

L'ionisation electrospray ou l'art d'effleurer les molécules

Bilan d'une décennie et perspectives

Patrick Arpino

Summary **Electrospray ionization mass spectrometry or the art of skimming molecules – A decade of progress and future prospects**

Electrospray ionization (ESI) is a soft ionization technique enabling a mass spectrometer to obtain qualitative and quantitative data from sample molecules that were presumed to be unattainable because of their lack of volatility. The method took a quarter of century before becoming reliable and usable by non-experts, but its progress over the last decade has been impressive, mainly because of the application to biomolecules studies, and in particular, genomics. Experts now evaluate a growth of 18% for mass spectrometry equipments in the near future, because of, but not exclusively, the new possibilities offered by instruments combining liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI/MS).

Mots-clés **Couplage LC/MS, ionisation electrospray, ESI, biomolécules.**
Key-words **LC/MS coupling, electrospray ionization, ESI, biomolecules.**

Pour John Fenn [1], la spectrométrie de masse est l'art de peser les molécules individuelles (the art of weighing individual molecules) – selon l'usage de nos collègues anglo-saxons de préférer parler de « molecular weight » plutôt que de « molecular mass » dans leurs publications. Il est vrai qu'un sentiment manichéen s'empare parfois d'un opérateur aux commandes d'un spectromètre de masse, car il en retire l'impression faussement dominatrice de pouvoir littéralement toucher du doigt les molécules individuelles ; de les envoyer d'une pichenette d'un bout à l'autre de l'espace de sa machine ; de les casser, les assembler, les compter selon son bon vouloir du haut de son pupitre d'ordinateur. La conception harmonieuse de l'appareillage, le choix d'un protocole opératoire astucieux et efficace peuvent ajouter une touche artistique à cette douce et trompeuse euphorie passagère, rythmée par la mélodie monotone des équipements de pompage du vide. Il en a été ainsi depuis les origines de la technique au début du XX^e siècle, d'autant plus que les équipements étaient souvent de dimensions importantes. Cette impression a pu s'accroître davantage au cours de la dernière décennie, quand la spectrométrie de masse s'est considérablement étendue à l'étude des molécules du vivant, grâce notamment aux

développement de deux méthodes d'ionisation : l'ionisation par electrospray (electrospray ionization – ESI) et la méthode d'ionisation par désorption d'une matrice sous l'effet d'un laser (Matrix Assisted Laser Desorption – MALDI). Ces deux méthodes sont capables de propulser les molécules lourdes et polaires, d'une solution liquide ou d'une matrice solide, vers une phase gazeuse à pression atmosphérique en les perturbant si peu, les effleurant à peine, qu'il devient possible d'accéder à leur masse et parfois à des éléments de leur structure. Le développement de ces nouvelles techniques a été de pair avec les modifications des spectromètres de masse, aujourd'hui plus compacts et plus performants.

Le propos dans ce qui suit est plus de parler de l'electrospray que du MALDI, sans établir de comparaison relative. Les deux méthodes d'ionisation atteignent le même but – l'analyse par spectrométrie de masse des molécules de masses élevées – mais elles utilisent des équipements de spectrométrie de masse distincts et seule l'ESI est raccordable en ligne aux méthodes séparatives en phase liquide (LC/MS). Quelques laboratoires utilisent d'ailleurs les deux techniques de manière complémentaire lorsqu'ils ont suffisamment de moyens pour se procurer deux spectromètres de masse.

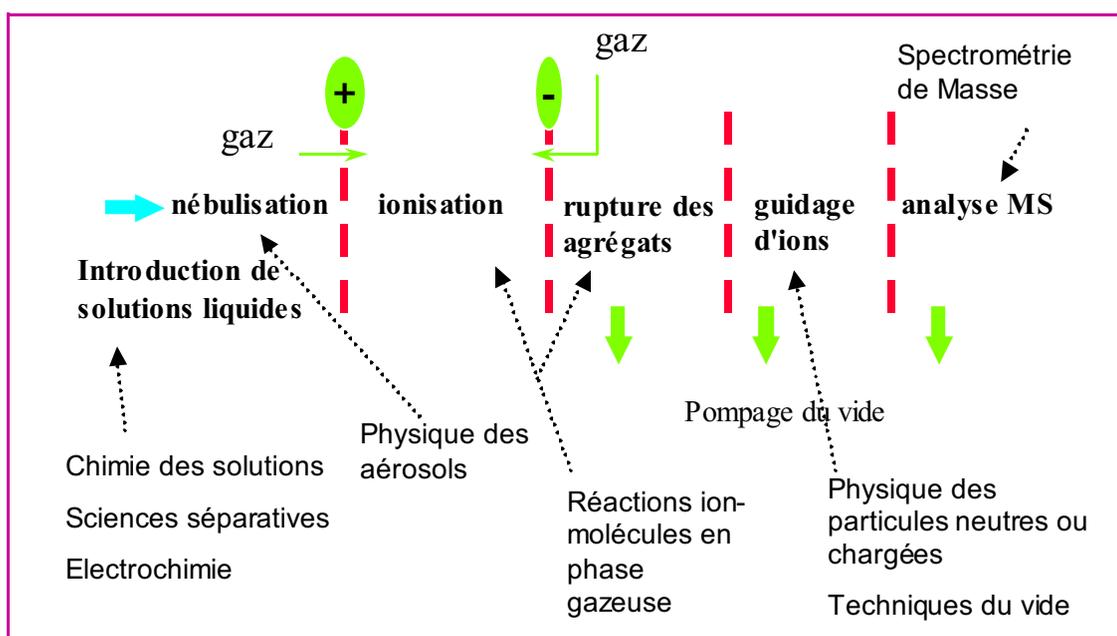


Figure 1 - Schéma de la suite de processus physico-chimiques mis en jeu au cours de l'ionisation electrospray et disciplines scientifiques concernées.

L'objectif de cet article est de dresser le constat d'une décennie de progrès rapides et d'évaluer la situation actuelle en LC/ESI/MS, appuyé sur une compilation d'une base de donnée répertoriant 10 000 articles.

Une série d'étapes consécutives délicates

On ne rappellera ici que très succinctement les principes de l'ionisation electrospray. Au moins 220 revues générales sur cette méthode ou l'un de ses domaines d'application sont parues au cours de la dernière décennie, comme nous l'indiquerons plus loin. Un livre [2], et quelques références [3-9] constituent une base de départ pour plus d'informations.

La réussite de l'opération consistant à prendre des molécules pré-ionisées en solution dans une phase liquide, à les transférer intactes vers une phase gazeuse, puis à les échantillonner vers le vide du spectromètre de masse, nécessite d'accomplir une série d'étapes rapides et consécutives (*figure 1*). C'est une chaîne d'évènements dont chacun conditionne le succès global. La mise au point d'un appareillage commercial permettant d'exécuter de manière satisfaisante ce processus s'est étalée sur presque 25 ans, depuis la découverte initiale de l'ionisation electrospray par Malcom Dole en 1968 [10], sa disparition puis sa redécouverte en 1984 par John Fenn [11-12], sa lente progression au cours des années 1984-1994, et enfin sa phase exponentiellement croissante depuis 1994. La raison en est que chaque étape fait appel aux compétences d'experts dans des disciplines qui ne se fréquentent pas toujours dans les congrès ou ne publient pas dans les mêmes journaux thématiques : rarement une

approche pluridisciplinaire ne fut autant nécessaire pour comprendre les processus fondamentaux et élaborer un équipement satisfaisant.

L'introduction de solutions liquides à débits dans un large intervalle, de quelques nanolitres jusqu'à 1 millilitre par minute, fait appel aux connaissances de la chimie des solutions puisque la présence de sels, la nature du solvant, le pH de la solution influent sur la réponse globale. En amont, les sciences séparatives sont mises à contribution, même si beaucoup d'applications actuelles sont encore effectuées en introduisant directement des solutions liquides issues d'étapes de préparation d'échantillon, mais sans fractionnement chromatographique couplé à la source ESI.

La formation d'ions en solution résulte d'équilibres ioniques en milieu liquide et aussi de réactions électrochimiques. Kebarle et col. [13-14] ont ainsi montré qu'une source ESI s'apparentait à une cellule électrochimique d'un genre particulier. La haute tension positive appliquée au nébuliseur a pour effet d'enlever les charges négatives de la solution, qui en conséquence s'enrichit en ions positifs. Le processus est inversé lorsqu'on permute la polarité de la source haute tension.

La dispersion de la solution liquide en un nuage de fines gouttelettes est également une étape fondamentale impliquant une bonne connaissance de la physique des aérosols. La plupart des méthodes classiques de nébulisation des liquides ont été tentées dans un montage ESI : nébulisation pneumatique (dispersion par un courant de gaz coaxial au jet de liquide) dans le montage « ionspray » [15] ; nébulisation ultrasonique (agitation mécanique du nébuliseur) dans le montage « ultraspray » [16] ; dispositifs de chicanes et de « briseurs » de jets [17].

Certains montages récents combinent plusieurs de ces dispositifs classiques.

Le passage des ions depuis la gouttelette de solution liquide vers la phase gazeuse est actuellement l'objet de deux théories. Dans l'une, due à Iribarne et Thomson, on admet qu'un ion puisse s'échapper directement d'une nanogouttelette (ion évaporation [18-19]), alors que dans l'autre, avancée par Röllgen [20], l'évaporation ultime des dernières molécules de solvant laisse l'ion du soluté en suspension dans la phase gazeuse (residual charge limit). Cette distinction n'a que peu d'importance car dans les deux hypothèses, le processus d'ionisation n'en reste pas là et se poursuit par une cascade de réactions ion-molécules en phase gazeuse. Difficile de dire si l'on a affaire à un ion-soluté solvaté par une cage d'une dizaine de molécules de solvant venant de la gouttelette initiale, ou à un ion-soluté nu qui ensuite regrossi, par des réactions ion-molécules, en s'entourant de molécules de solvants polaires toujours présents dans une source à pression atmosphérique, principalement la vapeur d'eau. Il faut donc dissocier ces agrégats moléculaires par d'autres réactions ion-molécules avec un gaz neutre (azote le plus souvent). Des connaissances fondamentales dans ce domaine physico-chimique sont ainsi indispensables.

L'échantillonnage des ions de la source à pression atmosphérique à l'analyseur sous un vide de 10^{-6} millibar relève de la physique des faisceaux d'ions et de molécules neutres. Des processus collisionnels brisent les agrégats, excitent et fragmentent les ions-soluté si on le souhaite, dispersent les particules et les produits de réactions selon des trajectoires qu'il faut contrôler avec précision. Les techniques du vide sont étroitement associées à la conception de cette partie délicate de l'appareillage, mais elle est souvent « fermée » aux interactions éventuelles de l'utilisateur, sauf pour des collisions permettant de dissocier certains ions-soluté.

La spectrométrie de masse, en fin de chaîne, intervient enfin pour mesurer, identifier et manipuler les espèces ioniques.

Les raisons d'une mise au point laborieuse

Cette cascade d'évènements et les moyens nécessaires pour les mettre en œuvre eurent plusieurs conséquences. La première est d'expliquer la lente gestation de la mise au point de l'appareillage. Dans les premiers travaux utilisant l'ESI, une étape était parfois négligée ou mise en œuvre de manière erronée. Par exemple dans les expériences de Dole en 1968 [10], la dispersion électrostatique et l'échantillonnage sous vide était corrects, mais le jet d'azote était mal dirigé pour dissocier des agrégats, la mesure de masse des ions était soit absente (remplacée par une simple mesure du courant d'ion par une cage de Faraday), soit obtenue par un dispositif inadapté (déduction de la masse des ions à partir de la mesure

de leur mobilité dans un tube de dérive). Enfin, il joua de malchance en choisissant comme échantillon-test une classe de molécules connues aujourd'hui pour être parmi les plus difficiles à analyser par ESI. Dole utilisa en effet une solution de polystyrène dans un mélange d'acétone et de benzène, soit une molécule lourde mais peu polaire, alors que l'ESI se prête mieux à l'analyse de molécules fonctionnalisées par des groupements polaires, e.g. protéines, dans des solutions fortement aqueuses.

Cette « malchance du pionnier » n'est pas la première du genre : James et Martin [21] dans leur publication fondatrice de la chromatographie en phase gazeuse utilisèrent comme molécules-test des acides gras libres et des amines libres, de C_1 à C_7 – des molécules très difficiles à analyser sans transformation préalable en dérivés volatils.

Fenn, qui intervient 16 ans plus tard, est un physicien déjà reconnu pour sa contribution à la physique des faisceaux moléculaires : il apporta ses compétences dans le domaine de la physique du vide, des jets de particules et des interactions ion-molécules pour corriger les défauts du montage de Dole. Dans l'introduction du livre de Cole [2], Fenn donne un passionnant récit de cette période, ainsi que de ses relations personnelles avec Malcolm Dole, dont il connaissait les travaux mais qu'il n'avait pas rencontré avant de publier ses résultats en 1984 [11-12]. Il le fit par la suite et entretint une correspondance jusqu'au décès de Dole en 1991, qui ne put donc voir l'explosion des applications de la méthode qu'il avait entrevue en 1968. Fenn rend également hommage à son collègue de l'université de Yale où il exerçait, le Pr Shaba Horvath. Cet expert renommé des méthodes séparatives réussit à le persuader de développer une méthode de détection et d'identification pour la chromatographie en phase liquide, basée sur la spectrométrie de masse et palliant les inconvénients de toutes celles, souvent onéreuses et peu satisfaisantes, déjà introduites par les constructeurs d'appareillages au début des années 1980 (interface à ruban mobile, interface à introduction liquide et quelques autres aujourd'hui totalement disparues). Cette collaboration informelle et fructueuse est une bonne illustration de l'intérêt à confronter les connaissances d'experts dans des disciplines différentes.

On pourrait citer encore d'autres modifications et tâtonnements multiples décrits dans les publications des années 1980 qui expliquent la longue période de gestation de la méthode ESI, qui ne décolle véritablement qu'à partir de 1990, pour prendre une pente exponentiellement croissante après 1994 (figure 2). Ce succès s'explique par la contrepartie des difficultés de mise au point. Après avoir corrigé les problèmes de chaque étape fondamentale et mis au point des appareillages performants, la méthode ESI est devenue un formidable outil d'investigation pour les sciences séparatives, la chimie des solutions, la physique et la chimie des réactions ion-molécules, l'électrochimie, la physique et la chimie des aérosols,

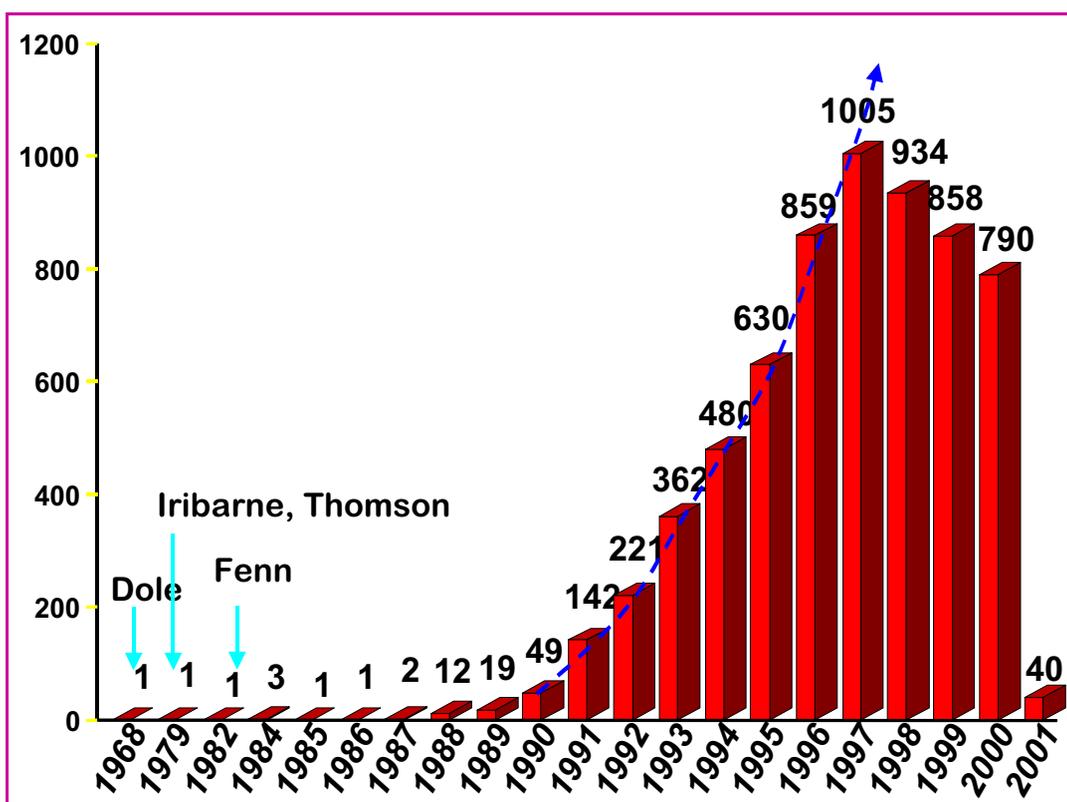


Figure 2 - Nombre de publications annuelles décrivant une recherche sur l'électrospray ou une application utilisant cette méthode. Source : LC/MS applications data base de HD Science, version de juillet 2001. Sur 9 995 références de la période 1991-2001, on compte 6 095 (61 %) titres sur l'ESI, dont 220 revues générales. Le délai de traitement entre la parution d'un article et sa prise en compte par HD Science explique la différence entre la tendance estimée en pointillé et le nombre d'articles recensés dans la base.

la spectrométrie de masse... et toutes les applications en chimie organique, en chimie inorganique et en biochimie qui en découlent. Cela fait beaucoup, d'où un nombre considérable de publications et de revues générales.

Des publications très nombreuses... et quelques outils pour les dénombrer

Plusieurs outils permettent de recenser rapidement les nombreuses publications traitant de l'électrospray, de ses aspects fondamentaux ou de ses applications. La manière la plus simple et la moins onéreuse est de se connecter à la base de données Medline, élaborée par le Département américain de la santé (NIH). On peut y accéder directement (research.bmn.com/medecine) ou indirectement par l'intermédiaire du site Chemweb.com (www.chemweb.com/databases/medline). Une simple requête utilisant uniquement le mot « electrospray » procure déjà une liste impressionnante de résultats. Un autre plus complète utilise la séquence suivante : « electrospray OR ion? spray OR ES? ». L'ionspray [15] est un nom d'origine commerciale, désignant un montage electrospray assisté par un nébuliseur pneumatique coaxial, que l'on retrouve écrit de diverses manières – ionspray, ion spray, ion-spray... D'autres noms commerciaux désignent des variantes technologiques. Toutefois, il

semble y avoir un accord pour réserver au seul terme « electrospray » le nom d'une méthode fondamentale de production d'ions en phase gazeuse à partir de solutions liquides électriées. L'abréviation ESI est également la plus fréquente, même si ESP ou ES ont parfois été employées. Une requête à l'aide de la phrase ci-dessus conduit à une liste d'environ 3 000 à 4 000 publications pour la période 1990-2001. De part leur origine, les références de cette base de données couvrent surtout le domaine biomédical, des applications dans les domaines inorganiques ou organiques peuvent être ignorées, mais le principal problème demeure de se procurer un échantillon de publications représentatives et surtout... de prendre le temps de les lire. La base Medline n'est pas la seule source gratuite possible de recherche bibliographique sur l'ESI, mais elle est celle qui procure commodément des informations très complètes. En plus des descripteurs habituels : titre, auteur, source... elle fournit également un résumé détaillé, repris du résumé de la publication citée.

D'autres outils de recherche bibliographiques sont également disponibles. Certains sont libres de droits (base de donnée française INIST, www.inist.fr, ou sites Internet des principaux éditeurs de revues scientifiques – Elsevier (www.scirus.com), Wiley, Springer... mais qui limitent la recherche aux seuls journaux qu'ils éditent). D'autres, soumis à un

abonnement, sont accessibles en ligne *via* Internet (Chemical Abstracts, STN (www.fiz-karlsruhe.de)...) ou procurent des CD-Rom. Parmi ces derniers, on trouve une base de données exclusivement consacrée aux méthodes LC/MS intitulée « LC/MS: The applications database » tenue à jour par la société anglaise HD Science (www.hdscience.com).

Cette base de données existe depuis plus d'une décennie. A la forme papier des premiers fascicules adressés aux abonnés a succédé un format électronique. Les données sont inscrites sur un CD-Rom remis aux abonnés 3 à 4 fois par an, lors de chaque mise à jour. Chaque référence est sous la forme d'un fichier au format largement répandu des documents d'Adobe (*.pdf). En plus des descripteurs de la référence, le fichier contient un résumé de la méthode rédigé par HD Science, et donc différent du résumé habituellement présent dans la publication originale. Ce résumé spécial décrit principalement la méthode expérimentale, dont les équipements utilisés pour mettre en œuvre les expériences, ce qui s'avère utile pour dupliquer les conditions opératoires, mais il introduit un délai de quelques mois entre la parution publique de l'article et sa prise en compte effective. La base de données se limite à la période 1991 jusqu'à ce jour et compte actuellement 10 000 références dont 6 000 utilisent l'electrospray.

Si l'electrospray représente 60 % des références depuis 1991, cette proportion dépasse les 80 % de celles parues depuis 1999. On peut ainsi évaluer à plus de 2 000 le rythme annuel actuel de publications. Le MALDI n'est habituellement pas comptabilisé dans les publications de LC/MS, à quelques exceptions près de procédés « off-line » où des fractions sont collectées puis soumises à une analyse MALDI/MS.

Deux histogrammes (*figures 3 et 4*) déduits d'une analyse de la base de données HD Science fournissent des renseignements significatifs. Ils reposent sur l'analyse de 5 842 articles concernant l'electrospray, ayant retiré de la recherche 220 revues générales.

Les principales méthodes d'introduction de solutions liquides

On relèvera cette contradiction apparente, mais que continue de propager les fabricants d'appareils et les auteurs d'articles, de continuer de parler de méthodes LC/MS au sujet de l'electrospray et des méthodes qui l'ont précédé (thermospray, continuous flow FAB, particle beam et une kyrielle d'autres dispositifs aujourd'hui obsolètes) pour tout procédé permettant d'introduire en continu des solutions liquides dans un spectromètre de masse, même en l'absence d'un procédé de séparation chromatographique (LC étant pourtant l'abréviation de liquid chromatography !).

Le premier histogramme (*figure 3*) recense les dispositifs d'introduction mis en œuvre conjointement avec une analyse electrospray. Ce détail n'est pas toujours clairement indiqué et on ne prétendra pas ici avoir consulté les textes intégraux des 5 842 articles référencés, mais dans 36 % des travaux, il est clairement mentionné que les échantillons sont introduits à l'aide d'un pousse-seringue, et donc en l'absence de toute séparation chromatographique en ligne.

Comme nous le verrons plus loin, les molécules d'origine biologiques sont les plus nombreuses à être analysées par electrospray. Les échantillons sont alors fréquemment le résultat de procédés de fractionnement classiques en biochimie et introduits

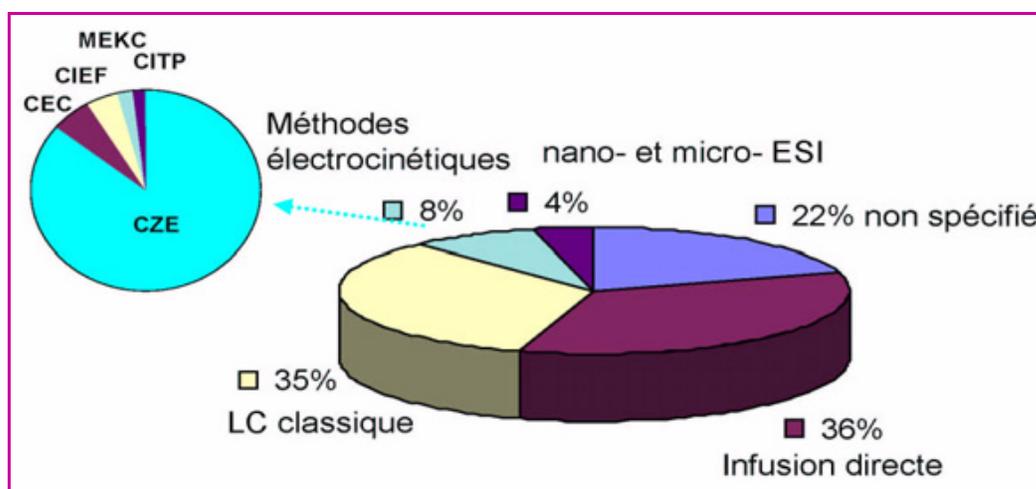


Figure 3 - Principaux dispositifs d'introduction des solutions liquides dans une source electrospray, selon une compilation de la base de données : LC/MS applications data base de HD Science, version de juillet 2001. Sur 5 842 références (hors revues générales) de la période 1991-2001. Infusion directe : introduction de faibles débits – 1 à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ au moyen d'un pousse-seringue ; LC classique : chromatographie liquide majoritairement en polarité de phase inversée, sur des colonnes de silice greffée par des chaînes alkyles, et des colonnes de 2 à 4 mm de diamètre interne. Méthodes électrophorétiques : CZE, Capillary zone electrophoresis ; CEC, Capillary electrochromatography ; CIEF, Capillary Isoelectric focussing ; MEKC, Micellar electrokinetic chromatography ; CITP, Capillary isotachopheresis. Nano- et micro-ESI dispositifs d'introduction de liquide à des débits de 1-100 nanolitre/minute.

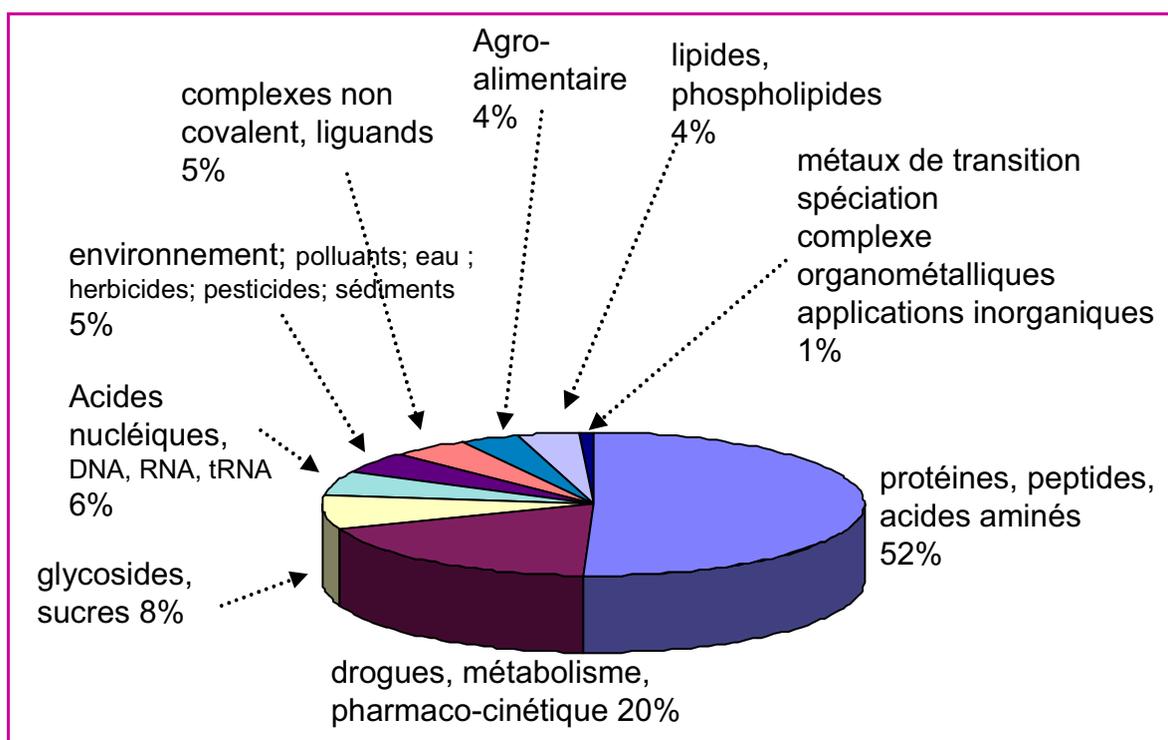


Figure 4 - Principaux domaines d'application de l'ionisation electrospray, selon une compilation de la base de données : LC/MS applications data base de HD Science, version de juillet 2001. Basée sur 5 842 références (hors revues générales) de la période 1991-2001.

directement en solution dans une solution dont la composition, d'un travail cité à un autre, ne varie guère (typiquement 50 % eau ; 50 % d'alcool ou d'acétonitrile ; 1 % d'un acide volatil ; moins de 50 mmol d'un tampon volatil), l'objet étant de vérifier la masse de la molécule ou de la fragmenter de manière contrôlée pour accéder à sa séquence.

Cette tendance à vouloir se passer de processus séparatifs en amont est cependant en voie de diminution. De plus en plus de travaux utilisent désormais des méthodes chromatographiques en phase liquide, adaptées aux conditions LC/MS, notamment en réduisant le diamètre interne des colonnes séparatives. Une autre tendance consiste à miniaturiser le mode d'introduction dans de véritables « puces à ESI », combinant un dispositif de séparation et une source ESI miniature, comme décrits par Le Gac et Rolando dans ce journal [22].

Un autre résultat instructif est la part modeste encore occupée par les méthodes électrophorétiques (8 %), dont principalement l'électrophorèse capillaire de zone [23-24], puis l'électrochromatographie [25-26]. L'electrospray a cette particularité de nécessiter la présence de solutés préférablement ionisés en solution, mais dans une solution de faible force ionique totale. Les tampons ajoutés en grandes quantités pour contrôler les conditions du débit électroosmotique nuisent à la réponse des échantillons à l'electrospray. De plus, ils sont fréquemment non vaporisables et encrassent rapidement les sources ESI. Plusieurs travaux récents visent à trouver des compositions de solutions plus satisfaisantes [23], ainsi que des

modifications de la géométrie des sources, notamment par une introduction orthogonale des solutions, ont permis de réduire ces effets néfastes. Même si l'electrospray n'est pas encore le détecteur espéré des méthodes électrophorétiques, le nombre de publications dans ce domaine s'accroît néanmoins et le sujet apparaît toujours prometteur.

Prépondérances des applications aux secteurs du vivant

Le second histogramme (figure 4) représente la répartition des domaines d'application où l'ESI a été utilisé. Plus d'un article sur deux concerne l'analyse de protéines, d'oligopeptides ou d'acides aminés, ce qui est phénoménal. Les acides nucléiques, ADN, ARN, sont aussi, mais dans une moindre mesure, analysés par electrospray, sans doute parce que l'analyse des ions négatifs auxquels ils conduisent est moins sensible et plus délicate que l'analyse des ions positifs obtenus à partir des protéines. L'autre grand domaine est celui du médicament. Ici l'histogramme est sans doute imprécis lorsqu'il s'agit d'attribuer à la recherche pharmaceutique ou à l'analyse des peptides la détermination des produits obtenus par chimie combinatoire. Cependant les études pharmacocinétiques, les recherches de dépistage du dopage font très souvent appel à des techniques de laboratoire mettant en œuvre l'electrospray.

A l'autre extrémité se trouvent des domaines centrés sur l'analyse de molécules parfois lourdes mais peu polaires (lipides, graisses de l'agroalimentaire,

hydrocarbures lourds du pétrole et de ses produits dérivés). L'électrospray est alors mis en œuvre, de manière plus marginale, pour des classes particulières de molécules, offrant des sites polaires ou ionisables, qui résistent aux méthodes couramment utilisées dans ces secteurs pour l'analyse des molécules apolaires. Une mention particulière concerne le domaine de l'environnement où l'électrospray se trouve souvent en concurrence avec la méthode d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Seules les molécules vaporisables à pression atmosphérique peuvent être analysées par APCI, ce qui limite le domaine à celles de moins de 1 200 Da environ. APCI et ESI peuvent généralement être mises en œuvre sur le même spectromètre de masse, mais lorsqu'une molécule répond aux deux techniques d'ionisation, l'APCI est souvent préférée s'il s'agit d'un dosage quantitatif. L'analyse quantitative est souvent au cœur des analyses dans les secteurs de l'environnement, car il s'agit souvent de délimiter les seuils de détection et les seuils de toxicité, c'est pourquoi les analyses dans ce domaine se répartissent entre les applications de l'ESI et de l'APCI.

A titre indicatif, l'APCI est utilisé dans environ 800 articles sur les 10 000 de la base HD Science, soit beaucoup moins que ceux concernant l'ESI. Mais dans 50 % des analyses APCI, on trouve un résultat quantitatif. Cette proportion tombe à 20 % lorsque l'on examine les publications sur l'ESI, indiquant que cette méthode est plus souvent utilisée en analyse qualitative, notamment pour confirmer une masse moléculaire. Mais du fait du très grand nombre de travaux en ESI, il y a, en chiffres bruts, plus d'analyses quantitatives obtenues par ESI que par APCI. L'analyse ESI quantitative est souvent rendue difficile par le faible domaine de linéarité et la saturation du signal pour des concentrations d'échantillon au-delà de 10^{-5} M. Pour répondre à ce problème, une technique qui rappelle la dilution isotopique a été développée, et porte l'acronyme d'ICAT pour isotope-coded affinity tag [27].

Un accroissement prévisible des investissements pour de nouveaux équipements dans les laboratoires

Une étude menée par un organisme bancaire, UBS Warburg LLC [28], auprès d'environ 500 chercheurs actifs en spectrométrie de masse de laboratoires publics ou privés évalue à 18 % l'accroissement des équipements en spectrométrie de masse en 2001 et 2002. Elle note cependant un décalage entre l'optimisme des réponses quant à l'avancée des techniques justifiant l'acquisition de nouveaux appareillages et un certain pessimisme lorsqu'il s'agit d'évaluer les chances d'en obtenir les financements nécessaires. Les réponses placent au premier rang le développement de l'ionisation MALDI couplée à un seul analyseur de masse à temps de vol (MALDI-TOF) ou à deux analyseurs en série (MALDI-TOF-TOF), bien

avant l'électrospray et les méthodes LC/ESI/MS qui s'adaptent aussi bien aux analyseurs de masse quadripolaires qu'aux analyseurs à temps de vol. Quelle que soit la technologie, on parle ici d'équipements dans un intervalle de coût allant de 150 000 à 600 000 €, rendant obsolètes des appareillages acquis pour des sommes équivalentes voici moins de cinq ans, et qui risquent de devenir tout aussi rapidement caducs si les techniques continuent d'évoluer au rythme actuel. On comprend que des organismes de financement et des sociétés d'instrumentation observent attentivement ces tendances, mais également les gestionnaires des laboratoires publics ou privés, bientôt confrontés aux demandes de soutien et d'acquisition de nouveaux équipements qu'ils ne manqueront pas de recevoir.

Conclusion : la spectrométrie de masse victime de son succès ?

Ce titre de paragraphe est emprunté à un texte récent d'Alain Van Dorsselaer [29] et qui est l'expression d'un sentiment largement partagé par les chercheurs actifs depuis plusieurs années en spectrométrie de masse. Que ce soit en France lors de journées nationales annuelles de la Société Française de Spectrométrie de Masse (SFSM), ou celles aux États-Unis de l'American Society for Mass Spectrometry (ASMS), les organisateurs constatent avec un certain dépit que les amphithéâtres se remplissent de biologistes à l'affût des derniers développements technologiques qu'ils pourraient utiliser – la protéomique, pour ne citer que ce domaine, étant un sujet où la compétition entre équipes est particulièrement vive, et où les retombées économiques et industrielles sont importantes – et que dans le même temps, les communications sur des aspects plus académiques de la spectrométrie de masse – les « beaux sujets de recherche » – ont lieu devant des parterres bien plus clairsemés. « Trop de biologistes : pas assez de vrais massistes » entend-on ici et là.

Ce cri d'agacement n'est pas sans rappeler une situation très comparable, au milieu des années 70 lors de l'explosion des techniques et des applications pour le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (GC/MS). Déjà, les congrès de spectrométrie de masse de part et d'autre de l'Atlantique furent envahis d'acteurs dans des domaines biologiques et pharmaceutiques, provoquant le même agacement des « vrais massistes » [29]. Puis le temps a passé et chacun a trouvé sa place pour la progression des connaissances dans son domaine de compétence.

En GC/MS voici 30 ans, en LC/ESI/MS aujourd'hui, on se trouve devant le cas d'une méthode d'analyse qui échappe à ses concepteurs. Le bébé a grandi, il s'émancipe et il ne faut pas s'étonner de le voir partir – c'est le lot de toute méthode analytique réussie. Fort heureusement, il reste bien des recoins sombres et inexplorés dans les multiples spécialités d'une

méthode aussi complexe que l'électrospray, ainsi que dans d'autres méthodes de production et d'analyse des ions, pour continuer de devoir former de nouveaux experts, tant enseignants que chercheurs, et d'installer de nouveaux laboratoires dans les années à venir.

Références

- [1] Fenn J.B., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, *200*, p. 459.
 [2] Cole R.B., *Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications*, Wiley, New York, **1997**.
 [3] de Jong A., *Mass Spectrom. Rev.*, **1998**, *17*, p. 311.
 [4] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M., *Mass Spectrom. Rev.*, **1990**, *9*, p. 37.
 [5] Niessen W.M., *J. Chromatogr. A*, **1998**, *794*, p. 407.
 [6] Sussmuth R.D., Jung G., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **1999**, *725*, p. 49.
 [7] Van Bocxlaer J.F., Clauwaert K.M., Lambert W.E., Deforce D.L., Van den Eeckhout E.G., De Leenheer A.P., *Mass Spectrom. Rev.*, **2000**, *19*, p. 165.
 [8] von Brocke A., Nicholson G., Bayer E., *Electrophoresis*, **2001**, *22*, p. 1251.
 [9] Wu Y., *Biomed. Chromatogr.*, **2000**, *14*, p. 384.
 [10] Dole M., Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D., Alice M.B., *J. Chem. Phys.*, **1968**, *49*, p. 2240.
 [11] Yamashita M., Fenn J.B., *J. Phys. Chem.*, **1984**, *88*, p. 4451.
 [12] Yamashita M., Fenn J.B., *J. Phys. Chem.*, **1984**, *88*, p. 4671.
 [13] Tang L., Kebarle P., *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, p. 3654.
 [14] Kebarle P., Tang L., *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, p. 972A.
 [15] Bruins A.P., Covey T.R., Henion J.D., *Anal. Chem.*, **1987**, *59*, p. 2642.
 [16] Banks J.F. Jr, Quinn J.P., Whitehouse C.M., *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, p. 3688.
 [17] Hirabayashi A., Sakairi M., Koizumi H., *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, p. 2878.
 [18] Thomson B.A., Iribarne J.V., *J. Chem. Phys.*, **1979**, *71*, p. 4451.
 [19] Iribarne J.V., Thomson B.A., *J. Chem. Phys.*, **1976**, *64*, p. 2287.
 [20] Schmelzeisen-Redeker G., Büttfering L., Röllgen F.W., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1989**, *90*, p. 139.
 [21] James A.T., Martin A.J.P., *Analyst*, **1952**, *77*, p. 915.
 [22] Le Gac S., Rolando C., *L'Act. Chim.*, février **2002**, p. 21.
 [23] Tong W., Link A., Eng J.K., Yates J.R., *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, p. 2270.
 [24] Begona Barroso M., de Jong A.P., *J. Capillary Electrophor.*, **1998**, *5*, p. 1.
 [25] Apfel A., Yin H., Hancock W.S., McManigill D., Frenz J., Wu S.L., *J. Chromatogr. A*, **1999**, *832*, p. 149.
 [26] Choudhary G., Horvath C., Banks J.F., *J. Chromatogr. A*, **1998**, *828*, p. 469.
 [27] Jenkins R.E., Pennington S.R., *Proteomics*, **2001**, *1*, p. 13.
 [28] Khanna V., Harper M., *Mass Spectrometry User Survey*, UBS Warburg, New York, **2001**.
 [29] Van Dorsselaer A., *Lettre d'Automne de la SFSM*, **2001**, p. 12.



Patrick Arpino*

est président de la division Chimie analytique.

* ENSCP, Laboratoire d'électrochimie et de chimie analytique, UMR 7575, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05.
E-mail : p.arpino@sfc.fr

FORUM LABO 2002 hall Curie : STAND D13

Alpha M.O.S, qualité et productivité en R & D et QC/QA Nez et Langue Électroniques Passeurs d'échantillons LC et GC

Les nez et langues électroniques constituent une alternative séduisante aux méthodes traditionnelles de contrôle qualité et de recherche & développement. Ils donnent une mesure « organoleptique » plus objective que celle d'un panel humain et apportent une meilleure répétabilité et suivi dans le contrôle qualité.

Applications

- pharmaceutiques
- cosmétiques
- agro-alimentaires
- pétrochimiques
- masquage de l'amertume dans le développement de formulations
- stabilité et de vieillissement des arômes
- détermination de la teneur en arômes dans les médicaments

Avantages

- Objectivité et rapidité des mesures d'odeurs/goûts et de composés organiques volatils
- Fréquence d'échantillonnage élevée
- Injection en flux continu
- Compatibilité avec les analyses chimiques
- Adaptation aux recherches cliniques et pharmaco-cinétiques

Quelques clients

Bristol-Myers Squib, Danone, L'Oréal, Unilever, Nestlé, McCormick, USDA, Morinaga Milk, SGS Cervac...

Site Internet: www.alpha-mos.com

20 avenue Didier Daurat – 31400 Toulouse

Tél. : 05-62-47-53-80

