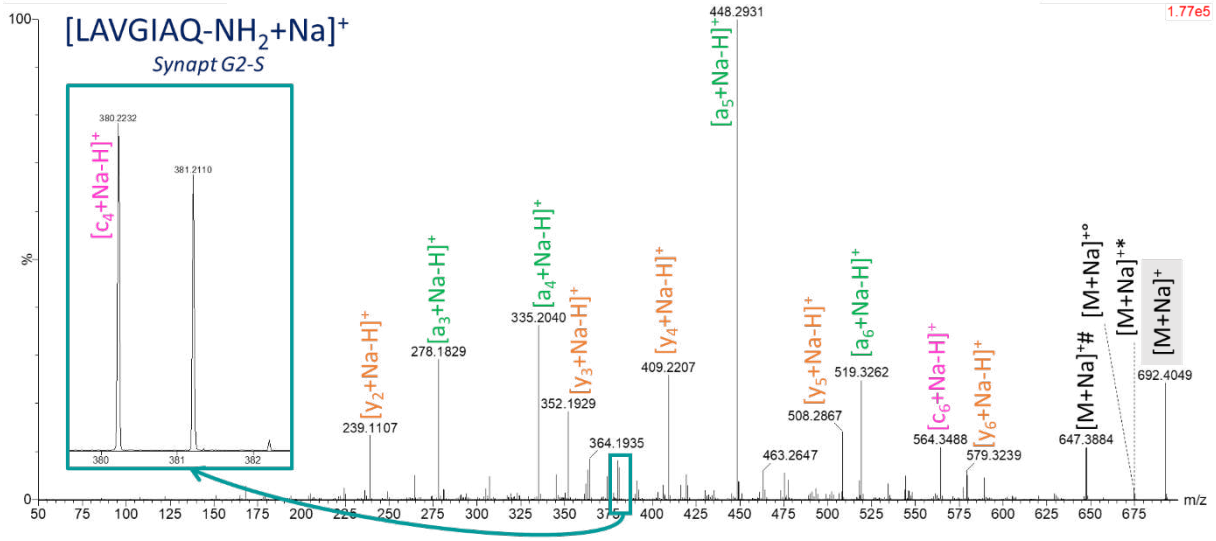


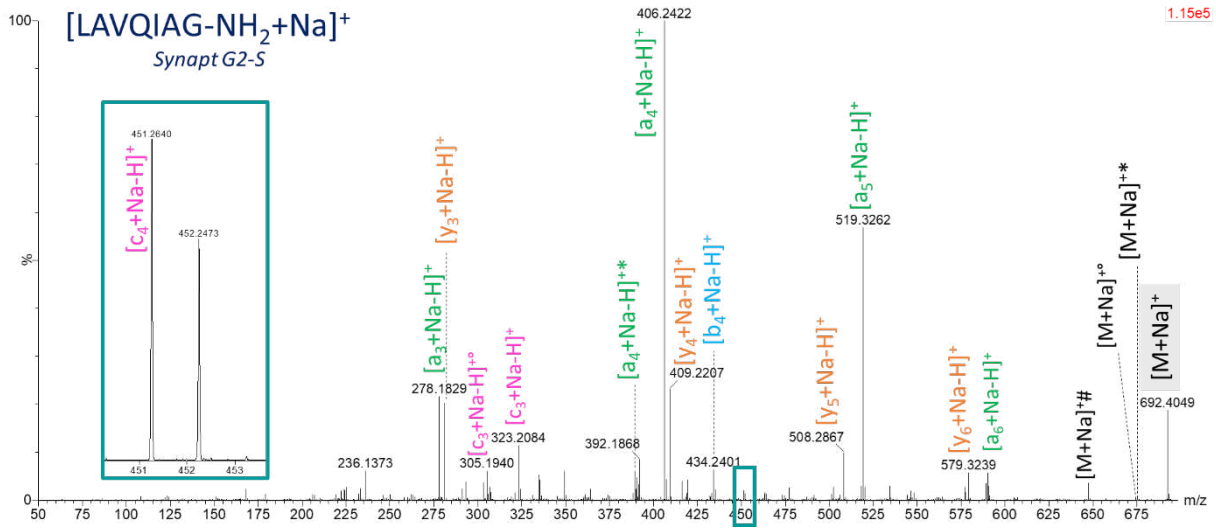


Annexe 6-2.3 : Dissociations de peptides amides sodés contenant une glycine sur le spectromètre de masse Synapt G2-S (QTof)









5) Liste Figures et Tableaux

Figure 1 : Chiralité des acides aminés

Figure 2 : Mécanisme enzymatique proposé par Paramjit et al. [8] qui permet de convertir des résidus de série L en D

Figure 3 : Peptides diastéréoisomères

Figure 4 : Dissociation du peptide ALIAGFV-NH_2 protoné sur le spectromètre de masse amaZon speed (IT)

Figure 5 : Mécanisme de scrambling

Figure 6 : Dissociations de peptides amides sodés sur le spectromètre de masse amaZon speed (IT)

Tableau 1 : Comparaisons masses et formules brutes théoriques et expérimentales d'ions de type $[b_{n-1}+Na+OH]^+$

VII. Conclusion

VII. Conclusion

Afin de résoudre la problématique de caractérisation spécifique de peptides amides dans des échantillons naturels, plusieurs méthodologies ont été développées pour détecter cette modification post-traductionnelle apportant très peu de variation de structure (fonction C-terminale acide ou amide) et de masse (0.984 Da d'écart).

Tout d'abord, la dissociation de peptides amides sodés a été comparée à celle de peptides natifs, afin de mettre en évidence des comportements de fragmentations spécifiques aux séquences amidées. Ces dernières ne permettent pas la génération d'ions issus de l'exclusion du résidu en position C-terminale (sauf en présence de certains résidus) et produisent des ions de type y plus abondants par rapport à leurs homologues natifs.

Ces différences ont ensuite été exploitées pour distinguer les deux formes acide/amide de peptides par des expériences de spectrométrie de masse résolue en énergie. L'usage d'un spectromètre de masse de type piège à ions a permis de réaliser des courbes d'ions survivants à partir de dissociations en MS^2 ou MS^3 en mode positif, mais également en mode négatif. La méthodologie développée à partir d'un jeu de séquences de synthèse a ainsi pu être appliquée à des peptides naturels ainsi qu'à un extrait de venin de cône. En particulier, la problématique de régiosélectivité de la position modifiée acide ou amide (chaine latérale vs squelette) a été considérée car elle est déterminante dans le cas d'échantillons naturels de peptides non connus (séquençage *de novo*).

Ainsi, afin d'améliorer le recouvrement de séquence de peptides amidés de tailles diverses, des expériences MS/MS complémentaires ont été réalisées pour des peptides protonés mais aussi sodés présentant différents états de charge sous activation vibrationnelle CID, utilisée jusqu'alors, et sous activation électronique ETD. La complémentarité des ions fragments produits dans les diverses conditions opératoires a été évaluée selon l'efficacité du séquençage *de novo*.

Enfin, en sus de ces stratégies visant à détecter et identifier un peptide amidé en mélange avec la séquence correspondante carboxylée, l'aspect quantitatif a été abordé. Comme la méthode des ions survivants ainsi que des expériences en mobilité ionique n'ont pas donné de résultats probants, la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution, qui offre la possibilité de séparer les massifs isotopiques des deux peptides différant de 0.984 Da, a été envisagée. Les mesures quantitatives déduites des abondances relatives des ions, ont été comparées à celles obtenues par des techniques séparatives comme la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire plus couramment utilisées dans ce cadre. Cette dernière étude a permis de confirmer la faisabilité d'une quantification relative directe à partir des massifs isotopiques des peptides amides et acides par UHRMS.

A partir de tous les résultats obtenus, d'autres perspectives d'études ont été révélées concernant les peptides contenant des résidus menant à des comportements de fragmentations particuliers comme la glycine, voire des peptides ayant incorporés un résidu de série D. Par ailleurs, des investigations sur les interactions de la chaine latérale de l'histidine avec le squelette peptidique avaient été amorcées au démarrage de la thèse dans le cadre d'une collaboration en cours avec le Professeur F. Blockhuys de l'Université d'Anvers (Belgique). Malheureusement, la crise sanitaire et les restrictions qui en ont découlé n'ont pas permis de poursuivre les discussions et les expériences préliminaires qui avaient été déterminées en Décembre 2019 lors d'un séjour de l'Université d'Anvers. Naturellement, cet axe de recherche mis temporairement en attente est toujours pertinent et pourra être poursuivi.