



HAL
open science

Conformation et dynamique de biomolécules en phase gazeuse

Thibault Tabarin

► **To cite this version:**

Thibault Tabarin. Conformation et dynamique de biomolécules en phase gazeuse. Physique Atomique [physics.atom-ph]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00198749

HAL Id: tel-00198749

<https://theses.hal.science/tel-00198749v1>

Submitted on 17 Dec 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le

25 septembre 2007

par

Thibault TABARIN

Dynamique et conformation de biomolécules en phase gazeuse

Directeur de thèse : Philippe Dugourd

JURY : M. Rodolphe Antoine, examinateur
M. Philippe Dugourd, directeur de thèse
M. Christian Felix, rapporteur
M. Philippe Maître, rapporteur
M^{me}. Dimitra Markovitsi, examinateur
M. Jean Claude Plenet, Président
M. Guillaume Van der Rest, examinateur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Électrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur G. CLERC

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

À Nico,

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire de spectrométrie ionique et moléculaire (LASIM) à Lyon dans l'équipe « dipôle électrique, biomolécules et agrégats », sous la direction de Philippe Dugourd.

Je tiens à le remercier sincèrement pour la confiance qu'il m'a témoignée en me permettant de réaliser cette thèse au sein de son groupe. Je le remercie aussi pour m'avoir guidé et initié dans cette démarche scientifique.

Je remercie chaleureusement Rodolphe Antoine pour sa présence, son soutien et sa passion scientifique, sans qui l'aboutissement de ce travail n'aurait pas été possible. Ce fut un vrai plaisir de travailler ensemble.

Je tiens à remercier Christian Felix et Philippe Maître pour avoir accepté de juger en tant que rapporteur ce travail de thèse, ainsi que Dimitra Markovitsi, Guillaume van der Rest et Jean Claude Plenet pour avoir participé au jury de thèse et pour leurs remarques scientifiques de qualité et les ouvertures apportées à ce manuscrit.

Au cours de ce travail, j'ai eu l'occasion d'interagir avec de nombreux collaborateurs, je les remercie tous pour leurs disponibilités, leurs remarques et leurs conseils. De manière un peu plus particulière je remercie Valérie Gabelica pour ces infernales journées expérimentales qui furent très enrichissantes.

Je remercie mon équipe et l'ensemble du personnel du laboratoire pour leurs aides indispensables et leurs bonnes humeurs. Parmi ces rencontres certaines se sont transformées en amitiés notamment avec Sad, Laure, Xavier, Francisco et Bruno et j'espère pour longtemps.

Ces trois années passées dans cette merveilleuse ville de Lyon ont été parsemées de nombreuses rencontres incongrues, passagères, richesses et enivrantes. Merci à tous ceux que j'ai rencontré et qui ont fait de cette aventure ce qu'elle a été. Merci à Thibaut pour notre amitié qui fut notre vrai havre de paix lors de moments difficiles et le sera, je l'espère, pour longtemps. Une pensée pour Camilla, Paule, Chrysteले et Sophie avec qui j'ai partagé des

moments pleins d'émotions. Merci à Jérôme, Nathalie, Rémy et tous les autres grimpeurs pour ces ballades verticales qui m'ont bien aéré et ouvert l'esprit. Merci à Meg pour cette rencontre courte mais inoubliable. Pour finir une pensée pour mes amis de toujours, Seb, Mathilde, Aude, Marie, Rachel et Caro. Et bien sûr les « débilés », Guiz, Fab, Toniox, Ques, Morgan, Kuntz, et Tristan, merci les gars pour les PTs, les férias et autres grandes réunions spirituelles. Merci à son Jazz pour m'avoir apporté ta sagesse dans la science occulte de « l'aurograffe ».

Pour finir, je tiens à remercier mes parents et ma famille pour leurs soutiens et leurs encouragements.

Table des matières

INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE I	
COUPLAGE ENTRE SPECTROMETRIE DE MASSE ET SPECTROSCOPIE	
LASER	19
1.1 Spectrométrie de masse.....	20
1.1.1 Electrospray	21
1.1.2 Les octapôles et le guidage des ions	28
1.1.3 Fonctionnement d'un piège.....	29
1.2 Lasers et couplage.....	40
1.2.1 Couplage : Piège-Laser	40
1.2.2 Les lasers.....	43
1.3 Méthodes et mesures.....	47
1.3.1 Fonctionnement d'une mesure et spectres	47
1.3.2 Spectre UV-Vis.....	51
CHAPITRE II	
PHOTODISSOCIATION D'ACIDES AMINÉES ET DE POLYPEPTIDES.....	55
2.1 Protéines et fragmentations.....	56
2.1.1 Les protéines et acides aminés.....	56
2.1.2 Conformation des protéines	58
2.1.3 Propriété acido-basique.....	59
2.1.4 Propriété optique.....	60
2.1.5 La fragmentations des peptides.....	61
2.2 Photodissociaion du Tryptophane protoné.....	67
2.2.1 L'expérience	67
2.2.2 Résultats expérimentaux	67
2.2.3 Discussion et interprétation.....	71
2.3 Peptides	76

2.3.1	Leucine enképhaline	76
2.3.2	Expérience MS ⁿ	80
2.3.3	Gramicidine A et phosphopeptides	83
2.3.4	Conclusion	90
2.4	Comparaison de différents type d'excitation : Pentapeptide du GDR	91
2.4.1	Expériences et peptide	91
2.4.2	Les résultats	92
2.4.3	Modèle	96
2.4.4	Simulation et interprétation.....	97
2.5	Conclusion	100

CHAPITRE III

SYSTEMES COMPLEXES HYBRIDES : AGRÉGAT

MÉTALLIQUE-BIOMOLÉCULE	107	
3.1	Introduction.....	108
3.2	Production de complexe biomolécule-métal.....	110
3.2.1	Source electrospray et complexe de tryptophane argent.....	110
3.2.2	Différents types de complexes produits.....	112
3.2.3	Mécanisme proposé pour la formation des complexes	114
3.2.4	Etude des complexes par CID et MS ⁿ	116
3.3	Du tryptophane protoné au tryptophane argent : propriétés optiques	118
3.3.1	Méthodes expérimentales et théoriques	118
3.3.2	Tryptophane protoné.....	119
3.3.3	Tryptophane argent.....	122
3.4	Complexes tryptophane agrégat d'argent : effet de taille et de structure.....	127
3.4.1	Structures CS et ZW	127
3.4.2	Spectres calculés pour les complexe tryptophane-agrégat d'argent	128
3.5	Photodissociation et voies de fragmentation de [Trp•Ag _n] ⁺	135
3.5.1	Section efficace de photodissociation et taille	136
3.5.2	Spectre photodissociation et structure.....	138
3.5.3	Canaux de fragmentation spécifique.....	144

CHAPITRE IV

PHOTO-DÉTACHEMENT D'ÉLECTRON SUR DES POLYANIONS

BIOMOLÉCULAIRE PIÉGES	155	
4.1	ADN.....	157
4.1.1	Présentation de l'ADN.....	158
4.1.2	ADN et propriétés physico-chimiques.....	159

4.2	Photodétachement d'ADN	160
4.2.1	Photodétachement dans des simples brins	160
4.2.2	Mécanisme de photodétachement	166
4.2.3	Photodétachement de double brin d'ADN	170
4.3	Dissociation par photodétachement d'électron	173
4.3.1	CID des brins ADN radicalaire	173
4.3.2	ADN et ligands non covalents	177
4.3.3	ADN et ligands covalents	183
4.4	EPD sur les peptides	186
4.4.1	Spectre de photodétachement	186
	CONCLUSION.....	199
	ANNEXE.....	201

INTRODUCTION

Parmi les molécules qui constituent les organismes vivants et participent à leur fonctionnement, on trouve deux grandes familles : l'ADN et les protéines. L'ADN a pour rôle de porter l'information séquentielle et structurelle. Cette information permet de construire les machines organiques que sont les protéines. Les protéines, elles, ont des fonctions biologiques spécifiques et extrêmement variées... Par exemple, l'hémoglobine transporte l'oxygène, la myosine permet au muscle de se contracter. La fonction d'une protéine dépend de sa séquence et de son organisation spatiale. L'importance du repliement sur la fonction des protéines a été soulignée par Pauling^[1] dès le milieu du 20^e siècle.

Auparavant, la seule méthode qui permettait d'obtenir une représentation 3D précise des molécules biologiques était la cristallographie par rayon X. C'est d'ailleurs par cette méthode que Watson et Crick ont pu déterminer la structure en hélice de l'ADN.^[2] L'obtention de cristaux de protéine bien ordonnés reste parfois une limitation à cette technique malgré les progrès réalisés dans ce domaine. Depuis quelques années, grâce à la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), il est désormais possible de déterminer la structure tridimensionnelle en solution de protéines, en particulier celles de moins de 200 acides aminés.^[3] Dans ces méthodes en phases condensées, les protéines présentent de multiples interactions. Dans les cristaux, les protéines sont en forte interaction les unes avec les autres. En solution avec le solvant et d'autres ions ou molécules.

Parallèlement, de nombreux efforts ont été réalisés sur le plan théorique afin de proposer des modèles et des méthodes de simulation qui permettent d'accéder aux propriétés structurelles et dynamiques des protéines.^[4] La prise en compte des interactions avec d'autres molécules reste un challenge du point de vue théorique, compte tenu de la complexité des systèmes étudiés et du grand nombre d'interactions impliquées.

Dans ce contexte, l'approche par la « phase gazeuse » semble être une alternative intéressante. En effet, par cette méthode, on s'affranchit totalement des interactions intermoléculaires. Ceci permet notamment d'étudier les propriétés intrinsèques des biomolécules et d'offrir des données expérimentales qui peuvent être utilisées pour établir des modélisations théoriques.

La spectrométrie de masse est un des principaux outils permettant l'étude de systèmes de grosse taille, tels que les protéines en phase gazeuse. Née au milieu du 20^e siècle, elle fut tout d'abord utilisée pour l'analyse de petites molécules organiques avec, par exemple, l'utilisation des quadripôles et des pièges ioniques.^[5] A cette époque, aucune technique ne permettait la mise en phase gazeuse de grosses molécules aussi fragiles que les protéines. Lorsque la source electrospray fut mise au point par J. B. Fenn^[6] dans les années 80, la spectrométrie de masse prit un nouvel essor pour l'analyse des molécules biologiques, ou des brins d'ADN et en particulier celle des protéines. Suite à la cartographie du génome, l'étude de l'expression des gènes à travers la production d'une multitude de protéines (protéomique) a pu être appréhendée par la spectrométrie de masse.^[7]

Dans l'étude de biomolécules par spectrométrie de masse on distingue deux principaux axes d'utilisation. Tous d'abord, la robustesse et les avancées technologiques dans ce domaine permettent une utilisation routinière pour l'analyse, l'identification et la quantification de protéines, de complexes protéine-médicament, il s'agit d'applications analytiques. D'autre part, couplé à une technique physico-chimique de caractérisation comme la mobilité ionique, l'échange hydrogène-deutérium ou la spectroscopie laser, le spectromètre de masse devient un outil extrêmement puissant pour des études à la fois fondamentales et appliquées. Ces techniques permettent l'étude de propriétés chimico-physiques d'ions moléculaires en phase gazeuse tel que, l'étude de l'énergie de liaison dans des complexes, la détermination de géométries par la mise en évidence de schémas de fragmentation spécifiques...

Il existe différents types d'instruments largement utilisés pour l'analyse en masse de molécules chargée, notamment les quadripôles (QMS^{*}) et pièges ioniques quadripolaires (QIT^{*}), les temps de vol (TOF^{*}), les secteurs électrostatiques et les spectromètres de masse à transformer de Fourier (FTI-CR^{*}). Chacun de ces instruments possède avantages et inconvénients au niveau de la robustesse, la précision, la résolution en masse et les gammes de masses accessibles. De plus, pour bénéficier des performances spécifiques à chaque

* **QMS** : *Quadrupole Mass Spectrometer*, **QIT** : *Quadripole Ion Trap*, **TOF** : *Time Of Flight*, **FTI-CR** : *Fourrier Trap Ion – Cyclotron Ressonance*

instrument, de plus en plus d'applications hybrides utilisant deux techniques ou plus sont proposées : Q-TOF, TOF-TOF, QIT-FTI-CR.

Au-delà de la mesure de masse, la principale méthode d'analyse utilisée en spectrométrie de masse est la fragmentation. Les techniques d'activation utilisées pour fragmenter les protéines sont nombreuses et ont chacune leur spécificité. Deux types de processus sont distingués : l'activation par chauffage et l'activation électronique. La fragmentation induite par collision sur un gaz neutre est la technique la plus utilisée pour fragmenter efficacement par chauffage.^[8] Cette technique est proposée en routine sur les spectromètres de masse commerciaux. De nombreuses autres techniques sont apparues comme le chauffage avec un laser infrarouge (IRMPD^{*}) ou par rayonnement du corps noir (BIRD^{*}).

La capture électronique (ECD^{*}), qui fait intervenir des états électroniques excités de l'ion et la formation d'une espèce radicalaire. L'ECD, avec d'autres techniques similaires comme la dissociation par transfert d'électron (ETD^{*}) et la dissociation par détachement d'électron (EDD^{*}), contribuent largement à l'analyse des protéines et apportent de nouvelles informations grâce à des schémas de fragmentation spécifiques.^[9] Un processus d'excitation électronique différent est obtenu par excitation photonique dans les domaines UV et visible. C'est ce dernier processus qui va faire l'objet de cette thèse.

Les propriétés optiques des biomolécules sont bien connues et l'on retrouve de multiples applications dans l'analyse des protéines en phase condensée et plus particulièrement en phase liquide. L'absorption des protéines est peu spécifique à l'environnement. La fluorescence de ces chromophores est bien plus sensible à l'environnement mais reste une sonde locale difficile à relier à une information globale de la protéine. Le dichroïsme circulaire et la dispersion optique rotatoire sont probablement les méthodes optiques les plus efficaces pour déterminer les conformations des protéines en solution.^[10]

La spectrométrie de masse couplée à la spectroscopie laser est depuis longtemps utilisée en physique moléculaire notamment pour obtenir des spectres rotationnels, vibrationnels ou électroniques de petites molécules en phase gazeuse. Les premières spectres d'excitation électronique sur des biomolécules en phase gazeuse ont été obtenues par Levy^[11] en 1985 avec l'observation de bandes vibrationnelles pour le tryptophane et des dipeptides. Cependant, ces études ont longtemps été limitées à l'étude de petites biomolécules (acide

* **IRMPD** : *Infrared Resonance Multi Photon Dissociation*. **BIRD** : *Blackbody Irradiation Resonance Dissociation*. **ECD** : *Electron Capture Dissociation*. **ETD** : *Electron Transfer Dissociation*. **EDD** : *Electron Detachment Dissociation*

aminé, des brins d'ADN, petits peptides). En parallèle, des pionniers, comme Bowers, McIver et Russel, se sont intéressés à des systèmes de plus grandes tailles en injectant dans des spectromètres de type FT-ICR, des faisceaux lasers dans l'ultra ultra violet à 157 ou 193 nm.^[12-16] Les photons associés à ces longueurs sont très énergétiques et la fragmentation obtenue est importante mais peu spécifique. Déjà, à cette époque, l'idée d'obtenir des informations sur les structures par des méthodes laser était présente.^[16]

Dans le domaine de l'infrarouge, les avancées réalisées ont ouvert de nouvelles applications vers l'identification de la conformation de systèmes biologiques. D'importants développements dans le domaine des sources infrarouges à large spectre tel que CLIO (Centre Laser Infrarouge d'Orsay) et FELIX (Free Electron Laser for Infrarouge eXperiments) ont permis de sonder la structure secondaire de peptides, en utilisant soit la dissociation induite par de multi-photons infrarouges résonants dans des pièges^[17-19] ou bien en couplant des photons infrarouges résonants à des photons UV sur un jet moléculaire neutre.^[20]

L'absorption d'un photon UV (ou visible par une molécule) permet de l'exciter de manière vibrationnelle ou de manière électronique. L'excitation UV-Vis des molécules biologiques, devient résonnante lorsqu'on se situe dans le domaine UV de l'absorption des cycles aromatiques entre 220 nm et 400 nm. Des transitions électroniques particulières apparaissent. En dessous de 200 nm ce sont surtout les électrons dans les liaisons peptides qui sont impliqués. Au-dessus de 200 nm, ce sont les électrons π délocalisés des cycles aromatiques qui sont concernés.

Parmi les différents modes de désexcitation qui suivent, on peut observer la fluorescence, le détachement d'électron et la fragmentation. L'organisation spatiale des molécules peut modifier les spectres d'absorption optique des molécules et les mécanismes de relaxation qui suivent. L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'apport de la spectroscopie optique UV visible pour la caractérisation structurale et électronique de systèmes à grand nombre de degrés de liberté en phase gazeuse.

C'est dans ce contexte que nous avons développé un montage expérimental couplant un spectromètre de masse de type piège ionique quadripolaire à la spectroscopie UV dans le but d'étudier la conformation et les propriétés électroniques de molécules biologiques.

Cette thèse rapporte les travaux qui ont été réalisés sur ce montage. Nous avons montré la possibilité de faire des spectres optiques en phase gazeuse sur des biomolécules. Les systèmes étudiés vont du simple acide aminé à des peptides et des complexes agrégats métalliques-acide aminé à des brins d'ADN.

Dans un premier temps, je présenterai le spectromètre de masse commercial que nous avons modifié afin d'injecter en son centre un laser. Le spectromètre de masse nous permet de produire, d'isoler, de fragmenter et de détecter des espèces moléculaires chargées en phase gazeuse. Un laser à oscillateur paramétrique optique fournit un faisceau laser accordable dans l'UV et le visible. Ce spectromètre de masse fut le premier piège ionique quadripolaire acquis par le laboratoire ce qui nécessita un apprentissage. Je présenterai donc en détail son fonctionnement. Le solide savoir-faire technique en construction d'expérience fut un point particulièrement déterminant dans l'aboutissement de l'expérience.

Dans un second temps, je présenterai à travers trois chapitres, l'ensemble des expériences réalisées sur ce montage.

Chapitre II. Ce chapitre décrit des expériences de photodissociation réalisées sur le tryptophane et de petits peptides. On verra notamment que la production d'ions radicalaires par photodissociation peut avoir des applications en protéomique. Une dernière étude, réalisée en collaboration avec plusieurs laboratoires sur un peptide modèle, établira un lien entre fragmentation et conformation initiale de l'ion.

Chapitre III. L'une des activités du LASIM et de l'équipe est l'étude des agrégats métalliques. Notre compétence dans ce domaine nous a permis de réaliser des expériences de spectroscopie UV en phase gazeuse sur des complexes hybrides agrégats d'argent-tryptophane. Les complexes sont produits en phase gazeuse puis des spectres optiques ont été obtenus en balayant la longueur d'onde du laser pour différentes tailles de complexes. La comparaison des résultats expérimentaux avec les calculs théoriques réalisés par le groupe de chimie quantique de Vlasta Koutecky à Berlin permet de relier la structure aux spectres optiques ou aux schémas de fragmentation.

Chapitre IV. Dans ce dernier chapitre, je présenterai des résultats obtenus après irradiation de polyanions (brin d'ADN et peptides). On verra que le mécanisme principal de désexcitation après irradiation UV est la perte d'un électron et qu'il fait intervenir un passage par effet tunnel à travers une barrière de potentiel. La fragmentation par collision très efficace des radicaux produits par le photodétachement sera présentée comme une perspective pour l'analyse et le séquençage de brins d'ADN.

Un dernier aspect du travail réalisé pendant cette thèse sera présenté sous forme d'un article en cours de soumission. Il présente une expérience de pompe sonde réalisée sur le piège avec un laser femtoseconde. Ce travail réalisé en collaboration avec V. Boutou, L. Guyon, B. Thuillier et J-P. Wolf du LASIM est le premier pas vers des études dynamiques dans notre piège.

Bibliographie

- [1] L. Pauling, Modern structural chemistry, *Nobel lecture in chemistry* **1954**, december.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, Molecular structure of nucleic acids - A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* **1953**, 171, 737.
- [3] K. Wüthrich, NMR studies of structure and function of biological macromolecules, *Nobel lecture in chemistry* **2002**, december.
- [4] K. A. Dill, Polymer principles and protein folding, *Protein Science* **1999**, 8, 1166.
- [5] R. E. March, R. J. Hughes, *Quadrupole Storage Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York, **1989**.
- [6] J. B. Fenn, Electrospray wings for molecular elephant, *Nobel lecture in chemistry* **2002**, december.
- [7] M. Tyers, M. Mann, From genomics to proteomics, *Nature* **2003**, 422, 193.
- [8] J. M. Wells, S. A. McLuckey, in *Biological Mass Spectrometry*, Vol. 402, **2005**, pp. 148.
- [9] R. Zubarev, Protein primary structure using orthogonal fragmentation techniques in Fourier transform mass spectrometry, *Expert Review of Proteomics* **2006**, 3, 251.
- [10] T. E. Creighton, *Proteins Structure and Molecular Properties*, Freeman, New York, **1993**.
- [11] T. R. Rizzo, Y. D. Park, D. H. Levy, A Molecular-Beam of Tryptophan, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, 107, 277.
- [12] E. R. Williams, J. J. P. Furlong, F. W. McLafferty, Efficiency of Collisionally-Activated Dissociation and 193-Nm Photodissociation of Peptide Ions in Fourier-Transform Mass-Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1990**, 1, 288.

- [13] R. E. Tecklenburg, M. N. Miller, D. H. Russell, Laser Ion-Beam Photodissociation Studies of Model Amino-Acids and Peptides, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 1161.
- [14] C. B. Lebrilla, D. T. S. Wang, T. J. Mizoguchi, R. T. McIver, Comparison of the Fragmentation Produced by Fast Atom Bombardment and Photodissociation of Peptides, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 8593.
- [15] M. E. Gimonkinsel, G. R. Kinsel, R. D. Edmondson, D. H. Russell, Photodissociation of High-Molecular-Weight Peptides and Proteins in a 2-Stage Linear Time-of-Flight Mass-Spectrometer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1995**, *6*, 578.
- [16] W. D. Bowers, S. S. Delbert, R. T. McIver, Consecutive Laser-Induced Photodissociation as a Probe of Ion Structure, *Analytical Chemistry* **1986**, *58*, 969.
- [17] B. Lucas, G. Gregoire, J. Lemaire, P. Maitre, J. M. Ortega, A. Rupenyan, B. Reimann, J. P. Schermann, C. Desfrancois, Investigation of the protonation site in the dialanine peptide by infrared multiphoton dissociation spectroscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 2659.
- [18] A. Kamariotis, O. V. Boyarkin, S. R. Mercier, R. D. Beck, M. F. Bush, E. R. Williams, T. R. Rizzo, Infrared spectroscopy of hydrated amino acids in the gas phase: Protonated and lithiated valine, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 905.
- [19] N. C. Polfer, B. Paizs, L. C. Snoek, I. Compagnon, S. Suhai, G. Meijer, G. von Helden, J. Oomens, Infrared fingerprint spectroscopy and theoretical studies of potassium ion tagged amino acids and peptides in the gas phase, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 8571.
- [20] W. Chin, F. PiuZZi, I. Dimicoli, M. Mons, Probing the competition between secondary structures and local preferences in gas phase isolated peptide backbones., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 1033.

CHAPITRE I

COUPLAGE ENTRE SPECTROMETRIE DE MASSE ET SPECTROSCOPIE LASER

1.1	Spectrométrie de masse.....	20
1.1.1	Electrospray	21
1.1.2	Les octapôles et le guidage des ions	28
1.1.3	Fonctionnement d'un piège.....	29
1.2	Lasers et couplage.....	40
1.2.1	Couplage : Piège-Laser	40
1.2.2	Les lasers.....	43
1.3	Méthodes et mesures.....	47
1.3.1	Fonctionnement d'une mesure et spectres	47
1.3.2	Spectre UV-Vis.....	51

CHAPITRE I

COUPLAGE ENTRE SPECTROMETRIE DE MASSE ET SPECTROSCOPIE LASER

Dans ce chapitre, nous allons décrire le montage expérimental développé au LASIM. Ce montage couple la spectrométrie de masse et la spectroscopie laser UV Visible. La partie spectrométrie de masse permet mettre en phase gazeuse les ions, de les isoler, et de les détecter par la mesure de leur masse. La partie spectroscopie permet l'activation énergétique des ions. Afin de bien comprendre le rôle de chacune des parties, nous nous attarderons sur leurs principes et les aspects physiques de leurs fonctionnements. Le mode opératoire impliquant ce couplage sera ensuite décrit et illustré par des spectres de masse.

1.1 Spectrométrie de masse

Le spectromètre que nous utilisons est un outil commercial, c'est un spectromètre de type piège quadripolaire ionique^[1] LCQ^{Duo} (avec l'option MSⁿ, ThermoElectron, San Jose, CA, USA). Sur la figure 1.1, on voit que l'appareil est composé d'une source electrospray permettant de mettre en phase gazeuse et d'ioniser les molécules à étudier. Un système d'optique ionique, composé de lentilles électrostatiques et d'octapôles, guide les ions jusqu'au piège quadripolaire ionique. Dans le piège, les ions sont manipulés, stockés et enfin détectés grâce à la dynode de conversion et au multiplicateur d'électrons.

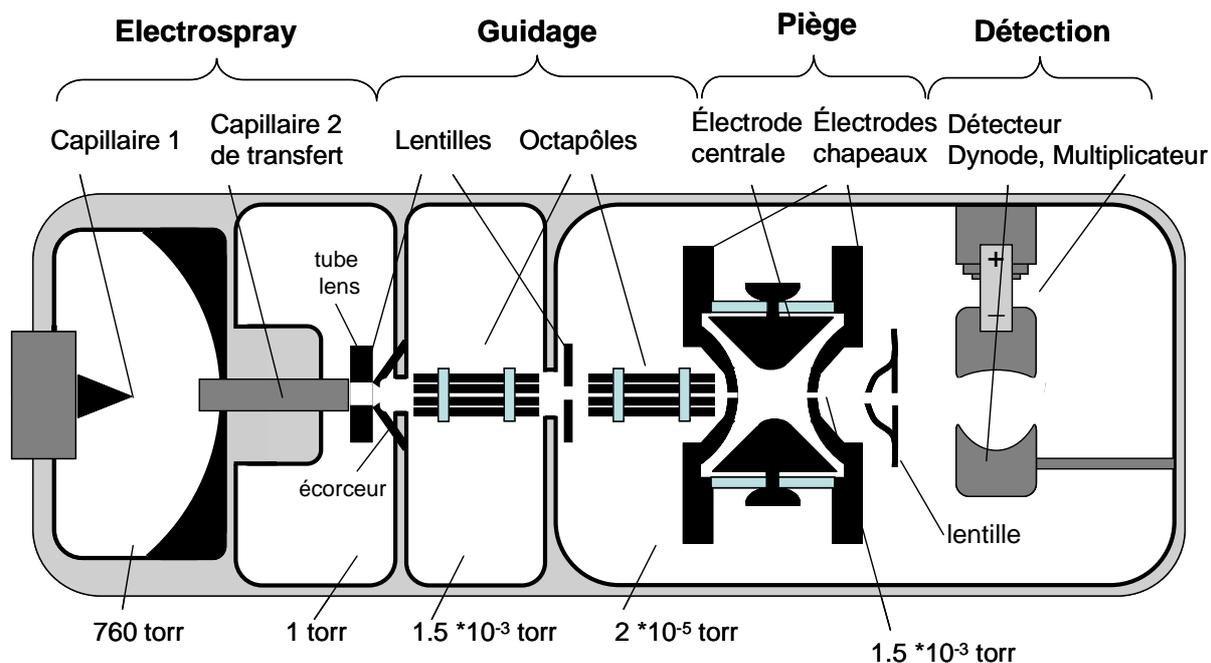


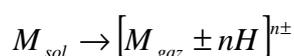
Figure 1.1 - Schéma du piège LCQ^{Duo} , composé d'une source electrospray, d'un système de guidage d'ions, d'un piège quadripolaire ionique et d'un détecteur. Il y a 4 chambres à différentes pressions.

1.1.1 Electrospray

La spectrométrie de masse permet d'étudier par la mesure du rapport masse sur charge (m/z), des molécules organiques et complexes et notamment des molécules biologiques ou d'intérêts biologiques telle que les médicaments, les hormones, les peptides, les protéines, les brins d'ADN, des complexes non covalent, etc.... Pour cela il est nécessaire de les ioniser et de les mettre en phase gazeuse. L'utilisation de techniques d'ionisation dites « douces » est essentielle pour faire passer ces molécules en phase gazeuse sans les fragmenter. Pour nous, il est également important de conserver les liaisons non covalentes telle que les liaisons « hydrogène » responsables de l'organisation spatiale ou d'appariement de ces molécules.^[2]

Depuis les années 80, deux techniques d'ionisation ont été particulièrement développées, le MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*) et l'ESI (*Electrospray Ionisation*). Contrairement à d'autres techniques comme le FAB (*Fast Atom Bombardement*), le EI (*Electron Impact*) ou le FIB (*Fast Ion Bombardement*), où l'énergie est directement absorbée par l'analyte, l'énergie est transmise à travers un partenaire d'ionisation, une matrice pour le MALDI^[3] et une gouttelette de solvant pour l'ESI.^[4]

Ces techniques sont des méthodes d'ionisation dites « douces ». Dans la technique de désorption et d'ionisation par laser assistée par matrice (MALDI), un laser d'impulsion courte (généralement laser nanoseconde) désorbe une matrice dans laquelle la molécule à étudier est prisonnière. La molécule est libérée en phase gazeuse sous forme ionisée grâce à un transfert de charge assisté par la matrice. L'electrospray est probablement la technique la plus douce pour mettre en phase gazeuse et ioniser des molécules. C'est une source à ionisation à pression atmosphérique, elle produit des ions en phase gazeuse à une pression de l'ordre du torr, à partir d'une solution à pression atmosphérique avec une faible fragmentation. L'electrospray appliqué à une molécule M peut être résumé par la réaction suivante :



La source d'ionisation par electrospray (ESI) a été proposée par Dole^[5] et développée par Fenn.^[4] John Fenn obtient en 2002 le prix Nobel de chimie pour ces travaux sur ESI. Il le partagea entre autres avec Koichi Tanaka pour le MALDI.

1.1.1.1 Principe d'une source electrospray

Le principe peut être décomposé en 3 étapes. (i) la formation du cône de Taylor et du spray de gouttelettes chargées. (ii) la désolvatation et la réduction des gouttelettes chargées. (iii) la formation finale d'ions en phase gazeuse à partir de petites gouttelettes. Nous étudierons ces mécanismes pour des ions positifs. En se référant à la figure 1.2, on voit que la source electrospray (thermo finnigan) est composée d'un fin capillaire 1 (en silice fondue) d'un diamètre interne de 100 μm dans lequel on injecte un flux constant de solution contenant les molécules à mettre en phase gazeuse, avec une seringue à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les solutions utilisées ont typiquement une concentration de quelques dizaines à quelques centaines de $\mu\text{mol}/\text{L}$ (μM).

L'extrémité du capillaire 1 est métallisée, ce qui permet d'appliquer un potentiel U_{C1} . Face au capillaire 1, distant de 1 à 2 cm, on trouve le capillaire 2 d'un diamètre externe de 0.5 cm et d'un diamètre interne de 300 μm . Sa face d'entrée métallisée est à un potentiel U_{C2} , ce capillaire est la contre électrode. Sous l'effet des lignes de champ générées entre les deux capillaires, la solution sortant du capillaire 1 se transforme en spray de gouttelettes chargées qui migrent vers le capillaire 2. Un flux constant d'azote est injecté de manière homogène autour du capillaire 1. C'est le gaz porteur qui va favoriser l'évaporation du solvant formant les gouttelettes.

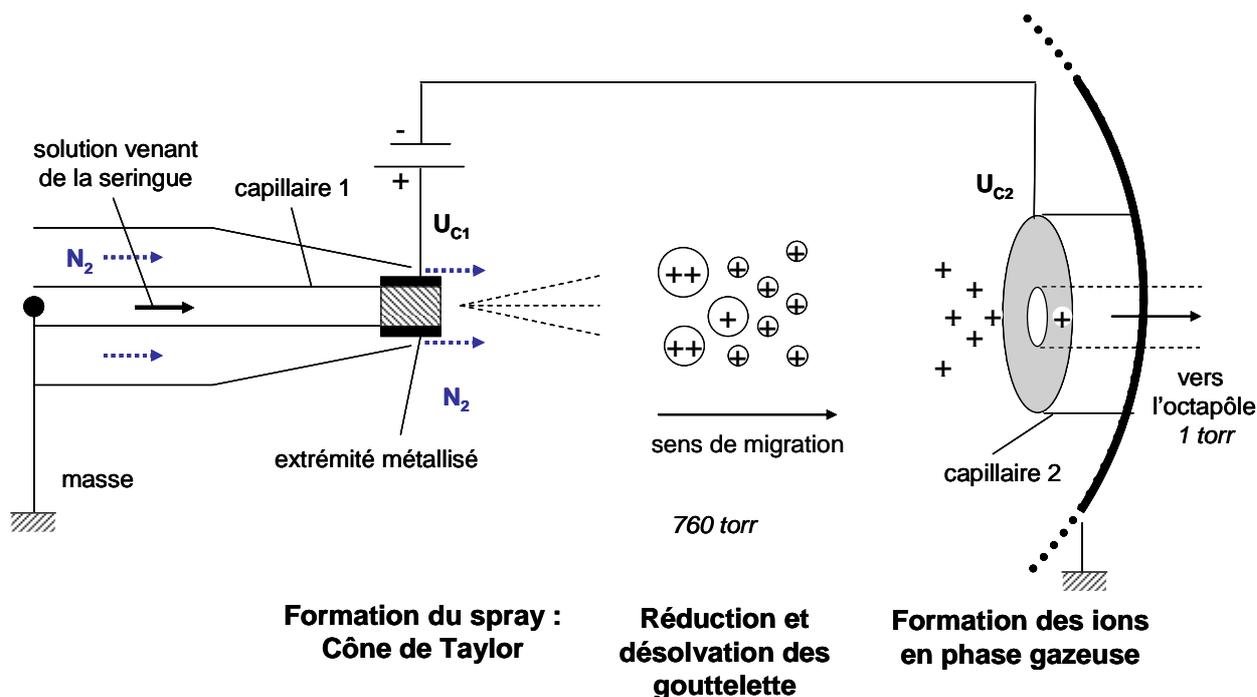


Figure 1.2 - Schéma de la source electrospray du spectromètre de masse LCQ^{Duo} Thermofinnigan.

Nous avons utilisé dans certains cas une deuxième configuration de la source electrospray, appelé « source off axis ». Dans ce cas, toute la partie gauche de la source correspondant au capillaire 1 est inclinée d'un angle d'environ 45°. Cette configuration permet de diminuer le bruit chimique en ne permettant qu'aux espèces chargées de migrer et de passer dans le capillaire 2.

1.1.1.2 Formation du spray : cône de Taylor

La formation du spray de gouttelettes résulte du cône de Taylor. Comme on le voit sur la figure 1.3, le capillaire 1 est porté à un haut potentiel de quelques kV et la contre-électrode, formée par le capillaire 2, est portée à un faible potentiel de quelques volts. Le capillaire 1 est de petite taille (100µm) devant la contre-électrode (0,5 cm), un fort champ électrique est formé au voisinage du capillaire 1. Le champ peut être approximé par la relation suivante^[2, 6] :

$$E_c = \frac{2V_c}{r_c \ln(4d/r_c)} \quad 1-1$$

où V_c est le potentiel appliqué, r_c le rayon du capillaire 1, et d la distance entre le capillaire 1 et la contre-électrode. Par exemple, pour $V_c = 5$ kV, $r_c = 10^{-4}$ m et $d = 0,02$ m, on obtient $E_c = 15 \cdot 10^6$ V/m. Au voisinage de l'extrémité du capillaire 1, sous l'action de ce fort champ, le fluide polaire (eau ou méthanol) va avoir deux comportements importants.

i) A l'interface entre la partie métallisée du capillaire 1 et le fluide, une réaction d'oxydation va se produire, favorisant l'échange de charge et la formation d'ions.^[2] Cette réaction peut localement modifier le pH de la solution.

ii) Le champ électrique va pénétrer dans le fluide et les charges présentes vont se déplacer afin d'équilibrer le champ (cf. figure 1.3 a)). Les charges positives vont se déplacer vers l'extérieur du capillaire 1, dans le ménisque formé naturellement et les charges négatives vont se déplacer vers l'anode. Sous l'effet du champ et de la forte densité de charges positives, le ménisque du fluide va être déformé. Pour optimiser sa surface, le fluide va prendre la forme du cône de Taylor^[7, 8], comme on le voit sur la figure 1.3 a). Le cône de Taylor va se déformer en pointe jusqu'à la rupture de l'équilibre entre les tensions de surface du fluide et les forces dues au champ. De cette manière, de fines gouttelettes chargées de quelques μm de diamètre vont être libérées. Un traitement approfondi du champ permet de déduire le potentiel V_{on} nécessaire à l'instabilité du cône de Taylor^[2, 9] :

$$V_{on} \approx \left(\frac{r_c \gamma \cos \theta}{2\epsilon_0} \right)^{1/2} \ln(4d / r_c) \quad 1-2$$

où γ est la tension superficielle du fluide, ϵ_0 la permittivité, r_c le rayon du capillaire et θ le demi angle du cône de Taylor. En prenant $\epsilon_0 = 8,8 \cdot 10^{-12} \text{ J}^{-1} \text{ C}^2 \text{ m}^{-1}$ et $\theta = 49,3^\circ$, on obtient :

$$V_{on} \approx 2 \cdot 10^5 (r_c \gamma)^{1/2} \ln(4d / r_c) \quad 1-3$$

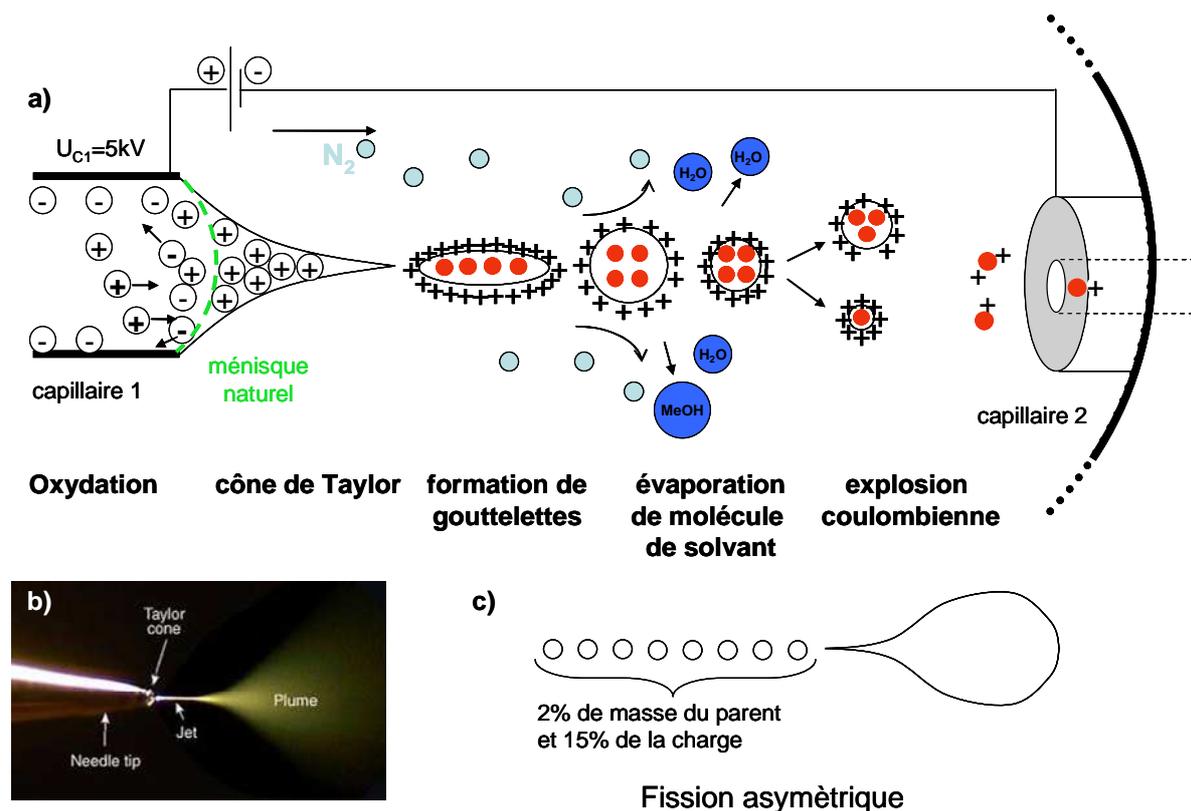


Figure 1.3 - a) Mécanisme de l'electrospray. Formation du cône de Taylor et libération des gouttelettes, réduction des gouttelettes, explosion coulombienne. b) Photographie du spray issue d'une pointe nanospray : le spray change de forme au niveau du cône pour se disperser en fines gouttelettes. c) Représentation de la fission asymétrique suite à l'explosion coulombienne.

On constate que l'efficacité du spray formé par le cône de Taylor dépend principalement de la taille du capillaire 1 et de la tension superficielle de surface du fluide. Plus le capillaire de rayon r_c sera petit, plus le potentiel nécessaire pour le spray sera faible. Il en va de même pour la tension de surface, d'où l'intérêt d'utiliser des solvants volatils comme le méthanol (faible tension superficielle).

Il y a un déplacement de particules chargées sous forme de gouttelettes, d'une électrode à une autre. L'electrospray est une cellule électrophorétique particulière^[2], en effet contrairement à une cellule électrophorétique classique (par exemple électrophorèse des protéines), les charges sont transportées par des gouttelettes hors solution de manière discontinue. Le courant I , le rayon R et la charge q des gouttelettes sont des paramètres importants, car ils définissent la qualité du spray, comme le nombre de particules mises en phase gazeuse. En se basant sur des résultats expérimentaux, De la Mora et Locertales^[2, 10] ont réussi à déterminer I , R et q :

$$I \approx f(\varepsilon/\varepsilon_0)(\gamma KV_f \varepsilon/\varepsilon_0)^{1/2} \quad 1-4$$

$$R \approx (V_f \varepsilon / K)^{1/3} \quad 1-5$$

$$q \approx 0.7[8\pi(\varepsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}] \quad 1-6$$

où, $f(\varepsilon/\varepsilon_0)$ = fonction tabulée par les auteurs, ε et ε_0 = permittivité du solvant et du vide, γ = tension de surface du solvant, K = conductivité de la solution, E = champ appliqué, V_f = vitesse du flux. On voit à travers ces trois grandeurs caractéristiques I , R et q , que la qualité du spray dépend des propriétés physiques du solvant telles que la tension de surface et la conductivité. Le choix du solvant sera alors déterminant. Le solvant optimal est souvent trouvé de manière empirique car il faut trouver le meilleur compromis entre un solvant volatil, et un solvant polaire dans lequel les molécules sont suffisamment solubles. Souvent on utilise un mélange de solvants peu volatils mais polaires qui solubilisent bien la solution comme l'eau puis on y ajoute un solvant très volatil comme le méthanol ou l'acétonitrile. Pour favoriser la formation de charge on acidifie la solution avec de l'acide acétique glacial. Dans la plus grande majorité des cas un mélange eau/méthanol à 50/50 (v/v) avec 3% d'acide acétique en volume a été utilisé lors de ce travail.

1.1.1.3 Réduction et explosion des gouttelettes

Une fois que les gouttelettes chargées sont formées, elles vont migrer vers la contre-électrode sous l'effet du champ électrique et par aspiration au voisinage du capillaire 2. Les charges présentes dans les gouttelettes vont se répartir sur la surface. Pendant ce déplacement, les gouttelettes de quelques μm de diamètre vont se désolvater au contact du gaz porteur (N_2) aussi appelé gaz séchant. L'évaporation de molécules de solvant entraîne une réduction du volume de la gouttelette à charge constante. La densité de charges va augmenter jusqu'à ce que les forces dues aux répulsions coulombiennes entre les charges deviennent trop grandes devant les tensions superficielles de surface. La gouttelette sera alors instable, la limite de Rayleigh sera atteinte. Elle est définie par^[2, 8] :

$$q_{ry} = 8\pi(\varepsilon_0 \gamma R^3)^{1/2} \quad 1-7$$

où les termes sont définis comme précédemment et q_{ry} est la charge à la limite de Rayleigh, cette limite est obtenue en égalisant la pression électrique en surface due aux charges surfaciques avec la pression de tension superficielle.

Lorsque la charge de la gouttelette atteint la valeur de la limite de Rayleigh, elle va subir des déformations multipolaires jusqu'à fission asymétrique, c'est l'explosion coulombienne. Cette fission produit une gouttelette principale possédant environ 85% de la charge parent avec environ 98% de la masse parent et quelques dizaines de gouttelettes secondaires qui se répartissent en tout environ 15% de la charge avec environ 2% de la masse (cf. figure 1.3 c)).^[11] La fission asymétrique est intéressante puisque les petites gouttelettes produites sont très proches de la limite de Rayleigh (2% de la masse et 15% de charge), le processus de fission va donc s'accélérer.^[2] Ce processus d'évaporation et d'explosion va s'itérer plusieurs fois jusqu'à la dernière étape, la production d'ions moléculaires désirés.

1.1.1.4 Obtention d'ions moléculaires, traversée du capillaire 2

La dernière étape du processus est la plus polémique. Il s'agit de libérer un ion moléculaire. Deux principaux modèles ont été proposés.

Le premier modèle, proposé par Dole^[5], est celui de la charge résiduelle. Le processus de réduction des gouttelettes va s'itérer jusqu'à obtenir des gouttelettes d'un rayon d'environ 1 nm contenant une seule molécule d'intérêt. Ensuite les molécules de solvant vont s'évaporer à l'aide du capillaire 2 qui est chauffé aux alentours de 250°C, et la molécule va conserver une ou plusieurs charges et former l'ion en phase gazeuse.

Le second modèle, proposé par Iribarne et Thomson^[12], est celui de l'évaporation de l'ion. Dans ce cas, le processus d'itération de réduction des gouttelettes ne va pas aussi loin. Arrivée à une taille d'environ 8 nm de rayon, il va y avoir compétition entre évaporation superficielle de solvant et émission directe d'une molécule chargée entraînant quelques molécules de solvant. L'espèce formée devient un ion entouré de quelques molécules de solvant qui vont s'évaporer dans le capillaire 2 chauffant.

Le capillaire 2 joue aussi un rôle d'interface entre la partie electrospray qui est à pression atmosphérique (760 torr) et l'étage suivant du spectromètre de masse qui est à une pression de 1 torr (figure 1.1). Le gradient de pression permet de guider (d'aspirer) les ions dans le capillaire 2.

Une lentille et un écorceur situés derrière le capillaire 2 permettent d'injecter les ions dans les octâpoles où ils pourront être guidés vers le piège quadripolaire ionique (cf. figure 1.1)

A titre indicatif, on trouvera en annexe I, un exemple de tensions utilisées pour la production du complexe tryptophane argent, et une étude sur l'efficacité des solutions pour produire en phase gazeuse par électrospray la leucine enképhaline protonée.

1.1.2 Les octapôles et le guidage des ions

Le couplage entre la source électrospray et le piège quadripolaire est un système de guide d'ions de type octapôle (« rf only ») avec un potentiel $V = \pm V_0 \cos(\Omega t)$. Deux principaux avantages des systèmes « rf only » sont à noter. D'une part, ils fournissent un transport efficace des ions dans une région de vide médiocre ($\approx 10^{-2}$ torr) avec une très faible perte d'ions et d'autre part ils sont peu discriminants en masse. C'est aussi un instrument facile d'utilisation (pas de réglage de lentilles électrostatiques) qui a la capacité d'injecter des ions de masses différentes à la même énergie.

Un système « rf only » est en fait un piège à 2 dimensions (X,Y). Les ions seront confinés dans le plan X,Y par un puit de potentiel effectif montré sur la figure 1.4 b), créé par les électrodes cylindriques sous forme de barres périodiquement disposées comme sur la figure 1.4 a). Les ions se propageront dans l'axe des barres de l'octapôle suivant l'axe z. Par des calculs de développement multipolaire du potentiel, on peut approximer le potentiel effectif U_{eff} auquel est soumis les ions dans l'octapôle par^[13] :

$$U_{eff} = \frac{e^2 V_0}{4m\omega^2 r_0^2} \left(\frac{r}{r_0} \right)^6 \quad 1-8$$

où V_0 est le potentiel appliqué au électrode, m la masse de l'ion, ω fréquence des oscillations du potentiel, r_0 le rayon de l'octopôle.

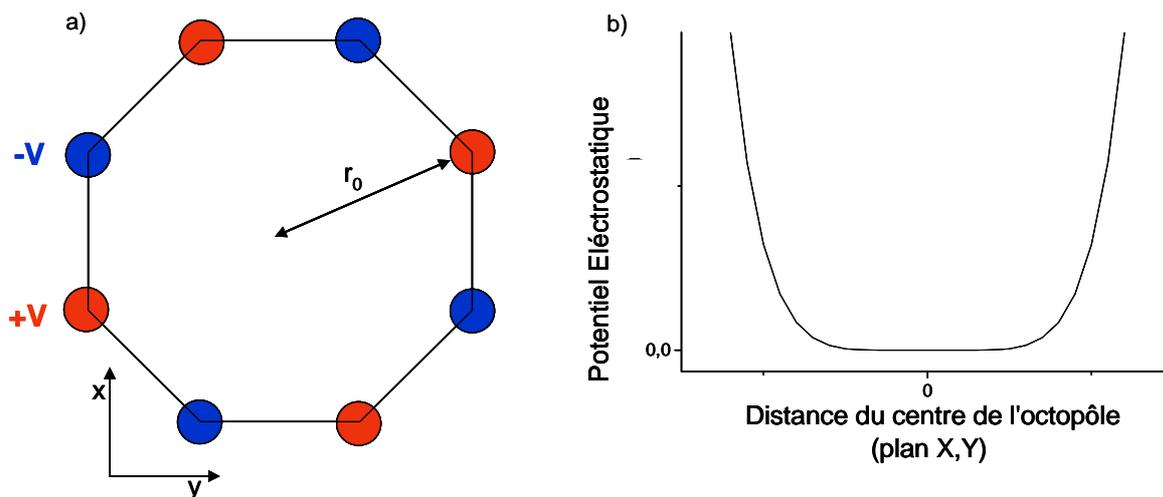


Figure 1.4 - a) Schéma en coupe de l'octopôle avec les électrodes à des potentiels opposés alternativement. b) forme du potentiel effectif que les ions voient dans l'octopôle.

Les octopôles sont généralement préférés aux hexapôles ou aux quadripôles car ils possèdent une meilleure efficacité de guidage.^[13]

1.1.3 Fonctionnement d'un piège

Le piège quadripolaire fait partie des appareils d'optique ionique ayant le plus haut degré de confinement des ions. Il permet de confiner des ions dans les 3 directions de l'espace.

Pour confiner les ions, on utilise un champ quadripolaire électrostatique oscillant qui est généré par des électrodes hyperboloïdes. La trajectoire des ions dans ce champ est déduite des équations de Mathieu.^[17] La résolution de ces équations montre que pour des tensions particulières appliquées aux électrodes certains ions ont des trajectoires stables. On pourra définir des zones de stabilité à partir des solutions. Après la résolution des équations de Mathieu, nous discuterons des zones de stabilités afin de bien comprendre les modes de fonctionnement du piège.

1.1.3.1 Potentiel et équations du mouvement

Potentiel. Le potentiel utilisé pour piéger les ions est de la forme quadripolaire suivante^[14] :

$$\Phi(r, z, t) = \frac{\Phi_0(t)}{r_0^2} (r^2 - 2z^2) \quad 1-10$$

où $r^2 = x^2 + y^2$.

La figure 1.5 a) représente l'ensemble des électrodes qui génèrent un tel potentiel. Le piège est formé de trois électrodes en inox. Une électrode annulaire centrale et deux électrodes « chapeaux » chacune percée d'un trou afin d'injecter et d'éjecter les ions du piège. On peut aussi voir des anneaux en quartz qui permettent de maintenir un parallélisme et une distance particulière entre les électrodes. Un flux constant d'hélium est injecté au centre des électrodes, c'est le gaz tampon, la pression au centre du piège est de 10^{-3} torr (cf. figure 1.1). Une coupe du piège suivant le plan (r,z) et les lignes de potentiel sont représentées sur la figure 1.5 b). Les électrodes possèdent un grand nombre des symétries qui vont être utilisées pour la résolution du problème. Comme on peut le voir sur la figure 1.5 a), il existe une symétrie de révolution suivant l'axe z et le système d'électrode présente une symétrie de réflexion suivant le plan perpendiculaire à z à $z=0$. On utilise un système de coordonnées cylindrique r,z pour exprimer potentiel et trajectoire.

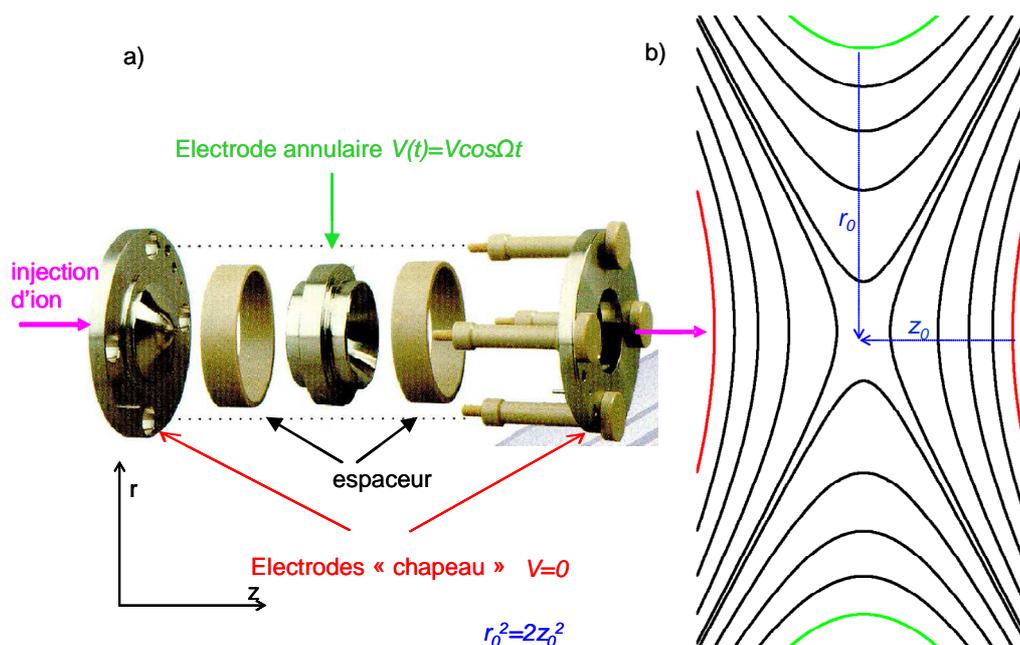


Figure 1.5 - Électrodes du piège (vue éclatée a) et équipotentiel associé b).

Différentes configurations sont possibles pour les potentiels appliqués aux électrodes. Elles amènent toutes aux mêmes lignes de potentiels montrés sur la figure 1.5 b) et la principale différence entre les configurations est le mode de fonctionnement du piège.^[14] Sur notre appareil, les électrodes « chapeaux » sont mises à la masse et l'électrode annulaire à un potentiel périodique $\Phi_0(t)$ présentant une composante fixe U avec une composante radiofréquence V à la pulsation Ω :

$$\Phi_0(t) = U - V \cos(\Omega t) \quad 1-11$$

Dans cette configuration un terme $\Phi_0/2$ doit être rajouté au potentiel de l'équation 1-10 pour satisfaire les conditions limites sur les électrodes.

Entre les électrodes, il n'y a aucune charge présente, le potentiel $\Phi(r,z,t)$ vérifie l'équation de Laplace ($\Delta\Phi=0$). Les conditions aux limites sur les électrodes nous donne $r_0^2=2z_0^2$, cette relation géométrique sur la position des électrodes représentées sur la figure 1.5 a) est idéale. Thermo finnigan utilise la géométrie suivant $r_0=0.707$ et $z_0=0.783$, configuration dite « stretched ».

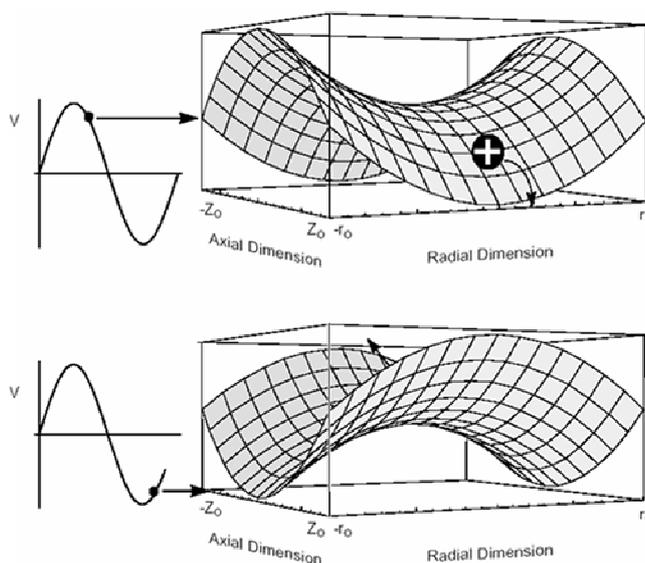


Figure 1.6 - Surfaces de potentiel d'un champ quadripolaire alternatif.^[15]

Sur la figure 1.6, le potentiel que voit un ion positif est représenté en trois dimensions. On s'aperçoit que ce potentiel en « selle de cheval » ne présente pas de minimum global ($\Delta\Phi=0$). Il va piéger les ions dans une seule direction de l'espace et dans l'autre direction ils seront instables. En appliquant une composante oscillante $V\cos\Omega t$, la surface de potentiel va

s'inverser de même que la direction stable et instable, comme on le voit sur la figure 1.6. On va ainsi créer un pseudo puit de potentiel, cela va permettre de confiner des espèces chargées. Cette notion de pseudo puit de potentiel fut introduite par Dehmelt^[16] et développée par Dawson.^[17]

Equation du mouvement. Les équations du mouvement d'une particule de charge Ze (e la charge de l'électron et Z le nombre de charge) et de masse m peuvent être déduites pour les différentes coordonnées r et z en faisant un bilan des forces à partir du potentiel $\Phi(t,r,z)$.

$$\vec{F} = m\vec{a} = m\frac{d^2\vec{r}}{dt^2} = -Ze\vec{\nabla}\Phi(r, z, t) \quad 1-12$$

En considérant les symétries et en particulier la symétrie de rotation suivant l'axe z qui donne l'indépendance en θ . On obtient les équations du mouvement pour les coordonnées r et z sous la forme suivante :

$$\frac{\partial^2 u}{\partial \xi^2} + (a_u - 2q_u \cos(2\xi)) = 0 \quad 1-13$$

où $\xi = \Omega t/2$ et $u = z$ ou r et avec

$$a_z \propto \frac{ZeU}{mr_0^2\Omega^2} \quad 1-14$$

$$q_z \propto \frac{ZeV}{mr_0^2\Omega^2} \quad 1-15$$

et

$$\begin{cases} a_z = -2a_r \\ q_z = -2q_r \end{cases} \quad 1-16$$

Dans les équations 1-14 et 1-15, on donne l'expression de a_z et q_z à un coefficient près qui va dépendre du choix du mode de potentiel appliqué aux électrodes.^[14]

L'équation du mouvement 1-13 qui constitue le cœur du problème, est connue sous le nom d'équation de Mathieu. Elle est caractérisée par deux paramètres a_u et q_u . On la retrouve dans différents problèmes de physiques impliquant des résonances paramétriques d'oscillateur

forcé (circuit électrique, mécanique), les vibrations d'une membrane de forme elliptique... Nous allons maintenant résoudre ces équations suivant les coordonnées r et z , ce qui permettra de représenter le diagramme de stabilité à travers lequel nous pourrons comprendre le fonctionnement du piège.

1.1.3.2 Solution de l'équation de Mathieu et diagramme de stabilité

L'équation de Mathieu 1-13 est une équation différentielle à coefficients périodiques dont la solution générale peut être donnée sous la forme de la série entière suivante :

$$u = \Gamma e^{\mu\xi} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} C_{2n} e^{2in\xi} + \Gamma' e^{-\mu\xi} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} C_{2n} e^{-2in\xi} \quad 1-17$$

où les C_{2n} sont réels, ils déterminent l'amplitude du mouvement et dépendent de a et q mais pas des conditions initiales, μ est un nombre complexe et peut être exprimé par $\mu = \alpha + i\beta$. Γ et Γ' sont les coefficients complexes dépendants des conditions initiales; la phase ξ_0 , la position u_0 et la vitesse \dot{u}_0 .

Dans l'équation 1-17, on voit que la trajectoire u (r ou z) sera stable si et seulement si, u reste borné. En d'autre terme il faut que u soit périodique ce qui signifie physiquement que la trajectoire des ions va être oscillante à l'intérieur du piège (entre les électrodes). Pour que u soit périodique il faut que μ soit purement complexe :

$$\mu = i\beta \quad 1-18$$

Pour un β entier les solutions trouvées sont périodiques mais instables, seules les solutions pour les β non entiers sont stables. Les β entiers représentent les limites de stabilité. L'équation 1-17 prend maintenant la forme suivante :

$$u = \Gamma e^{i\beta\xi} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} C_{2n} e^{2in\xi} + \Gamma' e^{-i\beta\xi} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} C_{2n} e^{-2in\xi} \quad 1-19$$

En appliquant cette solution dans l'équation de Mathieu 1-13, on obtient la relation de récurrence sur les C_{2n} suivante :

$$\left[(2in + i\beta)^2 + a \right] C_{2n} - qC_{2n-2} - qC_{2n+2} = 0 \quad 1-20$$

En résolvant l'équation 1-20, pour chaque valeur de β , on obtient un ensemble de couples (a, q) . La figure 1.7 a) montre que l'ensemble de ces courbes définit une zone de stabilité pour la coordonnée z , c'est le diagramme de stabilité. La figure 1.7 b) représente une des courbes d'iso β_z ($\beta_z = \text{constant}$) sur un diagramme (q, a) pour la coordonnée z autour de la zone de $(a, q) = (0, 0)$. Chaque ion défini par une masse et une charge, est associé à un couple (a, q) donné par les équations 1-14 et 1-15, pour un couple de tensions (U, V) appliqué. Si le couple (a, q) se situe dans la zone de stabilité, l'ion est stable sur la coordonnée z . Pour la coordonnée r , nous aurions le même diagramme sur les coordonnées (a_r, q_r) car nous avons les mêmes équations pour r et z (équation 1-13). A partir des relations 1-16, il y a un facteur -2 entre (a_z, q_z) et (a_r, q_r) , on peut tracer le diagramme de stabilité suivant r dans le système de coordonnées z qui est montré sur la figure 1.7 c).

Dans l'espace (a_z, q_z) , les zones définies par les intersections des deux diagrammes des figures 1.7 a) et 1.7 c), définissent les zones où les ions sont stables suivant les coordonnées r et z . Ce sont les zones de stabilité du piège qui permettent de confiner les ions dans les 3 directions de l'espace. La figure 1.8 montre la première zone de stabilité qui coupe l'axe $a_z = 0$. Cette zone est choisie de manière pratique car les tensions (U, V) utilisées sont les moins élevées ($a_z(V)$).

Nous avons maintenant le diagramme de stabilité du piège délimité par les iso potentiels $\beta_r = 0$, $\beta_r = 1$ et $\beta_z = 0$, $\beta_z = 1$, dans l'espace (a_z, q_z) (cf. figure 1.8). Ce diagramme va maintenant nous permettre de résoudre et de tracer la trajectoire des ions afin de discuter du fonctionnement du piège.

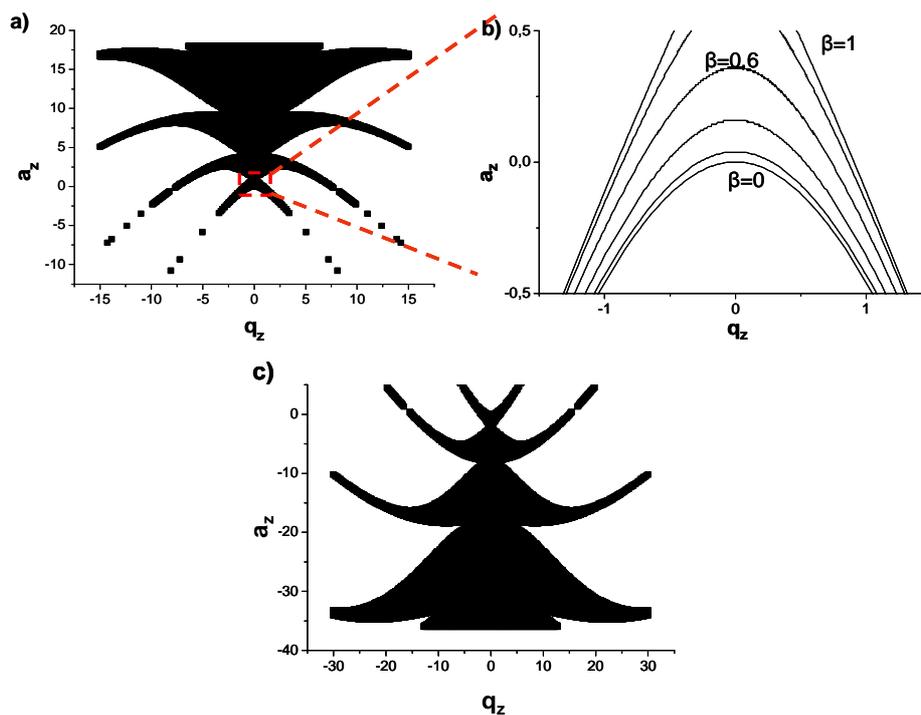


Figure 1.7 - Diagramme de stabilité dans l'espace de coordonnée (a_z, q_z) . a) suivant la coordonnée z , b) zoom de la partie centré autour de $(0,0)$. c) suivant la coordonnée r .

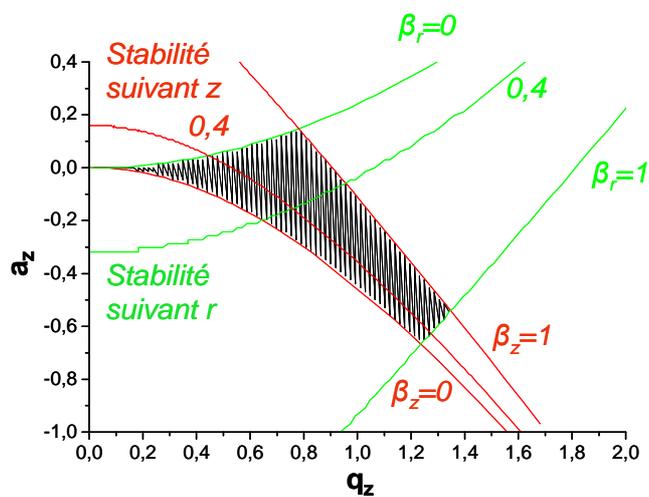


Figure 1.8 - Diagramme de stabilité du piège dans les coordonnées (a_z, q_z) . Intersection des figure 1.7 a) et 1.7 b)

1.1.3.3 Trajectoire et simulation SIMION

Pour comprendre le fonctionnement du piège, il est intéressant de visualiser la trajectoire des ions et de voir leurs évolutions en fonction des différents paramètres. D'autre

part le but de nos expériences est de faire interagir un laser avec le nuage d'ions, il est donc essentiel de bien estimer la taille et la trajectoire des ions. Je présenterai deux types de résultats, des trajectoires calculées avec une méthode de résolution numérique, et des résultats obtenus avec le logiciel de simulation SIMION.

Sur la figure 1.9, on peut voir la projection sur le plan (r,z) de la trajectoire d'un ion, avec les conditions initiales d'injections $r,z = (0,0)$ et $r(\dot{r},\dot{z})=(0,0)$. Cette trajectoire a été obtenue en résolvant par une méthode analytique, les équations de Mathieu. L'algorithme a été programmé en C. La courbe obtenue montre que la trajectoire de l'ion est oscillante avec une forme en « huit » caractéristique, appelée courbe de « Lissajou ». On observe plusieurs fréquences caractéristiques. La trajectoire principale, figure de « Lissajou » possède deux pulsations w_r et w_z . A cette trajectoire on superposée une oscillation plus rapide, c'est Ω . Par l'approximation $(w_{z,r} \ll \Omega)^{[18]}$, on obtient une forme simple pour les fréquences w_z et w_r :

$$w_i \approx \frac{\Omega}{2} \left(a_i + \frac{q_i^2}{2} \right)^2, i = z, r \quad 1-21$$

Pour a_z et $a_r = 0$, on a $w_r = 2w_z$, c'est la relation que l'on obtient pour la courbe théorique de la figure de « Lissajou » sur la figure 1.9. Elle se superpose à la courbe simulée de la trajectoire.

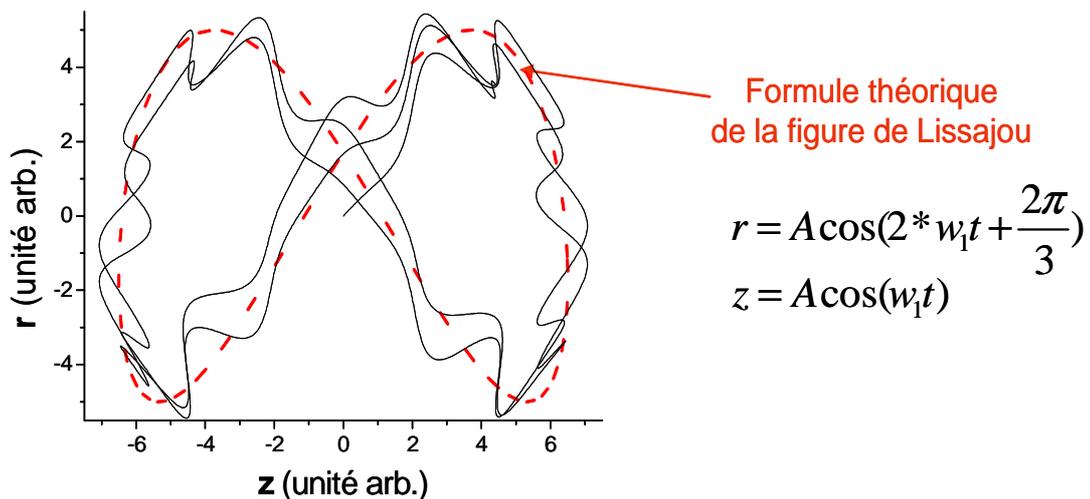


Figure 1.9 - Trajectoire et courbe de « Lissajou ». La projection de la trajectoire sur le plan (r,z) en trait continu a été obtenu pour $a_z=0$ et $q_z=0.3$ avec les conditions initiales : $\xi_0 = 0, u_0 = 0$.

Un second type de résultats provient de simulations réalisées par SIMION 3D version 7.0. Ce logiciel est destiné à modéliser des systèmes d'optique ionique et il est très utilisé par les concepteurs de spectromètres de masse. Sur les figures 1.10 a) et b), on voit deux trajectoires simulées au centre des électrodes pour un même ion avec un q_z différent. Sur la figure 1.10 a), le q_z est de 0.3, la trajectoire est bien centrée, régulière, l'ion est bien stable. Par contre sur la figure 1.10 b), le q_z est de 0.908, la trajectoire est déformée suivant l'axe z vers les électrodes chapeaux et l'ion va être déstabilisé et éjecté vers l'une des électrodes « chapeau ». L'éjection des ion s'effectue suivant l'axe z , le choix des axes (a_z, q_z) pour le diagramme de stabilité sur la figure 1.10 b) permet de mieux rendre compte du mode de fonctionnement. Notons qu'avec SIMION, il est possible d'introduire par des modèles simples de collision sur un gaz, l'influence d'une pression d'hélium dans le piège sur la trajectoire.^[19]

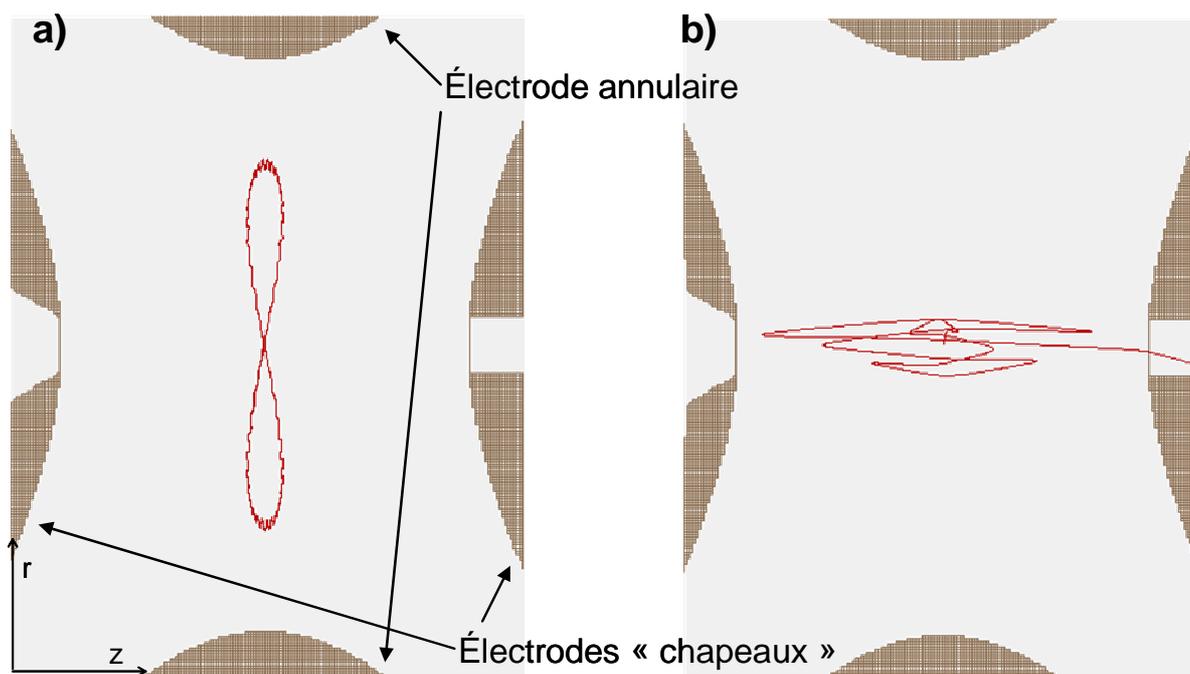


Figure 1.10 - Trajectoire sur SIMION. a) q_z est à 0.3, b) q_z est à 0.908.

1.1.3.4 Modes de fonctionnement du piège

Le piège quadripolaire permet de réaliser successivement 4 étapes afin d'analyser des ions. Après avoir été injectés (1) dans le piège, les ions vont être stockés (2), puis un type d'ion choisi va être isolé (3) et excité (4), pour finir l'ensemble des espèces présentes dans le piège vont être éjectées vers le détecteur. Nous commencerons par le stockage puis l'éjection

qui regroupe le premier mode de fonctionnement et ensuite nous verrons l'isolation et l'excitation.

Le principal rôle du piège va être de confiner les ions puis de les éjecter successivement afin de pouvoir les identifier. La seconde fonction, qui lui confère sa spécificité par rapport à d'autres outils de masse tel que les quadripôles, est de pouvoir isoler un type d'ion particulier caractérisé par un rapport masse sur charge et le stocker pendant plusieurs secondes.

Dans un fonctionnement normal du piège, nous nous situons dans le diagramme de stabilité sur l'axe des $a_z = 0$. Cela correspond à une tension appliquée à l'électrode centrale de $U - V \cos(\Omega t)$ avec $U = 0$. Comme nous le montrent les équations 1-14 et 1-15, lorsque U et V sont déterminés, chaque ion défini par (m, z) est associé à un couple (q_z, a_z) , dans notre cas simplement à q_z . Sur la figure 1.11, on a positionné les ions présents dans le piège sur l'axe q_z . Certains seront dans le diagramme de stabilité, ils seront stables et les autres seront instables. Les cas limites de stabilité correspondent à un q_z compris entre 0 et 0.908. Ce dernier q_z et la tension V appliquée déterminent une masse minimum pouvant être piégée, $m_{\text{limite}} : m_{\text{limite}} \propto U / 0.908$ (voir équations 1-14 et 1-15). Cette masse est appelée le « Lowmass Cut Off ». On applique cette tension lorsque l'on remplit le piège, et tous les ions de masses supérieures sont stockés.

Obtention d'un spectre de masse. On applique une rampe de tension sur V dans un intervalle $[V_1, V_2]$, les q_z de chaque ion vont augmenter, les ions vont migrer sur l'axe q_z jusqu'au q_z limite et vont être éjectés par masse croissante, comme le montre la figure 1.11. Les ions seront instables suivant l'axe z , et ils vont être éjectés à travers les électrodes « chapeaux », pour $q_z = 0.908$ (cf. figure 1.10 b)). Le détecteur est disposé derrière l'une des électrodes « chapeaux » (figure 1.1). En corrélant le temps d'arrivée sur le détecteur avec la tension V appliquée, on obtient un spectre de masse. L'intervalle $[V_1, V_2]$ va déterminer un intervalle $[m_1, m_2]$. On appelle ce mode un « Full Scan MS ». Il existe un mode similaire appelé « Zoom scan », dans ce cas, l'intervalle de tension (V_1, V_2) associé à l'intervalle de masse $[m_1, m_2]$ est plus court, cela permet d'avoir un temps de rampe plus grand et ainsi d'avoir une meilleure résolution (voir tableau 1.1, p. 51).

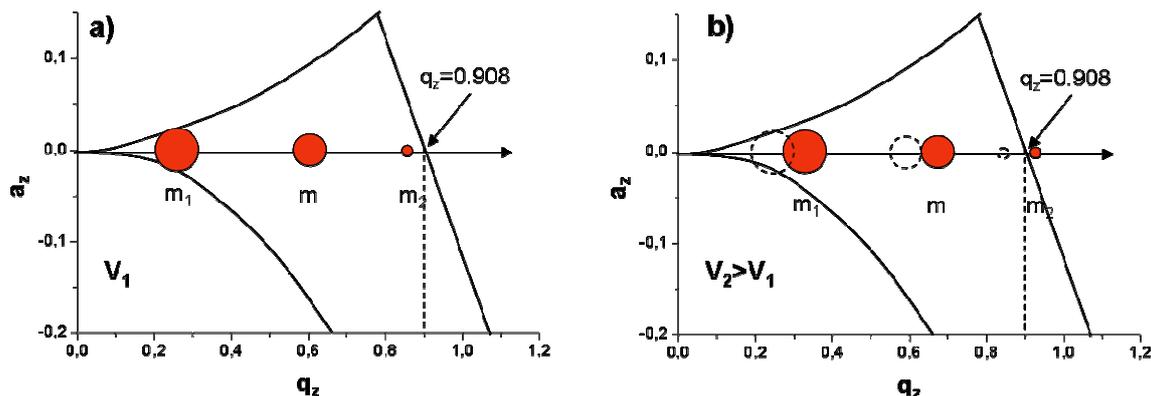


Figure 1.11 - Fonctionnement du piège sur le diagramme de stabilité. a) piégeage des ions sur l'axe q_z , b) éjection successive des ions à $q_z = 0.908$ pour la détection.

Isolation d'un ion à m/z donné. Le piège est capable d'isoler un type d'ion défini par son couple (m, z) . Pour la sélection en masse, le principe est de charger le piège comme précédemment, puis de sélectionner un ion en éjectant tous les autres et ne conservant que celui choisi. Concrètement, on détermine un intervalle $[m_1, m_2]$ de masse à piéger. Pour éjecter les ions de masse hors intervalle, on utilise une éjection hybride s'appuyant sur deux méthodes.

On effectue une rampe de tension tel qu'on l'a décrit précédemment pour éjecter les ions de faible masse. Lorsque l'on arrive à la masse m_1 , on stoppe la rampe de tension. Tous les ions de masse inférieure à m_1 sont éjectés.

Ensuite pour les ions de masse supérieure à m_2 , on les éjecte en appliquant une tension résonante $V_{res} \cos \Omega_{res} t$ sur les électrodes « chapeau ». La fréquence Ω_{res} est choisie de manière à ce qu'elle soit en résonance avec la pulsation axiale w_z de l'ion. La tension V_{res} permet d'augmenter l'amplitude de la trajectoire jusqu'à éjection par les électrodes « chapeaux ». Une fois que l'ion est isolé, il peut être conservé pendant plusieurs secondes dans le piège et être activé.

Excitation d'un ion. L'étape durant laquelle les ions vont être excités sur le plan de l'énergie interne est l'activation. Il existe plusieurs techniques d'activation dont nous parlerons un peu plus tard. En ce qui nous concerne pour l'instant, la collision sur un gaz neutre est la technique utilisée de manière standard sur notre spectromètre de masse LCQ. L'activation par collision s'effectue en accélérant les ions dans le piège rempli de gaz neutre

(He, à 10^{-3} torr) à l'aide d'une radio fréquence résonnante avec la fréquence d'oscillation de l'ion comme nous l'avons expliqué pour la seconde partie de l'éjection sélective. Après de multiples collisions, les ions acquièrent suffisamment d'énergie interne pour se fragmenter.

Sur notre appareil, les méthodes utilisées pour les différents modes de fonctionnement sont des combinaisons de ces techniques. Par exemple, lors de l'éjection pour la détection, afin d'améliorer la résolution, une radio fréquence résonnante est rajoutée sur les électrodes « chapeaux ».

Un gaz tampon est injecté au centre du piège afin de maintenir une pression de 10^{-3} torr (soit une densité de l'ordre de $10^{19}/\text{m}^3$). Le gaz utilisé est l'hélium et il a plusieurs rôles. Tout d'abord, il permet de ralentir les ions dans le piège afin que les conditions initiales des ions soient optimales pour piéger correctement les ions. Ensuite lorsque les ions sont piégés, ils subissent de multiples collisions avec l'hélium environ 20 000 collisions /s. Chaque collision dépose une faible quantité d'énergie de l'ordre de 10% de l'énergie cinétique (environ 10^{-2} eV), après quelques collisions (environ $15^{[14]}$) l'ion est thermalisé. L'hélium permet aussi de regrouper les ions au centre du piège suite aux collisions multiples qui ralentissent les ions et diminuent la taille de leur trajectoire, cela a pour principal effet d'augmenter la qualité du piégeage et la résolution. Pour finir, lors de la CID (*Collision Induced Dissociation*), l'activation se fait également par collision sur l'hélium.

1.2 Lasers et couplage

1.2.1 Couplage : Piège-Laser

Le montage que nous avons développé, permet d'injecter un faisceau laser dans le piège, au centre de l'électrode, sur le nuage d'ions piégés. Plusieurs points ont dû être pris en compte lors de la réalisation de ce couplage. Il est nécessaire de conserver les caractéristiques commerciales de l'appareil qui en fait un outil d'analyse en masse performant ; la précision en masse, la résolution, l'activation par collision doivent être conservées. Un système d'alignement du laser au centre du piège est indispensable puisque la zone d'interaction entre le nuage d'ions et le laser est sous vide et confinée. Le dernier point est la synchronisation du laser avec le piège, afin que l'irradiation des ions s'effectue pendant la période d'activation.

La première étape est de créer une ouverture sur l'enceinte principale qui est à une pression d'environ 10^{-5} torr, (cf. figure 1.1). Cette ouverture est composée d'un hublot en quartz. Le perçage fut délicat car l'enceinte à percer supporte toute l'optique ionique

(lentilles, octapôles, piège et détecteur) ainsi que l'électronique associée, de plus la pièce a une géométrie complexe. Une deuxième ouverture a été réalisée à proximité permettant de faire passer une fibre optique à l'aide d'un socle de passage à vide pour fibre. On peut voir ces modifications sur la figure 1.12

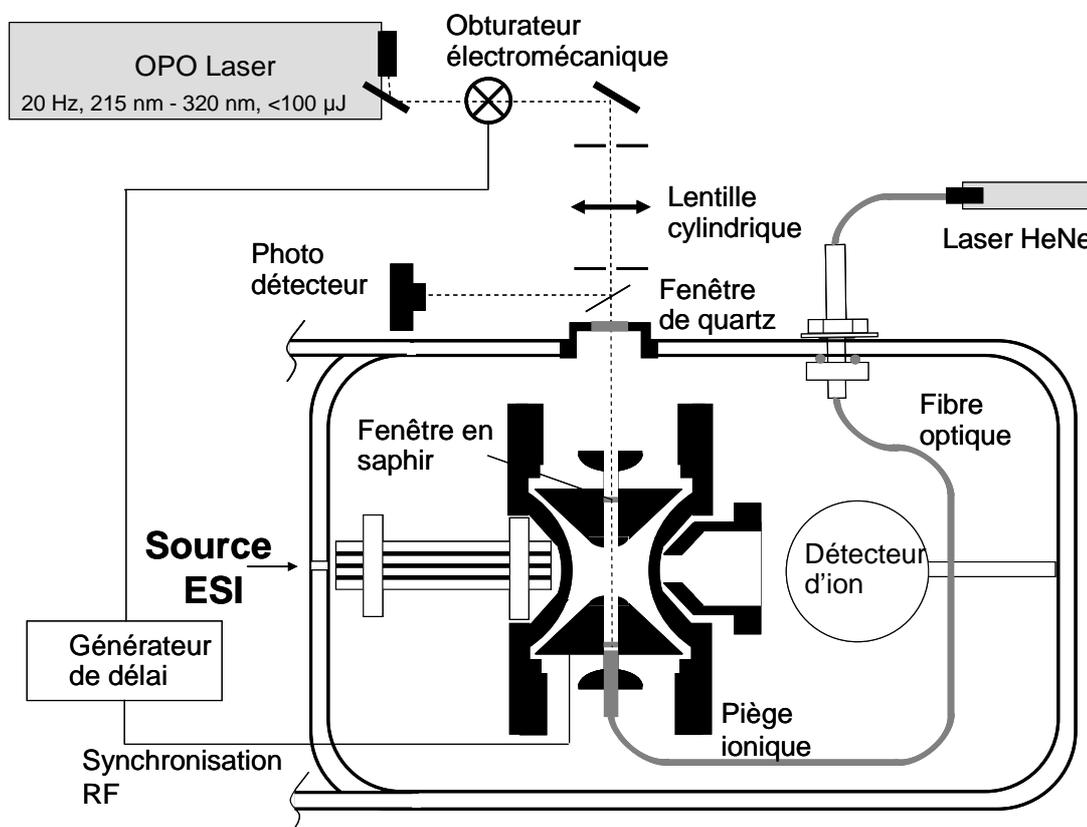


Figure 1.12 - Couplage Piège-Laser. Composé d'un laser d'injection (ici noté OPO), d'une ligne optique, du piège, d'un laser hélium-néon (HeNe) pour l'alignement et d'un générateur de délai contrôlant un obturateur électromécanique pour synchroniser le piège et le laser. Ce montage fait l'objet d'un brevet^[20].

L'électrode centrale est percée de part en part pour injecter des lasers au centre du piège par les deux extrémités, comme on le voit sur la figure 1.13 b). Ces ouvertures ont un diamètre de 3 mm, c'est la taille optimale déterminée modifiant de manière négligeable les lignes de champ de l'électrode. Une fenêtre de saphir et une lentille (de quartz) sont disposées aux ouvertures de l'électrode sur des supports en Cestidur (*fiber* et *window tip* sur la figure 1.13). Ces fenêtres permettent de conserver la pression d'hélium au centre des électrodes à 1mtorr de façon à garder les spécificités de piégeage, d'isolation, d'excitation et d'éjection de l'appareil. Le choix du saphir et du quartz comme matériaux permet l'utilisation de laser UV. Les anneaux en quartz (cf. figure 1.5), ont dû être refaits avec des encoches pour se caler sur

les supports en Cestidur. Malgré ces difficultés d'usinage, le choix du quartz pour ces pièces fut inévitable afin de conserver les caractéristiques capacitives du piège relatif à la radiofréquence appliquée.

La fibre utilisée pour injecter un laser par l'arrière de l'électrode centrale est traitée de manière à être utilisée sous vide, de plus elle est isolée dans une gaine. Elle connecte le socle de passage à vide au support correspondant en Cestidur possédant une connectique simple (standard SMA). La lentille du support permet la focalisation du faisceau au centre du piège. On utilise cette fibre pour injecter un laser HeNe qui permet l'alignement simple et efficace du laser UV-Visible injecté directement.

La synchronisation entre le laser et le piège est fondamentale car cela permet d'injecter le laser lorsque les ions sont dans le piège. Un signal de synchronisation pris sur l'activation dans le piège, fourni via un générateur de délai, un signal TTL qui peut commander un obturateur électromécanique placé sur la ligne du laser. On peut contrôler par ce dispositif le début ainsi que le temps d'injection du laser dans le piège.

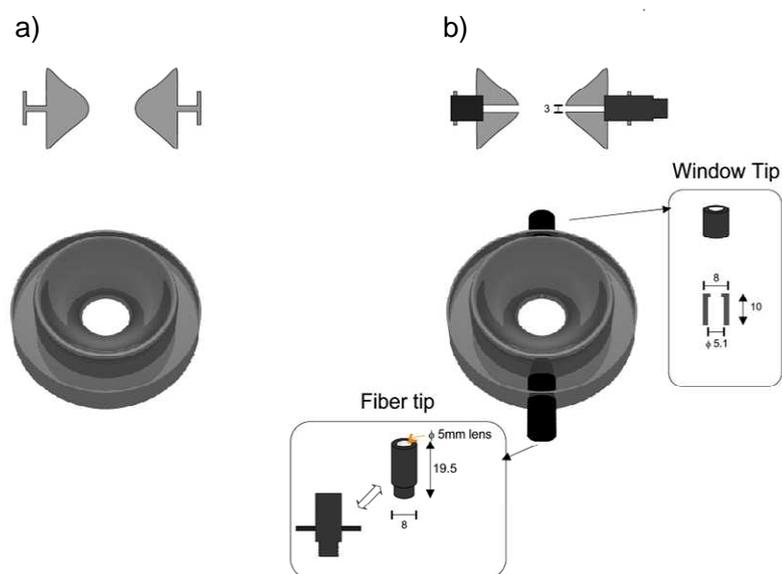


Figure 1.13 - Électrode anneau. a) électrode avant modification. b) électrode anneau après perçage avec les supports en Cestidur (fiber tip et window tip). Schéma issu du brevet^[20] déposé sur ce montage.

Sur la ligne d'injection du laser, on a disposé des diaphragmes pour faciliter l'alignement et pour gérer la taille du faisceau du laser. Une lentille permet d'ajuster l'injection au centre du piège. Une lame de quartz placée devant la fenêtre d'entrée du piège permet de récolter une petite quantité du signal laser sur un mesureur de puissance afin d'estimer la quantité de photon qui arrive sur le nuage d'ions.

1.2.2 Les lasers

Nous avons utilisé deux lasers UV-Visible.

Laser kHz. Le premier est un laser compact pompé par diode, Q-switché, (CrystaLaser, Reno, Nevada, US). Le cristal utilisé est un Nd :YLF, (fluorure d'yttrium lithium dopé au néodyme). Le schéma du laser est représenté sur la figure 1.14. La longueur d'onde du fondamental à 1047,1 nm est obtenue après le pompage du cristal par une diode. Une succession de deux cristaux doubleurs permet d'obtenir successivement la longueur d'onde 523,5 nm (vert) et la longueur d'onde 262,3 nm (UltraViolet). En sortie du laser nous avons accès simultanément aux deux longueurs d'onde. Les deux faisceaux initialement superposés en sortie du 2^{ème} cristal doubleur sont séparés par un prisme. Le laser fournit des pulses d'une dizaine de ns de largeur avec une fréquence de répétition réglable de 1 à 10 kHz. Sur la figure 1.15, on voit que le maximum de puissance pour le faisceau à 262 nm est pour la fréquence de 3 kHz avec une puissance de 10 mW cela fait une énergie par pulse de 3 μ J dans l'UV. Le faisceau est divergent dans une seule direction, à 1 mètre il fait une tâche ellipsoïdale de 5 cm de grand axe et 0.5 cm de petit axe. On utilise une lentille cylindrique pour contrôler cette divergence *uniaxiale*.

Ce laser présente plusieurs avantages. Il est compact, la tête du laser a pour dimension 5x18.5x3.6 cm, ce qui facilite le positionnement pour l'injection, on peut même envisager d'installer ce laser dans le châssis du spectromètre de masse. On peut synchroniser le déclenchement laser des Q-switch avec un trigger externe, ce qui facilite le couplage. La fréquence kHz permet un taux de répétition important nécessaire lorsque les phénomènes étudiés sont peu fréquents. Il est très facile de coupler ce laser avec un autre type de piège tel qu'un piège linéaire, ce qui a été réalisé lors de collaboration avec Jérôme Lemoine (piège LTQ, Thermo Finnigan).^[21]

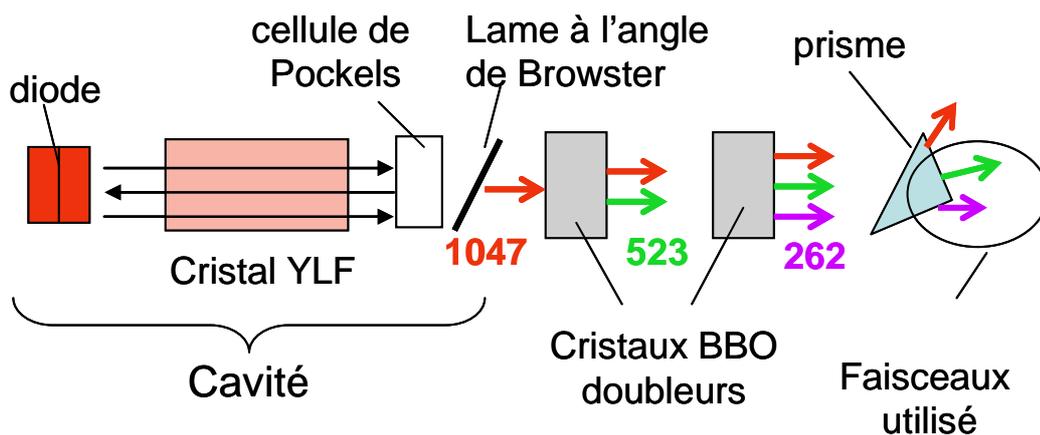


Figure 1.14 - Laser compact QUV-262-10. La cavité YLF est pompée par une diode qui joue aussi le rôle de fond de cavité. L'accord de phase est assuré par 2 cristaux BBO. Les 2 faisceaux en sortie sont séparés par un prisme.

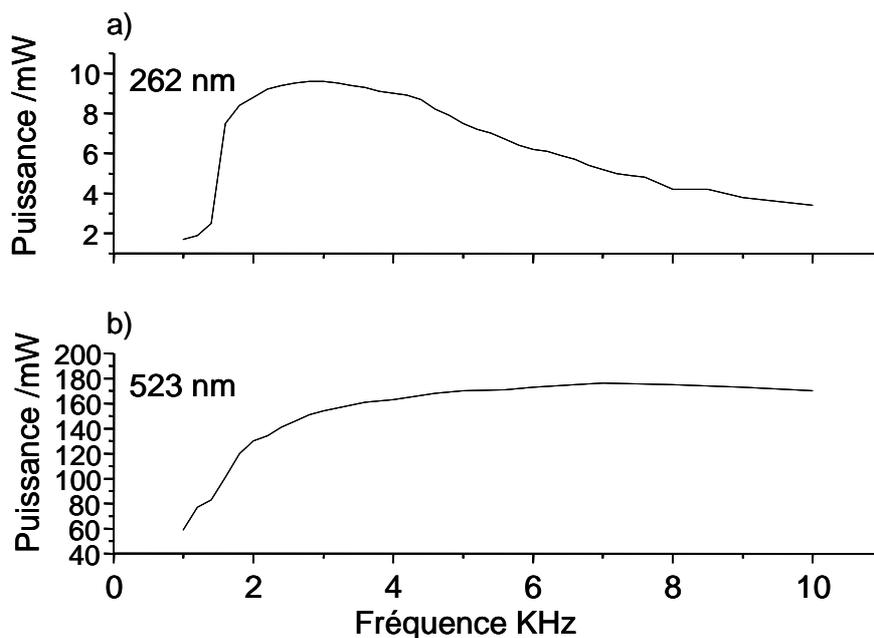


Figure 1.15 - Laser KHz pompé par diode, puissance en fonction de la fréquence des pulses pour les deux longueurs d'onde.

Laser OPO. Le second est un laser accordable en longueur d'onde, composé d'un oscillateur paramétrique optique (OPO) pompé par un laser Nd^{3+} : YAG (grenat d'yttrium aluminium dopé au néodyme $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$), son schéma est présenté sur la figure 1.16.

Le laser de pompe est un PowerLite™ 8000 de la marque Continuum (cf. figure 1.16 a)). Il est composé de deux têtes chacune formée d'un cristal et d'un flash. La première alimente la cavité YAG, c'est l'oscillateur, elle fournit des pulses laser à 1064 nm de 5 ns à une fréquence de 20 Hz. La seconde tête est l'amplificateur, il permet d'augmenter la puissance. En sortie d'amplificateur le faisceau est doublé dans un cristal BBO (beta borate de barium) et donne un faisceau à 532 nm ainsi que le faisceau à 1064 nm. Le 532 nm et le 1064 nm sont mélangés dans un second BBO, le tripleur, pour obtenir un faisceau à 355 nm avec une énergie par pulse de 150 mJ et une largeur de pulse de 5ns.

Le faisceau à 355 nm est injecté dans l'OPO Panther™ (Continuum) (cf. figure 1.16 b)). En utilisant les propriétés optiques non lineaires, un premier cristal BBO permet de balayer des longueurs d'onde de 430 à 660 nm par la relation d'accord de phase suivante :

$$\lambda_{pompe}^{-1} = \lambda_{signal}^{-1} + \lambda_{idler}^{-1} \quad 1-22$$

où $\lambda_{pompe} = 355$ nm, $\lambda_{signal} =$ visible, $\lambda_{idler} =$ infrarouge.

Le cristal est dans une cavité afin d'optimiser le rendement faible de cette conversion (cf. figure 1.16 a)). Une lame compensatrice permet de corriger la déviation due aux multiples passages dans le cristal. La gamme de longueur d'onde 215-330 nm est obtenue par un jeu de deux cristaux de BBO qui doublent la fréquence. On utilise deux cristaux car chacun travaille dans une zone, cela évite la rotation complète du cristal : l'un dans la zone 215 – 260 nm et l'autre dans 260 – 330 nm et à 260 nm les deux sont actifs. En sortie, un prisme permet de séparer le visible (430 – 660 nm) de l'UV (215 – 330 nm). La gamme IR disponible ne sera pas utilisée, elle permet néanmoins de balayer la zone 770 – 2050 nm et après doublage 385 – 1025 nm, une zone au voisinage de 350 nm reste difficile à couvrir. La figure 1.16 c) montre la courbe d'énergie en fonction de la longueur d'onde par pulse en sortie de l'OPO. Actuellement, en sortie de l'OPO la puissance est de 500 μ J à 215 nm, 1.2 mJ à 260 nm, 300 μ J à 330 pour l'UV et pour le visible, 5.5 mJ à 430 nm, 4 mJ à 480 nm, 4 mJ à 500 nm. Ce laser est essentiel pour nos expériences car la modulation en longueur d'onde va permettre de sonder nos molécules sur une large gamme d'énergies dans l'UV et le visible et de réaliser des spectres optiques.

Pour coupler le laser au piège on utilise un obturateur électromécanique sur le trajet du faisceau (cf. figure 1.12). Cet obturateur électromécanique a un temps de réponse, de l'ordre

de la milliseconde, suffisamment rapide devant les autres temps caractéristiques de l'expérience. Un déclenchement externe du laser aurait pu être envisagé, mais cela nécessitait de re-synchroniser les flashes ainsi que la cellule de Pockels. Il est indispensable de conserver la fréquence de 20 Hz, ce qui est difficile à mettre en œuvre avec l'utilisation de l'AGC (temps de scan non régulier).

De même qu'avec le laser compact, nous avons un faisceau divergent principalement dans une direction et de plus, le profil spatial n'est pas très homogène. L'utilisation d'une lentille cylindrique focalisant au voisinage du centre du piège permet de limiter ces inconvénients. Ce laser ne peut pas être déplacé, l'alignement sera donc plus délicat que pour le laser compact car il ne pourra être fait qu'avec une ligne optique plus complexe et la perte de puissance sera un peu plus élevée.

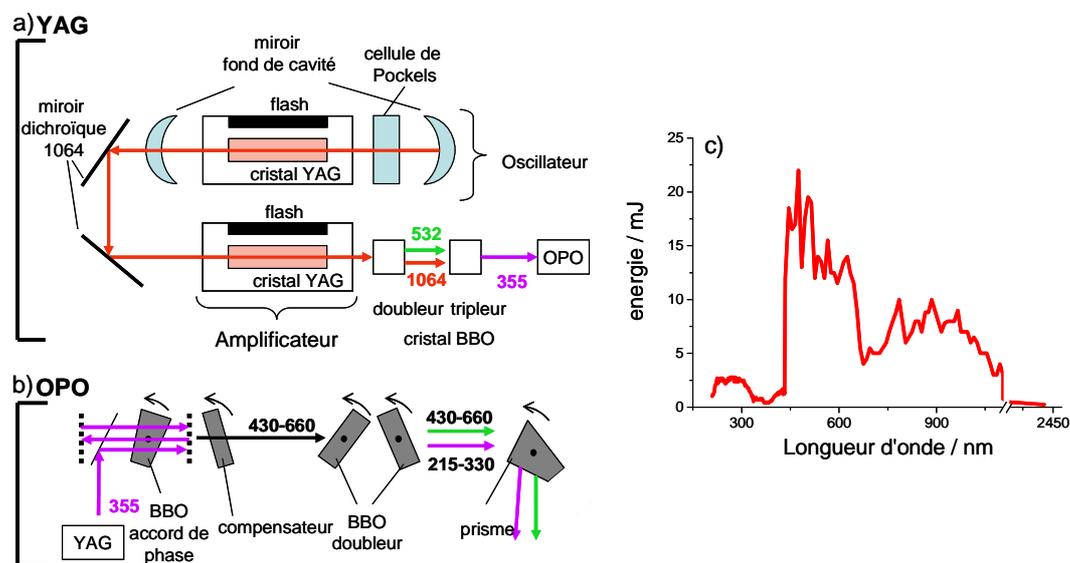


Figure 1.16 - Laser OPO pompé par un YAG. a) laser de pompe YAG pompé par flash avec 2 cavités, un oscillateur et un amplificateur. Faisceau de sortie 355 nm. b) l'OPO possède une cavité avec un cristal BBO pour accord de phase dans le visible. Puis un couple de cristaux BBO permet d'obtenir l'UV.

1.3 Méthodes et mesures

1.3.1 Fonctionnement d'une mesure et spectres

Maintenant que les différents points techniques de l'expérience ont été décrits, nous allons voir plus concrètement comment se déroule une mesure. Il est important de bien avoir en tête l'enchaînement et les durées de chacune des étapes pour pouvoir comprendre correctement les mécanismes.

La première mesure dont nous avons déjà parlé est le scan en full MS. Il consiste à injecter les ions puis à les éjecter vers le détecteur par une rampe de tension sur l'électrode centrale, on obtient un spectre de masse de la solution injectée. Cette séquence, injection puis éjection, constitue un scan, en règle générale les spectres montrés sont une moyenne de 10 à 100 scans. La plupart des spectres présentés dans ce manuscrit sont effectués avec la fonction AGC (Auto Gain Control). Cette fonction permet de garder constant le nombre d'ions injectés dans le piège d'un scan à l'autre ce qui améliore la reproductibilité entre les mesures. Un prescan composé d'une injection rapide de 10 ms puis d'une éjection rapide à 55000 uma s^{-1} (mode turboscan, uma : unité de masse atomique) permet d'estimer la quantité d'ions dans le piège, l'injection suivante est ajustée grâce au prescan. Une rampe normale de tension permet de donner un spectre de masse à la vitesse 5500 uma s^{-1} . Un prescan suivi d'un scan d'analyse constituent un microscan. Un nombre déterminé (paramétrable) de microscan donne un scan. La figure 1.17 donne l'enchaînement d'un microscan. On peut voir sur la figure 1.18 a), le spectre full MS d'une solution de tryptophane, on voit plusieurs pics correspondants à différents ions dont un qui est le tryptophane protoné.

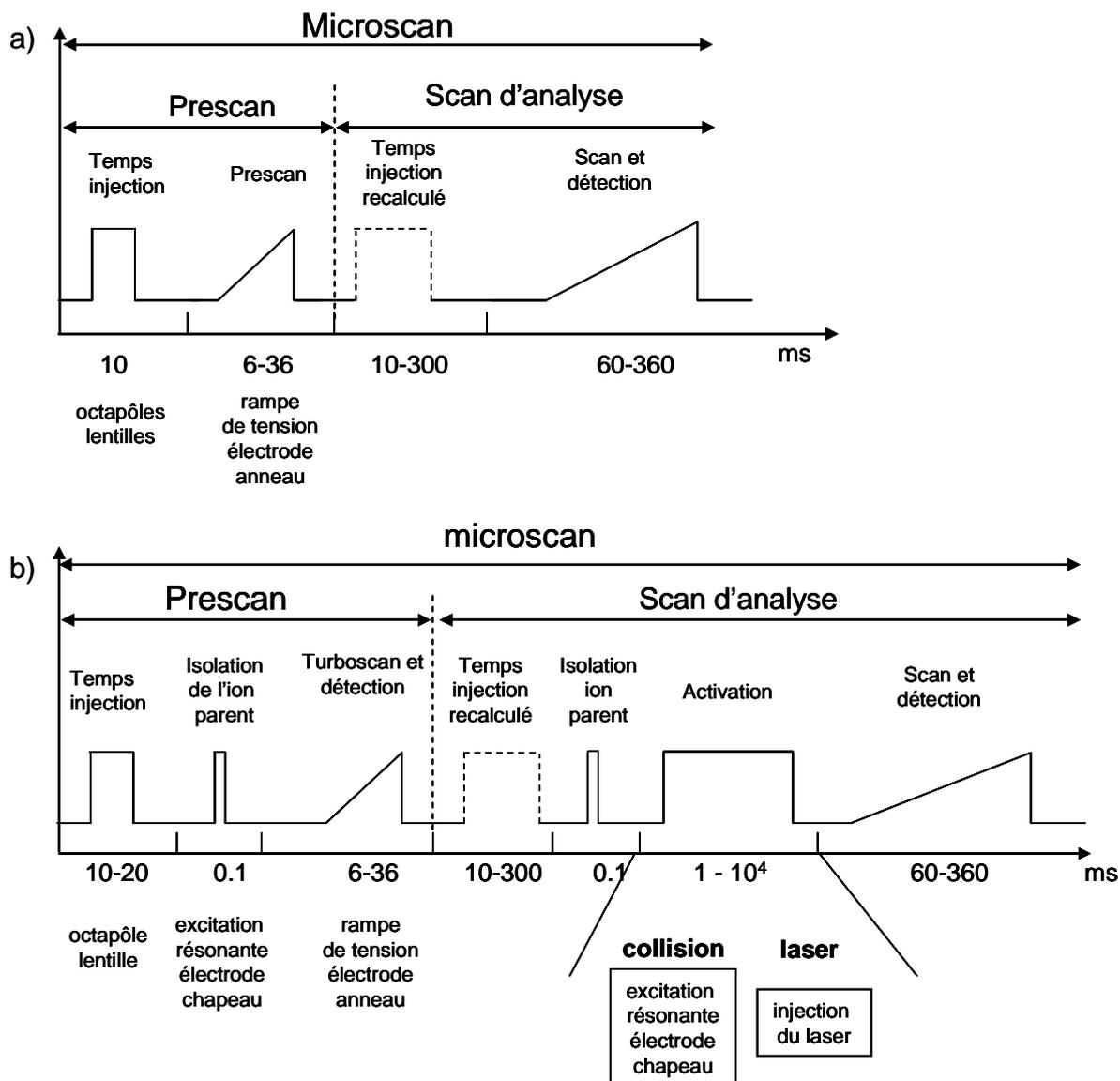


Figure 1.17 – MS/MS^2 . Séquence de fonctionnement et temps. a) fonctionnement normal, b) fonctionnement en AGC (Auto Gain Control) avec un prescan pour ajuster le nombre d'ion dans le piège.

De manière analogue nous avons le zoom scan. C'est un full scan sur un intervalle de masse réduite, en général de 10 à 20 uma, à une vitesse de balayage de 280 uma s^{-1} . Ce type de scan permet d'obtenir un spectre très résolu, typiquement utilisé pour identifier les compositions isotopiques ou les états de charges sur un pic. Un exemple de zoom scan est donné sur la figure 1.18 b), on voit le pic du tryptophane composé exclusivement de carbone C_{12} et le pic où les molécules possèdent un seul carbone C_{13} .

Le second mode, appelé MS^2 , permet la sélection en masse et l'excitation. Ce mode est présenté sur la figure 1.17 b) avec l'option AGC. Lors du prescan, les ions sont injectés dans

le piège, on isole un ion par un intervalle de masse choisi comme on l'a décrit dans l'éjection sélective puis on fait un scan rapide (turbo scan) comme en MS. Le temps d'injection est recalculé et après avoir été isolé, l'ion choisi est stocké dans le piège de quelques millisecondes à plusieurs secondes (1ms à 10s). Pendant cette période de stockage, on peut l'activer soit par collision, soit en injectant le laser. Lorsque l'on choisit l'activation par collision, on applique la tension résonnante $V_{res} \cos \Omega_{rest}$. Quand on injecte le laser pendant une durée déterminée, il n'est pas nécessaire d'utiliser une tension excitatrice, cependant on peut combiner simultanément l'activation par collision et l'activation par laser. Sur la figure 1.18, on voit que l'on peut soit isoler simplement un ion, soit l'isoler et l'activer par collision (CID, Collision Induce Dissociation) ou par laser (UVPD, Ultraviolet PhotoDissociation). L'activation par collision ou par laser donne généralement des fragments. L'étape d'isolation puis d'activation peut être itérée plusieurs fois, en utilisant l'ion parent ou l'un des fragments obtenus, c'est le MS^n . Sur la figure 1.19, on voit la fragmentation successive d'un agrégat d'argent en plusieurs étapes de MS, isolation puis CID du fragment.

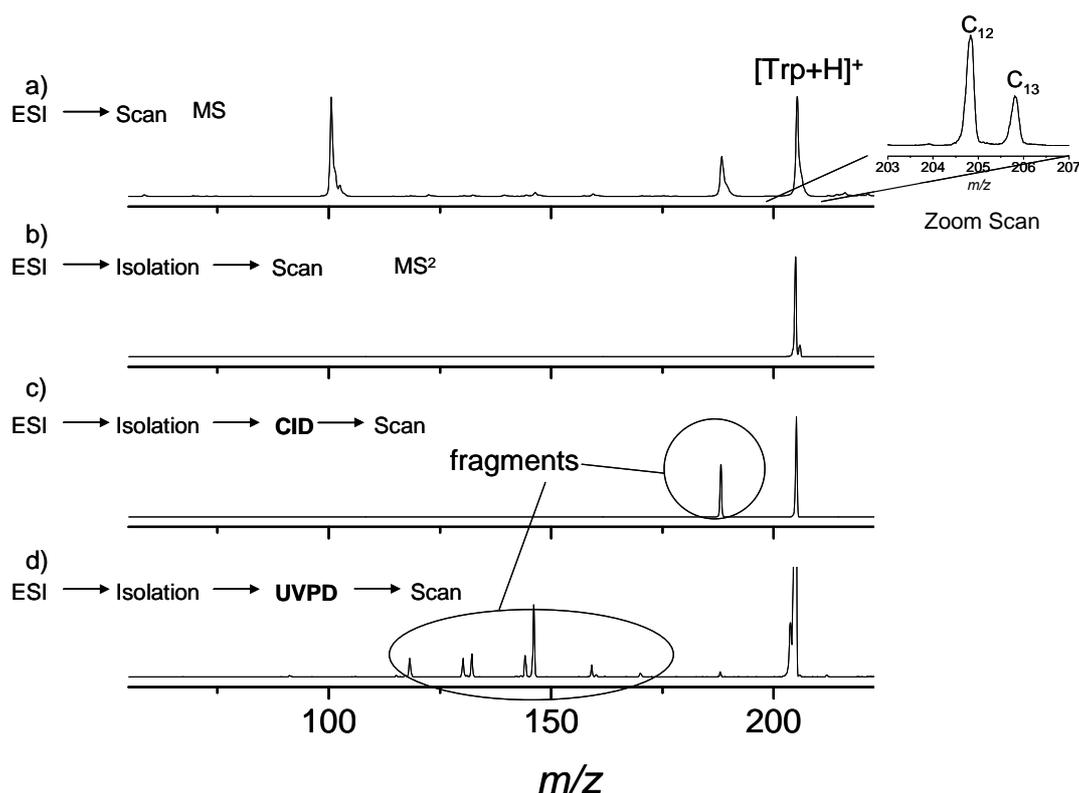


Figure 1.18 - Spectres MS et MS^2 d'une solution de tryptophane. a) spectre MS type full MS, spectre MS^2 du tryptophane protoné b) isolation simple c) MS^2 avec CID, d) MS^2 avec UVPD.

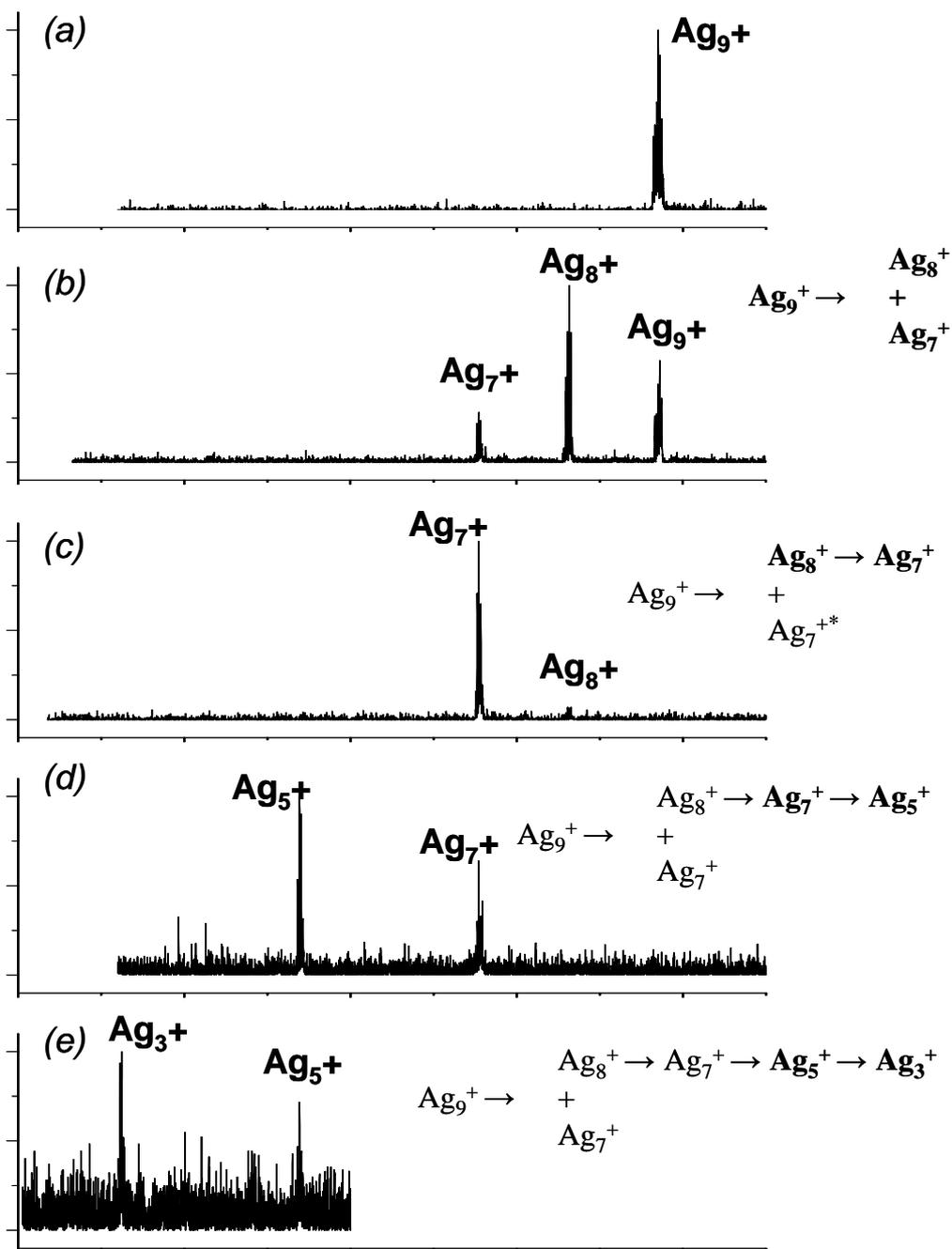


Figure 1.19 - Spectres de MS^n sur un agrégat d'argent ^[22]. a) Isolation du Ag_9^+ , b) CID sur le Ag_9^+ , c) isolation puis CID sur le Ag_8^+ , d) isolation puis CID sur le Ag_7^+ , e) isolation et CID sur le Ag_5^+ . Il est à noter que l' Ag_3^+ est issue de l'ion précurseur Ag_9^+ après 5 étapes de MS (MS^5).

Enfin pour donner quelques caractéristiques des différents modes de scan que propose le spectromètre de masse LCQ duo on peut se reporter au tableau 1.1. La résolution est le rapport $m/\Delta m$ où m est le centre du pic détecté et Δm est la largeur à mi-hauteur du pic. La précision est l'écart entre la masse théorique et la masse détectée.

Mode de scan	Résolution	Précision (Dalton, Da)	vitesse de scan (uma.s ⁻¹)
Normal Scan Full MS	4000	0.2	5500 uma.s ⁻¹
Zoom Scan	10000	0.05	280 uma.s ⁻¹
Turbo Scan	650	3.0	55000 uma.s ⁻¹

Tableau 1.1 - Spécificité des différents modes de fonctionnement.

1.3.2 Spectre UV-Vis

Un dernier point sur les expériences reste à présenter, il s'agit d'un spectrophotomètre qui permet de faire des spectres d'absorption des solutions avant l'utilisation dans l'electrospray et des spectres de fluorescence.

C'est un spectrophotomètre AvaSpec1024 (Avantes, France), il est couplé à une lampe deutérium deep-UV. On utilise aussi l'OPO pour l'excitation à une longueur d'onde précise lorsque l'on veut observer la fluorescence. Sur la figure 1.20 on peut voir que le spectrophotomètre utilise un prisme qui projette le signal récolté en sortie de cuve sur une barrette de CCD de 2048 pixels. Le spectrophotomètre est aveugle pour des longueurs d'onde en dessous de 230 nm. L'injection sur la cuve en quartz contenant la solution se fait à l'aide d'une fibre de 600 μm de diamètre traitée pour l'UV. Une fibre du même type collecte la lumière en sortie de cuve, dans l'axe pour l'absorption et transversalement pour la fluorescence.

Ce dispositif permet d'avoir des informations sur les espèces présentes dans nos solutions, de comparer les spectres UV-Visible en solution avec ceux obtenus en phase gazeuse dans le piège.

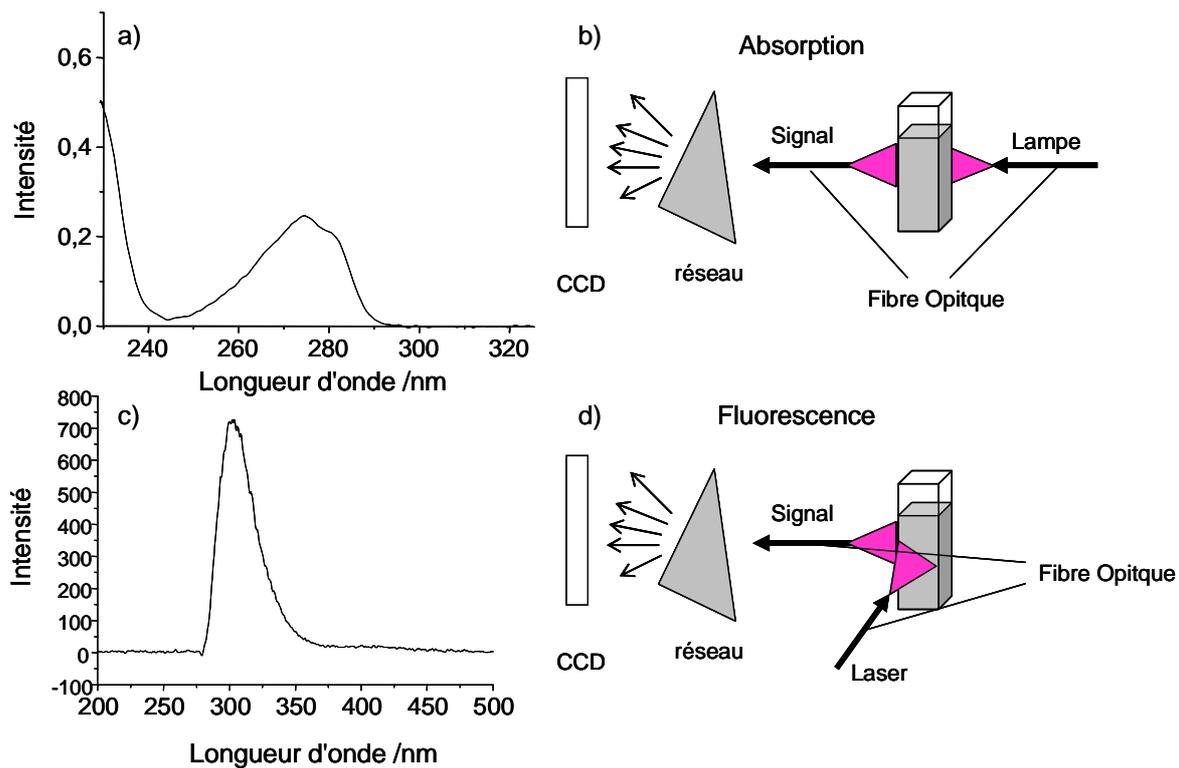


Figure 1.20 - Schémas et spectres du spectrophotomètre. b) schéma d'absorption, injection axial. a) spectre d'absorption de la tyrosine à pH 7 dans l'eau. d) schéma pour la fluorescence, injection transversale. c) spectre de fluorescence de la tyrosine à pH 7 dans l'eau excité avec le laser OPO à 280 nm.

Bibliographie

- [1] W. Paul, H. Steinwedel, A new spectrometer without a magnetic field, *Z. Naturforsch* **1953**, 8a.
- [2] Cole, J. Wiley & Son, inc, **1997**.
- [3] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, 2, 151.
- [4] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, C. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* **1989**, 246, 64.
- [5] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, Molecular Beams of Macroions, *The Journal of Chemical Physics* **1968**, 49, 2240.
- [6] R. J. Pfeifer, C. D. Hendricks, *AIAA J.* **1968**, 6.
- [7] D. P. H. Smith, *IEEE Trans. Ind. Appl.* **1986**, IA-22, 527.
- [8] T. C. Rohner, N. Lion, H. H. Girault, Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, 6, 3056.
- [9] I. Hayati, A. Bailey, T. F. Tadros, Investigations into the mechanism of electrohydrodynamic spraying of liquids : II. Mechanism of stable jet formation and electrical forces acting on a liquid cone, *Journal of Colloid and Interface Science* **1987**, 117, 222.
- [10] J. F. D. L. Mora, The effect of the charge emission from electrifield liquid cone, *J. Fluid Mech.* **1992**, 243, 561.
- [11] C. Bystorm, <http://www.ohsu.edu/proteomics/resources/techniques.cfm>.
- [12] J. V. Iribarne, B. A. Thomson, On the evaporation of small ions from charged droplets, *The Journal of Chemical Physics* **1976**, 64, 2287.
- [13] I. Szabo, New ion-optical devices utilizing oscillatory electric fields. I: Principle of operation and analytical theory of multipole device with two-dimensional electric fields, *Int. j. mass spectrom. ion process.* **1986**, 73, 197.

- [14] R. E. March, R. J. Hughes, *Quadrupole Storage Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York, **1989**.
- [15] P. S. Wong, R. G. Cooks, *Ion Trap Mass Spectrometry, Current Separation and Drug development* **1997**, 16.
- [16] F. G. Major, H. G. Dehmelt, Exchange-Collision Technique for the rf Spectroscopy of Stored Ions, *Physical Review* **1968**, 170, 91 LP
- [17] P. H. Dawson, *Quadrupole Mass Spectrometry and Its Application*, Elsevier, Amsterdam, **1976**.
- [18] J. H. Parks, S. Pollack, W. Hill, Cluster experiments in radio frequency Paul traps: Collisional relaxation and dissociation, *The Journal of Chemical Physics* **1994**, 101, 6666.
- [19] D. A. Dahl, SIMION 3D 7.0, *Scientific Instrument Service Inc., Boise Idaho* **2000**.
- [20] P. Dugourd, R. Antoine, M. Broyer, F. O. Talbot, **2006**, p. WO 2006/064132 A1.
- [21] R. Antoine, L. Joly, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, J. Lemoine, Photo-induced formation of radical anion peptides. Electron photodetachment dissociation experiments, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 21, 265.
- [22] T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, Facile formation of bare silver clusters in electrospray ionization multi-stage mass spectrometry, *European Physical Journal D* **2006**, 37, 237.

CHAPITRE II

PHOTODISSOCIATION D'ACIDES AMINEES ET DE POLYPEPTIDES

2.1	Protéines et fragmentations.....	56
2.1.1	Les protéines et acides aminés.....	56
2.1.2	Conformation des protéines.....	58
2.1.3	Propriété acido-basique.....	59
2.1.4	Propriété optique.....	60
2.1.5	La fragmentation des peptides.....	61
2.2	Photodissociaion du tryptophane protoné.....	67
2.2.1	L'expérience.....	67
2.2.2	Résultats expérimentaux.....	67
2.2.3	Discussion et interprétation.....	71
2.3	Peptides.....	76
2.3.1	Leucine enképhaline.....	76
2.3.2	Expérience MS ⁿ	80
2.3.3	Gramicidine A et phosphopeptides.....	83
2.3.4	Conclusion.....	90
2.4	Comparaison de différents type d'excitation : Pentapeptide du GDR.....	91
2.4.1	Expériences et peptide.....	91
2.4.2	Les résultats.....	92
2.4.3	Le modèle.....	96
2.4.4	Simulation et interprétation.....	97
2.5	Conclusion.....	100

CHAPITRE II

PHOTODISSOCIATION D'ACIDES AMINEES ET DE POLYPEPTIDES

Dans ce chapitre, les premiers résultats obtenus avec notre montage expérimental vont être présentés. Ce sont les premières études de photofragmentation de peptides en fonction de la longueur d'onde λ dans le domaine UV. Nous verrons que cette méthode de fragmentation permet de générer des fragments différents de ceux obtenus en CID (activation par collision : *Collision Induced Dissociation*) et que cette fragmentation peut dépendre de la longueur d'onde. Après une introduction sur les acides aminés, les peptides et les protéines, ainsi que sur leurs schémas de fragmentation, nous discuterons des résultats obtenus sur le tryptophane. Ensuite, nous aborderons des systèmes un peu plus complexes tel que des peptides de tailles et de séquences variées. L'objectif de nos recherches est d'aboutir à des informations structurales sur des molécules biologiques et plus particulièrement sur des protéines. L'une des questions ouvertes est notamment de savoir si la dynamique de fragmentation dépend de la conformation de l'ion et si l'étude des différentes voies de fragmentation peut donc permettre de remonter à cette conformation comme illustré récemment par Zubarev pour différencier les structures zwitterioniques des structures neutres.^[1]

2.1 Protéines et fragmentations

2.1.1 Les protéines et acides aminés

Les protéines sont des éléments fondamentaux du vivant que l'on trouve dans les organismes cellulaires à tous les niveaux. Leurs activités biologiques sont essentielles et diversifiées. Par exemple, l'hémoglobine permet le transport de l'oxygène, l'insuline régule le taux de sucre, les immunoglobulines permettent la reconnaissance de corps étrangers, et le collagène a un rôle structurel dans les os. Les différentes fonctions sont directement reliées à leur organisation géométrique.

Une protéine est composée d'un ensemble de chaînes polypeptidiques qui sont elles-mêmes formées d'un nombre précis d'acides aminés organisés en une séquence bien déterminée. L'information donnant cette séquence est contenue dans le code génétique : l'ADN.

Les acides aminés naturels (AA) qui constituent l'unité structurale des protéines sont au nombre de 20 et sont notés sous forme de deux nomenclatures (voir annexe II) : à trois lettres ou à une lettre majuscule. Certains peuvent être produit par l'organisme, et d'autres non, ils sont dits « essentiels ». Comme on peut le voir sur la figure 2.1, ils possèdent une structure de base formée d'un squelette carboné associé à deux fonctions : une fonction amine ($-\text{NH}_2$) et une fonction carboxylique ($-\text{COOH}$). La proline est une exception. Une fonction organique propre à chaque AA est attachée sur le carbone α . Cette fonction donne les propriétés physico-chimiques de chaque AA comme l'acidité, l'hydrophobie, l'absorption optique. Pour les formules des AAs, on pourra se reporter à l'annexe II.

Pour former des chaînes polypeptidiques, les acides aminés se lient entre eux par des liaisons peptidiques. Cette liaison se forme entre le groupement carboxylique ($-\text{COOH}$) et le groupement amine ($-\text{NH}_2$) comme le montre la réaction d'hydrolyse de la figure 2.2. On nomme la partie gauche de la séquence se terminant par le NH_2 , le côté *N-terminal* et l'autre extrémité de la chaîne correspondant au COOH , le côté *C-terminal* (cf. figure 2.2).

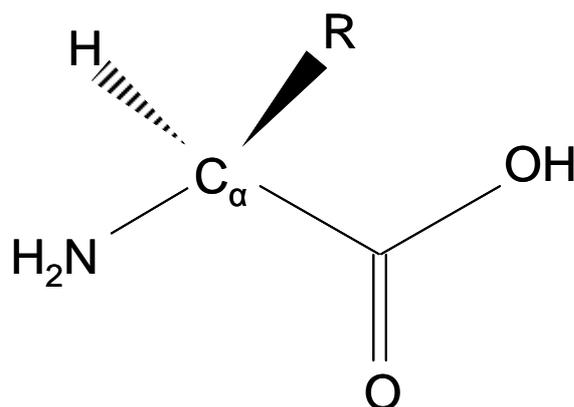


Figure 2.1 - Structure de base des acides aminés. Un atome de carbone central avec deux fonctions : une fonction carboxylique (-COOH) et une fonction amide (-NH₂). La lettre R représente la fonction propre à chaque acide aminé.

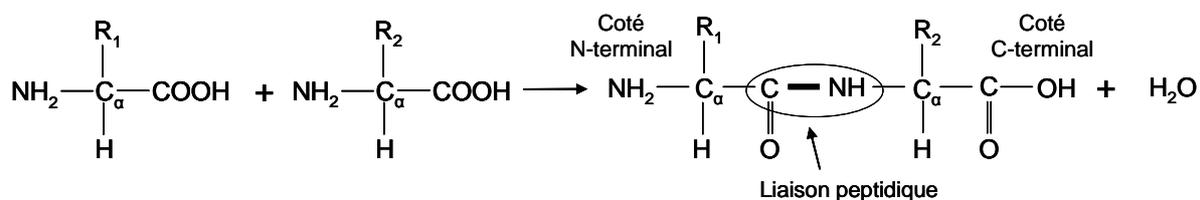


Figure 2.2 - Formation d'un dipeptide par hydrolyse libérant une molécule d'eau. La liaison peptidique entre deux acides aminés est représentée en gras.

2.1.2 Conformation des protéines

Les protéines tirent leurs fonctions biologiques de leurs organisations spatiales. On définit quatre niveaux de structure dans l'architecture des protéines. Elles sont représentées sur la figure 2.3.

La structure primaire est la séquence d'acides aminés constituant la protéine (cf. figure 2.3 a)). Par exemple le collagène est formé d'une séquence avec un motif particulier composé de deux prolines et une glycine PPG-PPG-PPG...etc.

Les structures secondaires sont les motifs que forment certains blocs de la protéine. On rencontre principalement, l'hélice α et le feuillet β qui sont représentés sur les figures 2.3 a) et b). Ces structures sont stabilisées par des liaisons hydrogènes entre un -CO et un -NH d'acides aminés différents.

Les structures tertiaires se rapportent à l'assemblage des différentes structures secondaires (cf. figure 2.3 c)).

Lorsqu'une protéine possède plusieurs massifs peptidiques, on parle de structure quaternaire. Par exemple sur la figure 2.3 d), l'hémoglobine est constituée de deux massifs α (chaîne α_1 et α_2) et deux massifs β (chaîne β_1 et β_2).

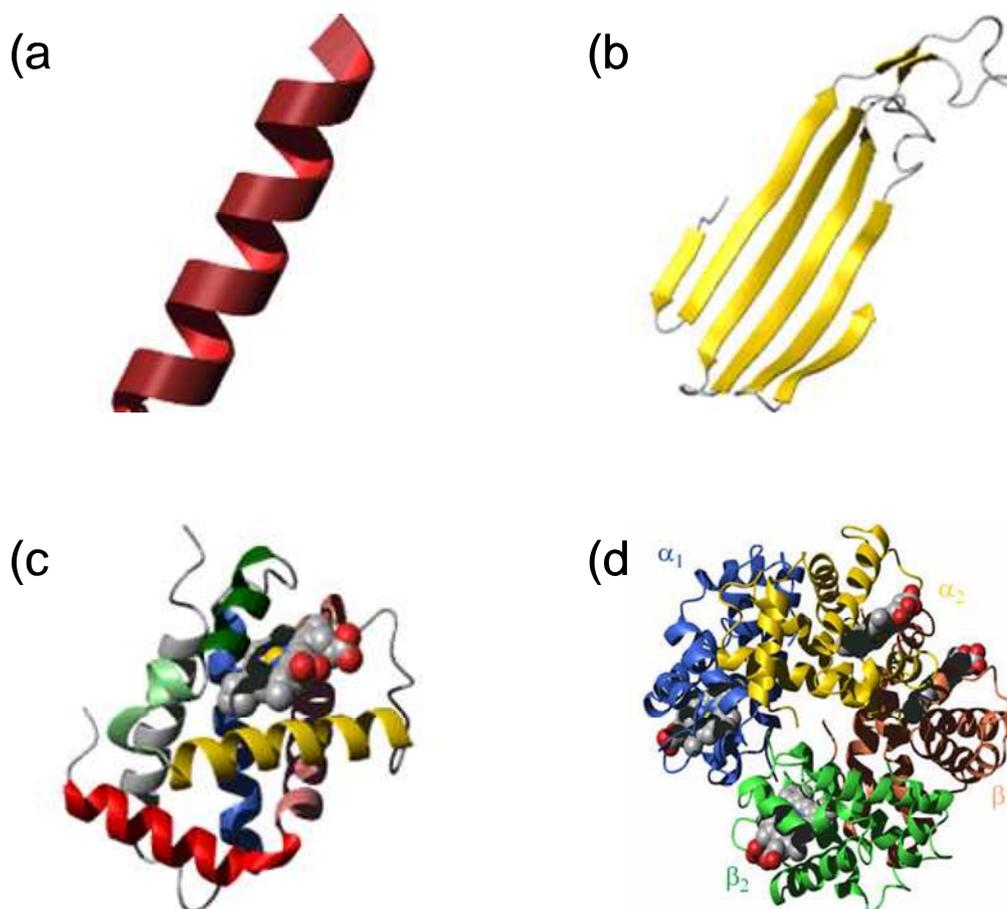


Figure 2.3 - Conformations de protéine. Structures secondaires a) hélice α extrait d'une globine beta humaine, b) feuillet β extrait d'un pore membranaire, la porine. Structure tertiaire c) globine bêta de l'hémoglobine humaine composée de 8 hélices. Structure quaternaire d) hémoglobine composé de 2 chaînes α et 2 chaînes β .

2.1.3 Propriété acido-basique

Les propriétés acido-basiques des AAs sont particulièrement intéressantes dans notre cas puisqu'elles déterminent les sites préférentiels pour la position des charges. Nos études portent sur des espèces chargées. Notre observable sera la fragmentation suite à une excitation énergétique. Les modèles de fragmentation font intervenir la charge. Dans le cadre de cette

thèse, les études ont principalement été effectuées sur des espèces chargées positivement. Dans cette situation les charges sont portées par des sites accepteurs de protons, des sites basiques. On trouve un site basique au début de chaque chaîne peptidique, côté N-terminal. Ensuite trois AAs possèdent un groupe fonctionnel basique sous la forme NH_2 , il s'agit de la lysine (Lys, K) de l'histidine (His, H) et l'arginine (Arg, R). On peut trouver dans l'annexe II, les valeurs des pKas des différents acides aminés et de leurs différents groupements chimiques.

2.1.4 Propriété optique

Les acides aminés ayant des groupes fonctionnels aromatiques possèdent des propriétés optiques marquées, à la fois en absorption et en fluorescence. Ce groupe réunit trois acides aminés : la phenylalanine (phe, F) ayant un groupe phenyl, la tyrosine (tyr, Y) ayant un groupe phénolique et le tryptophane (trp, W) avec, comme chaîne latérale, l'indole. Ces groupes ont la propriété d'absorber les radiations dans le proche UV. Cette propriété vient des groupes aromatiques dont les électrons, formant des liaisons π , sont fortement délocalisés. Dans le tableau 2.1, on trouve les caractéristiques spectroscopiques des acides aminés aromatiques, en absorption et en fluorescence.

L'absorption d'une radiation par un chromophore va dépendre de la longueur d'onde λ , de la nature du chromophore et de son environnement. On retrouve sur la figure 2.4 a) les spectres d'absorption pour les trois AAs aromatiques dans l'eau à pH 7. On a aussi les spectres de fluorescence (figure 2.4 b)). Chaque acide aminé est excité à une longueur d'onde différente afin de bien couvrir la zone de fluorescence correspondante tout en gardant une bonne absorption.

	Absorption		Fluorescence	
	λ_{\max} (nm)	Coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	Rendement quantique à λ_{\max}
Phénylalanine	257.4	197	282	0.04
Tyrosine	274.6	1420	303	0.21
Tryptophane	279.8	5600	348	0.20

Tableau 2.1 - Valeurs caractéristiques des propriétés spectroscopiques des acides aminés dans une solution aqueuse à $pH = 7$.^[2]

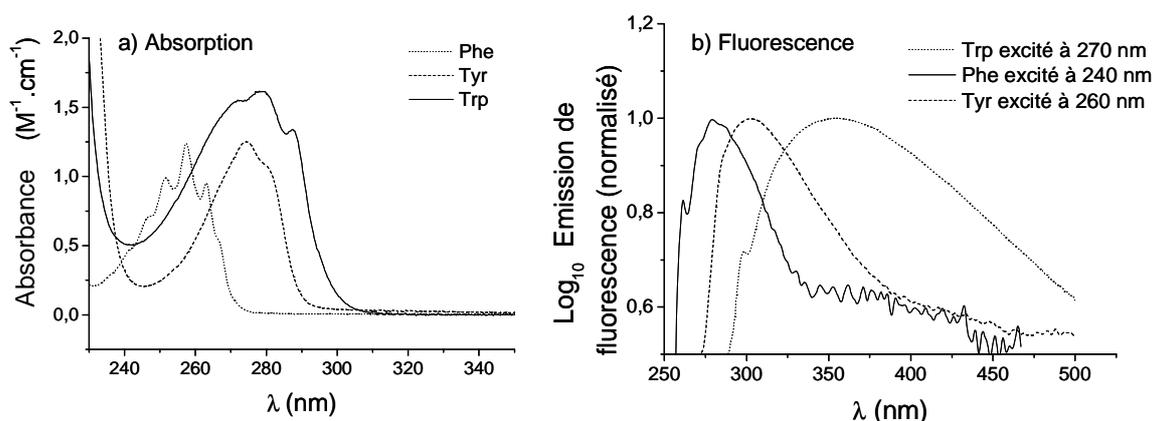


Figure 2.4 - Spectres optiques en solution (eau/méthanol à $pH 7$) des acides aminés aromatiques, phénylalanine, tyrosine, tryptophane. a) Absorption et b) fluorescence.^[3]

2.1.5 La fragmentation des peptides

Les techniques d'analyses par fragmentation permettent d'obtenir une information structurale sur la molécule, sur la séquence ainsi que sur son organisation spatiale. Des informations plus fondamentales sur la fragmentation permettent de comprendre les mécanismes de redistribution de l'énergie au sein d'une molécule suite à une excitation

électronique ou vibrationnelle. Il existe de multiples méthodes d'activation aboutissant à la fragmentation des peptides par des mécanismes différents.

2.1.5.1 Les types de fragmentation

Les peptides se fragmentent suivant des schémas bien définis dont la nomenclature utilisée à l'heure actuelle fut introduite par Papayannopoulos.^[4] Parmi les différents types de fragments, la fragmentation la plus classique et la plus informative au niveau structurel est celle de la chaîne peptidique. La figure 2.5 présente les fragmentations possibles. On peut fragmenter la liaison peptidique ainsi que les deux liaisons adjacentes. Les fragments obtenus se répartissent en deux groupes : les fragments du côté N-terminal a, b, c et les fragments associés x, y, z coté C-terminal (cf. figure 2.5). Lorsque l'ion ne possède qu'une charge, on obtient un fragment neutre non détecté et un fragment chargé. Si l'ion est multichargé, on peut observer les deux fragments associés à condition que les charges soient réparties de part et d'autre de la rupture. Des réarrangements importants s'effectuent pendant et après la fragmentation^[5] comme nous pouvons le voir dans l'annexe II sur figure 2.2.

Un autre type de fragment souvent observé est la perte de neutres. Ce sont principalement des pertes de NH₃ et de H₂O provenant du N-terminal (NH₃) et du C-terminal (COOH). Ces pertes peuvent également provenir des groupes fonctionnels tel que des pertes de NH₃ au niveau des amines (Lys, Arg...) ou de H₂O au niveau des alcools (Ser, Thr). De plus les fragmentations peuvent se combiner par exemple b₄-NH₃.^[5]

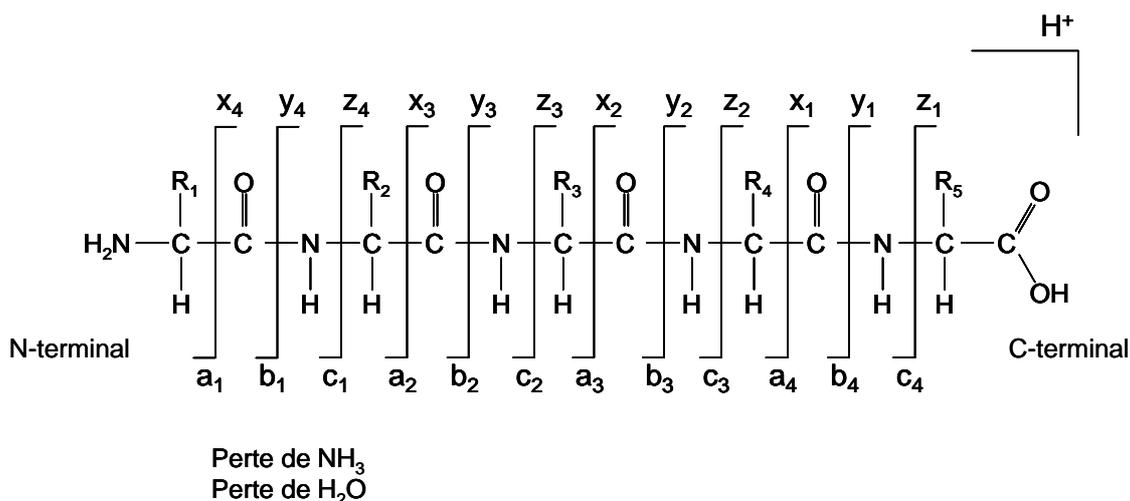


Figure 2.5 - Schéma de fragmentation des peptides.^[4]

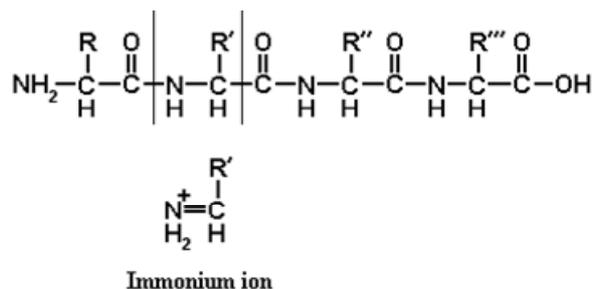


Figure 2.6 - Schéma d'un ion immonium. Cet ion ne possède qu'une seule chaîne latérale.

Lorsqu'il y a fragmentation sur deux liaisons du squelette peptidique, on parle de fragment interne. Parmi ces fragments internes, l'ion immonium tient une place importante. Il ne possède en effet qu'un seul groupe fonctionnel et permet d'identifier la présence d'un acide aminé dans la chaîne (cf. figure 2.6).

La fragmentation des chaînes latérales est observée dans des cas particuliers dont nous verrons des exemples par la suite.

Les différents types de fragments que l'on vient de présenter vont apparaître ou non avec plus ou moins d'abondance selon la méthode d'activation choisie.

2.1.5.2 Fragmentation par chauffage

La méthode d'activation la plus utilisée est la CID (Collision Induced Dissociation) ou CAD (Collision Activated Dissociation). Les principaux fragments obtenus par collision à basse énergie sont les ions b, y, a (cf. figure 2.5) et les pertes de neutre $-\text{NH}_3$, $-\text{H}_2\text{O}$. L'apparition de ces fragments ne nécessite pas beaucoup d'énergie (de l'ordre de quelques eV (1-5 eV)). D'ailleurs, on peut facilement les retrouver lors de la fragmentation en source produite lors du processus d'electrospray.

L'énergie est transmise à l'ion par de multiples collisions sur un gaz neutre comme l'hélium. Chaque collision apporte une faible quantité d'énergie qui se redistribue de manière statistique sur l'ensemble des degrés de liberté de l'ion, cela revient à un chauffage vibrationnel de l'ion. On chauffe l'ion progressivement en le sondant énergétiquement par le fond du puit de potentiel dans l'état fondamental. De cette manière, on accède aux fragmentations les plus faibles en énergie (cf. figure 2.7 a)). La fragmentation n'est pas spécifique. Elle est plutôt statistique.

Un modèle sur les mécanismes de fragmentation en CID met en évidence l'importance de la charge (H^+) et de sa localisation. Dans ce modèle, appelé modèle du proton mobile^[6], la redistribution de l'énergie dans les différents modes permet à la charge de se déplacer le long de la chaîne peptidique sur les différents sites basiques (NH) ce qui a pour effet de fragiliser les liaisons environnantes comme on le voit sur la figure 2.7 b). Après fragilisation de la liaison une réorganisation complexe permet d'aboutir aux fragments. La fragmentation en CID se produit dans l'état fondamental.

D'autres méthodes d'activation permettent de chauffer statistiquement l'ion. En IRMPD (Infrared Resonance Multiple Photon Dissociation)^[7], des photons infrarouges de faible énergie ($10.6 \mu m$, $0.12 eV$) fournis par un laser à CO_2 ou une source accordable (laser OPO ou laser à électron libre), vont chauffer la molécule par absorption multiphotonique. Le même type de fragmentation qu'en CID est obtenu. Dans le BIRD (Blackbody Irradiation Resonance Dissociation)^[8], la situation est similaire à l'IRMPD. La molécule est chauffée par des photons énergétiquement faibles, issus du rayonnement du corps noir. Par exemple, cette technique peut être utilisée pour étudier les liaisons faibles entre solvants et biomolécules. Actuellement c'est la seule méthode qui permet de travailler à température parfaitement définie, mais elle nécessite des temps d'activation longs pour atteindre l'équilibre thermodynamique. Les pièges de type FTICR, permettant de conserver pendant un temps long les ions (de quelques millisecondes à plusieurs minutes) ont grandement contribué au développement et à l'utilisation de la techniques BIRD.^[9]

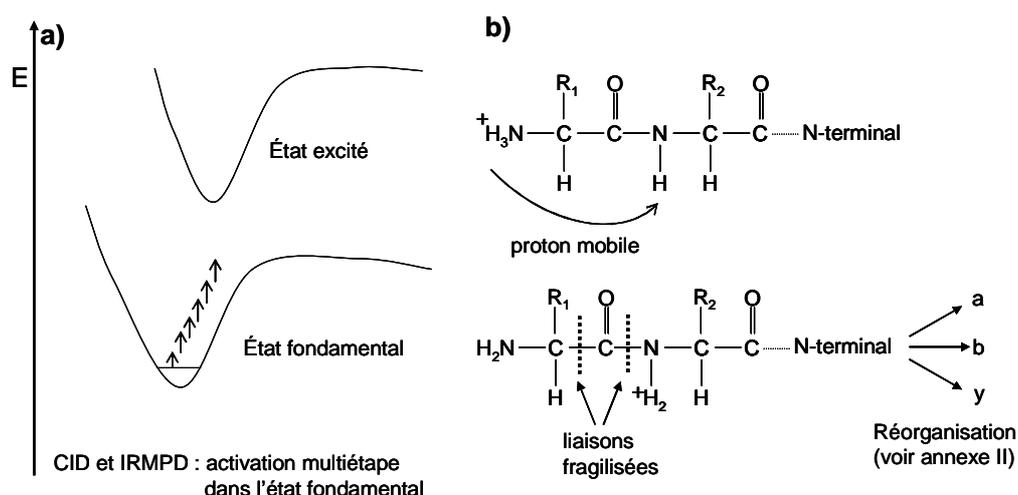


Figure 2.7 - Fragmentation par chauffage CID, IRMPD. a) schématisation du dépôt d'énergie par chauffage vibrationnel dans l'état fondamental. b) schéma de principe du modèle du proton mobile pour la fragmentation d'un peptide.

2.1.5.3 Fragmentation par excitation électronique

L'excitation électronique d'une molécule permet de déposer en une seule étape sur un site particulier une quantité d'énergie définie. L'ion pourra se fragmenter directement dans l'état excité (via des états dissociatifs) ou dans l'état fondamental après conversion de l'énergie électronique en énergie vibrationnel (IC, *Internal Conversion*). La dissociation dans un état électronique excité sera très rapide. Après conversion interne de l'énergie, la dissociation dans l'état fondamental pourra avoir lieu rapidement avant une redistribution vibrationnelle de l'énergie interne (IVR, *Intramolecular Vibrational Redistribution*), ou plus lentement après l'IVR. A la différence de l'activation par chauffage, l'excitation électronique permet de sonder énergétiquement la molécule par le haut en injectant une quantité d'énergie plus importante (1-10 eV) en une seule étape et surtout localisée sur un site particulier de la molécule. Les deux méthodes les plus connues pour l'excitation électronique sur des ions positifs sont l'ECD (*Electron Capture Dissociation*) et l'UVPD (*Ultra Violet PhotoDissociation*). L'UVPD conduit à une excitation électronique de l'ion. L'ECD conduit après capture électronique à un ion radicalaire de charge différente. Pour les ions négatifs des techniques similaires existent comme l'EDD (*Electron Detachment Dissociation*)^[10], ETD (*Electron Transfert Dissociation*)^[11], et l'EPD (*Electron PhotoDetachment Dissociation*)^[12]

ECD (*Electron Capture Dissociation*). En ECD, une des charges positives (sous forme de proton) est neutralisée par un électron thermique.^[13, 14] L'un des mécanismes proposé pour expliquer l'ECD est montré sur la figure 2.8. La capture conduit à une structure hypervalente du $-N^+H_3$ et libère un hydrogène qui vient se fixer sur le carbonyle de la chaîne peptidique la plus proche et produit une forme radicalaire. Ce radical cation conduit à la rupture de la liaison N-C $_{\alpha}$ produisant un fragment c et un fragment radicalaire z \cdot . Les espèces détectées dépendront du nombre et de la position des charges. Cette réaction est plus rapide que la redistribution interne d'énergie dans le système. Ce processus est dit « non ergodique ».^[13] Par cette propriété, l'ECD permet de conserver certaines liaisons faibles notamment les liaisons hydrogènes responsables des structures secondaires ou tertiaires^[15], tout en cassant des liaisons plus dures. Des informations sur le repliement et le dépliement des protéines ont pu ainsi être obtenues par ECD.^[16, 17] De récentes études sur les mécanismes d'ECD proposées par Simons et coll.^[18, 19] viennent améliorer la compréhension de l'ECD et de l'ETD.

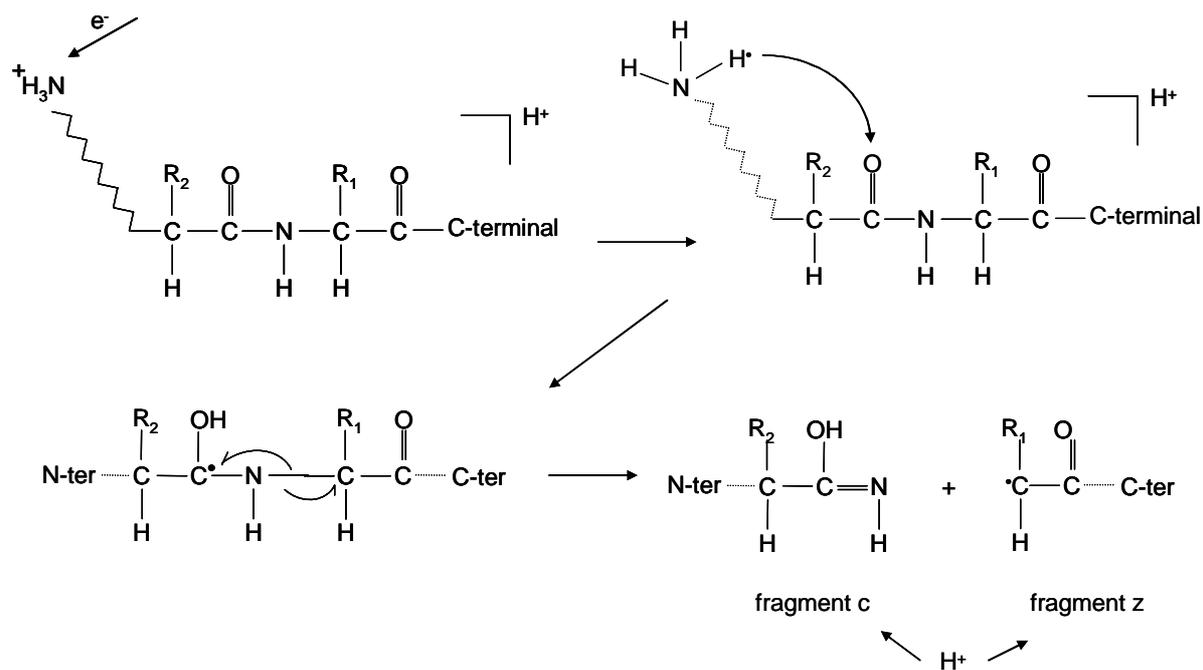


Figure 2.8 - ECD. Mécanisme de formation des fragments c et z par une réaction radicalaire proposé par Turecek.^[20]

UVPD (UltraViolet PhotoDissociation). Dans la photodissociation induite par laser ultra violet, l'absorption d'un photon UV conduit une excitation électronique des électrons délocalisés du peptide. Ce mécanisme est différent de l'IRMPD où des photons de faible énergie excitent des niveaux vibrationnels (chauffage). Parmi les premières expériences de photodissociation réalisées sur les peptides, on peut citer Bowers et McLafferty^[21, 22] qui ont utilisé des lasers de type excimer à 193 nm et 157 nm. A ces longueurs d'ondes, la plupart des électrons des liaisons π peuvent être excités, en particulier les doubles liaisons π de CO. La fragmentation obtenue est alors très importante et peu spécifique.

Par la suite, l'utilisation d'un laser à 266 nm a permis d'obtenir une excitation plus spécifique des électrons π dans cycles aromatiques des acides aminés.^[23-25] La réponse associée à cette excitation conduit soit à une dissociation, soit une émission radiative (fluorescence). Les durées de vie des états électroniques excités sont de l'ordre de quelques centaines de femtosecondes à quelques picosecondes.^[26, 27] Nous porterons notre attention sur la dissociation où nous distinguerons deux types de fragments. Des fragments similaires à ceux observés en CID obtenus après redistribution de l'énergie, et des fragments spécifiques non observés par CID provenant d'une dissociation rapide avant IVR, en particulier dans un état électronique excité.

Le couplage d'un spectromètre de masse et d'un laser accordable en longueur d'onde permet de mesurer des spectres de photodissociation à différentes longueurs d'onde.^[25, 28]

Dans le prochain paragraphe, je présenterai les résultats obtenus sur la photodissociation d'un système modèle, l'acide aminé tryptophane protoné (Trp, W). Nous verrons les schémas spécifiques de photodissociation dans un premier temps, puis le spectre de photodissociation en fonction de la longueur d'onde. Par la suite, je présenterai des résultats sur des peptides et des systèmes plus complexes.

2.2 Photodissociation du tryptophane protoné

2.2.1 L'expérience

Le tryptophane utilisé est sous forme de poudre et provient de la société Sigma Aldrich (France). La poudre est diluée sans purification supplémentaire dans un mélange eau/méthanol 50/50 (v/v) à une concentration de 100 μ M. L'eau a été purifiée par un purificateur Milli-Q (Millipore, France) et le méthanol de qualité analytique provient de Prolabo (France). 3% en volume d'acide acétique ont été ajoutés à la solution.

2.2.2 Résultats expérimentaux

Spectre de masse de photodissociation. Sur la figure 2.9, on observe des spectres de masse du tryptophane protoné ($[\text{TrpH}]^+$), en CID (a) et en UVPD (b, c, d). On utilise le laser OPO pour réaliser la photodissociation à plusieurs longueurs d'onde. La figure 2.9 a) montre que le tryptophane ne présente qu'un seul fragment en CID. Il s'agit du fragment de masse m/z 188 qui correspond à la perte du neutre NH_3 (-17). Sur les figures 2.9 b), c) et d), on observe des spectres de photodissociation du tryptophane irradié à 285 nm, à 265 nm et à 220 nm à une fréquence de 20 Hz pendant 1 s (20 pulses laser). Les fragments produits sont plus nombreux qu'en CID.

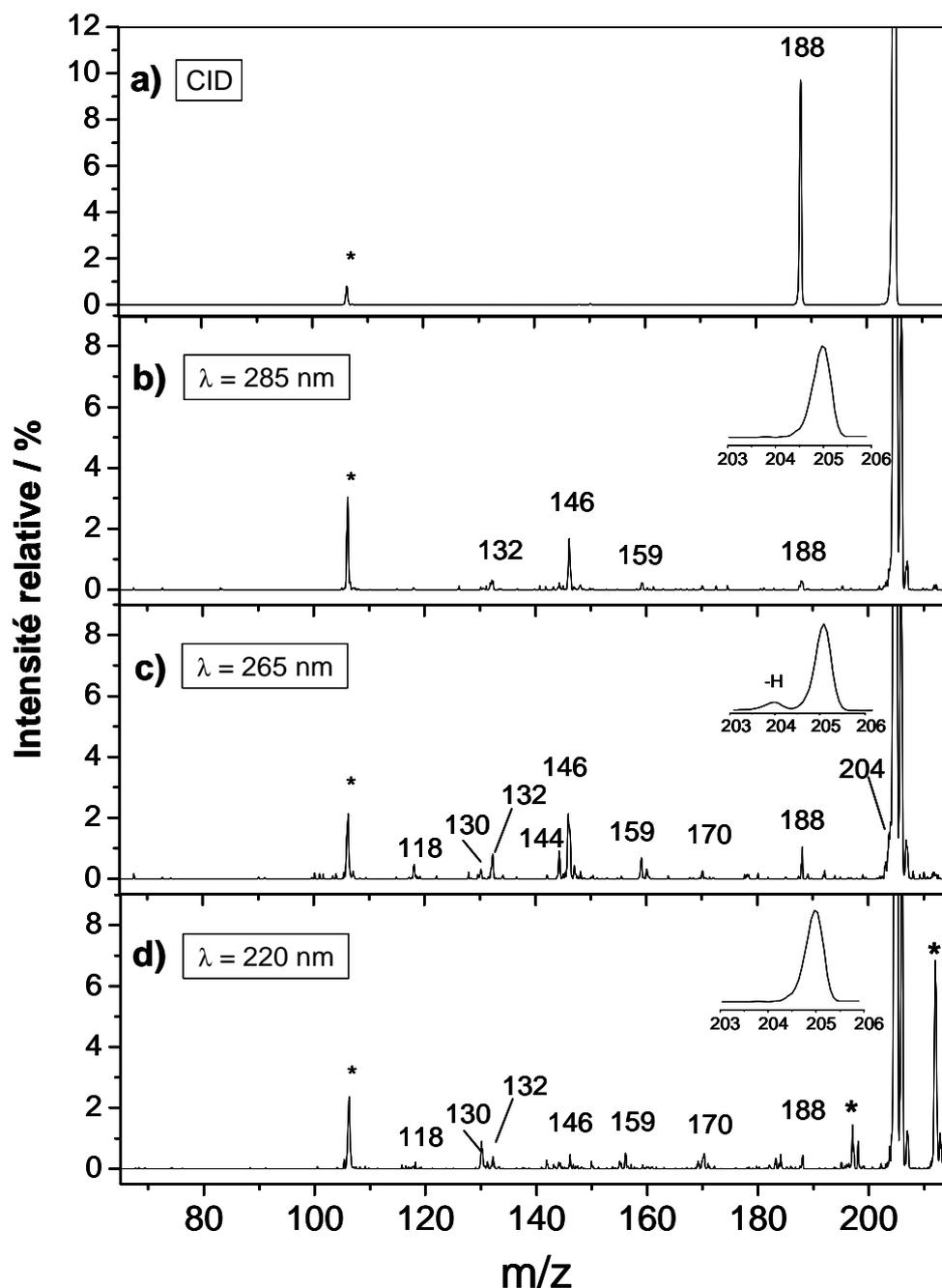


Figure 2.9 - Spectre de masse du tryptophane protoné à m/z 205, $[\text{TrpH}]^+$. a) CID à 15 % pendant 30ms, UVPD pendant 1 s avec le laser OPO à 20 Hz ($\approx 100 \mu\text{J}/\text{pulse}$), b) $\lambda = 285 \text{ nm}$, c) $\lambda = 265 \text{ nm}$, d) $\lambda = 220 \text{ nm}$. En insert les zooms scans du parent à m/z 205 montrent la perte de H à 265 nm uniquement. Les pics parasites sont notés par des astérisques.

Le spectre à 285 nm présente plusieurs fragments supplémentaires par rapport à la CID dont deux principaux, le 159 et le 146. Le fragment m/z 159 vient de la perte d'un CO (-28) et d'un H₂O (-18), le fragment m/z 146 correspond à une fragmentation complexe avec des réarrangements.^[29] L'UVPD à 265 nm (cf. figure 2.9 c)) montre d'une part des fragments similaires avec des augmentations d'intensité, par exemple le fragment m/z 132 qui provient d'un détachement de la chaîne latérale avec conservation de la charge sur l'indole. Mais aussi des fragments nouveaux, tels que le 170, le 144, le 130, et le 118. Le point caractéristique à cette longueur d'onde est la perte d'un atome d'hydrogène donnant le tryptophane chargé déprotoné à m/z 204. A 220 nm, on obtient les mêmes fragments avec des intensités différentes hormis la perte de H qui n'est pas observée. On peut remarquer un changement de rapport d'intensité entre 130 et 132 par rapport à 265 nm. Sur ces trois spectres (cf. figure 2.9 b), c), d)), on constate que la longueur d'onde joue un rôle déterminant sur la fragmentation. La perte de H est très fortement dépendante de la longueur d'onde utilisée, d'autres fragments sont favorisés à certaines énergies de photon, 130 à 220 nm, 132, 144, 170, 188 à 265 nm. Le pic à m/z 106, observé sur les trois spectres, est une pollution. Il a disparu avec le temps et l'utilisation du piège.

Photofragmentation multi-étage : expérience MSⁿ. Notre montage permet de réaliser l'expérience MSⁿ, consistant dans une première étape (MS²) à isoler le parent puis à le fragmenter. Dans une seconde étape (MS³), on isole l'un des fragments obtenus lors de la première étape et on le fragmente à son tour. Cette technique permet de remonter aux mécanismes successifs de fragmentation. L'activation est assurée par le laser kilohertz réglé à 3 kHz afin d'améliorer l'efficacité de dissociation par un plus grand nombre de pulses laser tout en diminuant la durée de piégeage. En contrepartie nous n'avons accès qu'à une seule longueur d'onde à 262 nm et l'irradiation laser est de 300 ms à chaque étape. Les résultats sont reportés dans la figure 2.10.

On observe, par exemple, une relation de parenté entre les fragments 188, 146 et 118. Le fragment 159 semble issu exclusivement du tryptophane protoné, alors que le fragment 130 provient du tryptophane radicalaire Trp^{•+}. A partir de ces informations et en s'appuyant sur les résultats présentés par Siu^[27, 29] nous avons proposé les structures montrées sur la figure 2.10.

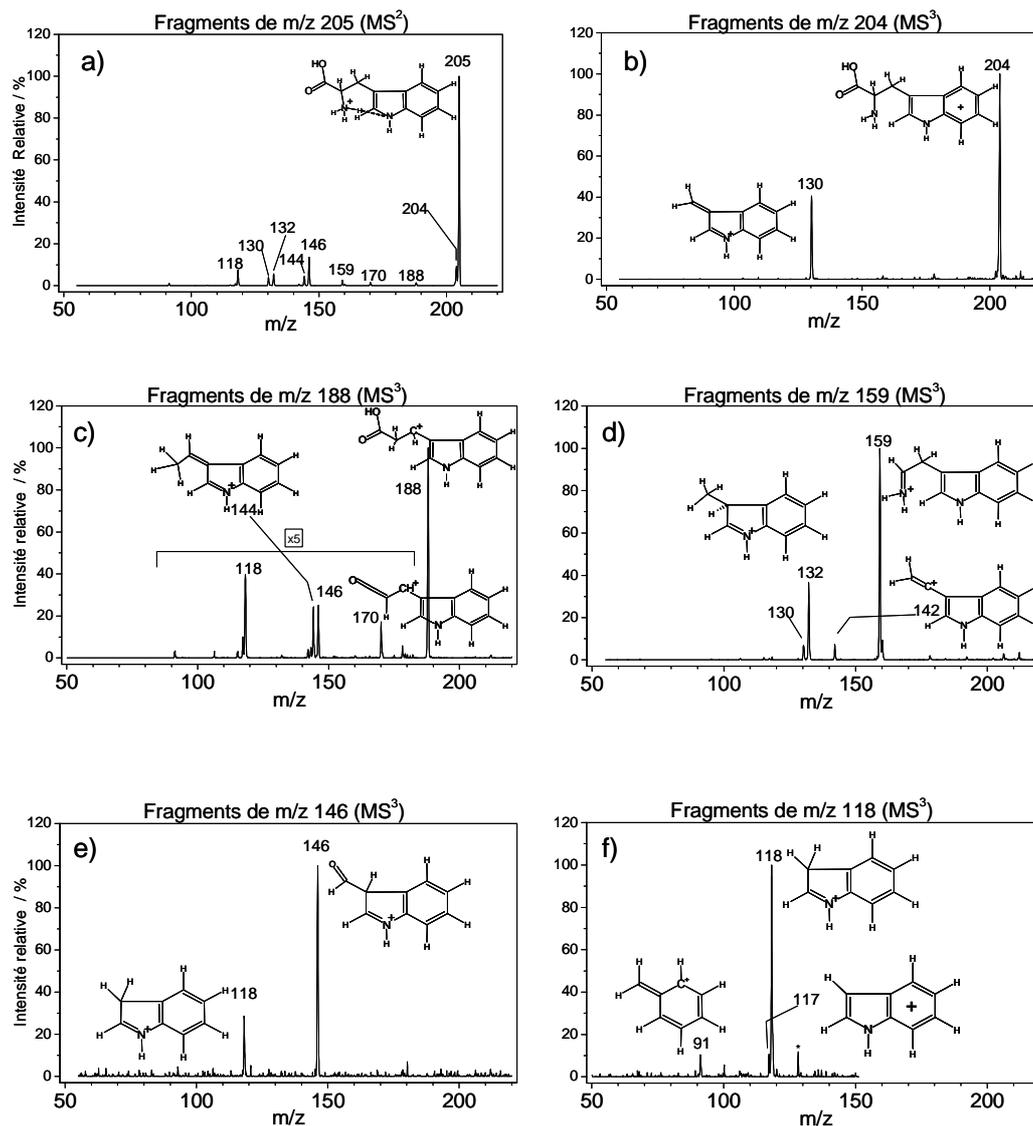


Figure 2.10 - Spectres MS^3 de photodissociation de différents fragments issus de la fragmentation du tryptophane. a) MS^2 UVPD du tryptophane à 262 nm pendant 300ms et b) à f) UVPD des fragments de masse m/z 204, 188, 159, 146, 118 à 262 nm pendant 300ms avec le laser KHz.

A partir des informations de la figure 2.10, on peut en déduire un schéma de génération des fragments comme on le montre sur la figure 2.11. On distingue trois voies principales de fragmentation. Les deux premières voies sont directes et correspondent aux fragments 204 et 130. Le fragment 204 peut aussi se dissocier vers le fragment 130, ces voies sont spécifiques à l'UVPD et ne sont pas observées en CID par Sui et *al.*^[29]. L'autre voie est moins « directe », la fragmentation vient après un réarrangement énergétique et les fragments ont été observés par Sui en CID à haute énergie (avec une collision unique). Les mécanismes de ces deux voies vont être discutés dans le prochain paragraphe.

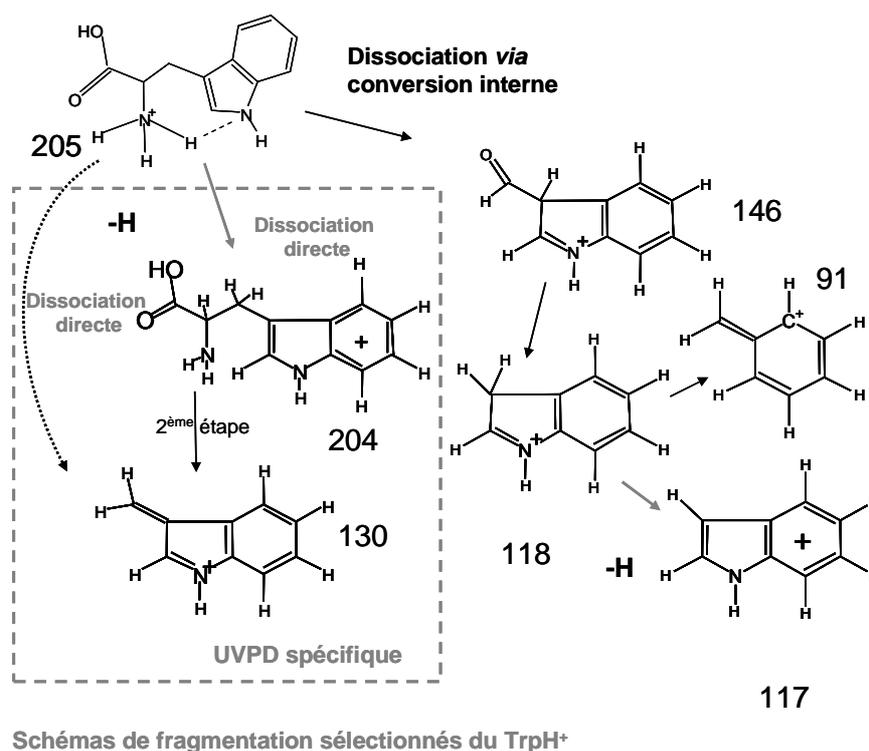


Figure 2.11 - Schéma de fragmentation des voies spécifiques en UVPD, proposé pour le tryptophane protoné après irradiation à 262 nm.

Des expériences de détection en coïncidence d'ions et de neutres réalisées par Lepere et *al.*^[30] confirme bien le schéma de la figure 2.11. En particulier la double origine du fragment 130, qui est issue d'une dissociation directe et rapide à partir du 205, et par un second mécanisme à partir du fragment 204 qui est plus lent. On note de plus que sur ces expériences, un seul pulse laser est utilisé ce qui est en faveur d'un processus mono photonique.

2.2.3 Discussion et interprétation

Suite à l'absorption d'un photon, les électrons délocalisés $\pi\pi$ de l'indole dans l'état fondamental S_0 , vont passer dans l'état électronique excité $\pi\pi^* S_1$ (cf. figure 2.12). Il va s'ensuivre des mécanismes distincts qui rentrent en compétition et sont représentés sur la figure 2.11. Il y a d'une part, des dissociations directes et d'autre part, des dissociations faisant suite à une redistribution interne d'énergie (IVR) après conversion interne. La figure 2.12 résume d'un point de vue schématique deux des mécanismes qui vont être exposés.

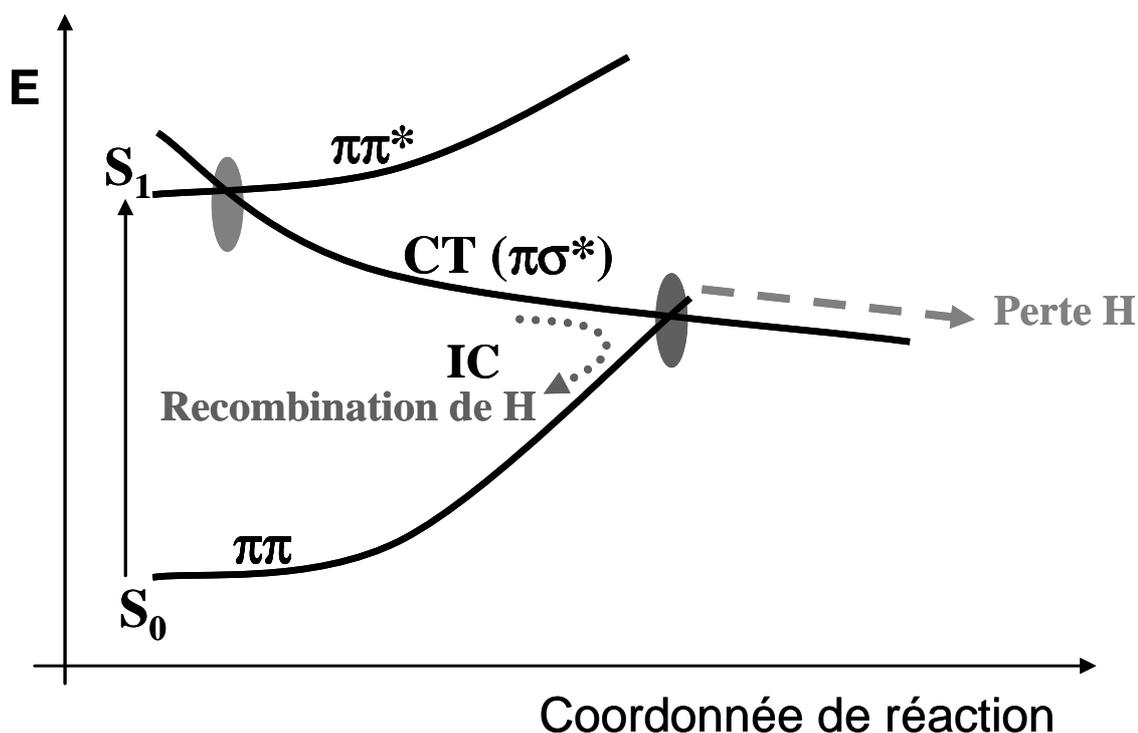


Figure 2.12 - Représentation des énergies potentielles des électrons π de l'indole dans l'état fondamental S_0 , dans l'état excité S_1 (électrons $\pi\pi^*$) et dans l'état dissociatif $\pi\sigma^*$. Les zones grisées correspondent aux intersections coniques et permettent de passer vers un état à transfert de charge (CT) et de basculer sur la voie de conversion interne ou vers la perte de H. Ce schéma est issu du modèle proposé par Jouvét et al.^[24, 31]

Dissociation directe, perte de H. Pour la perte de H ($m/z = 204$) qui est spécifique à l'UVPD, un modèle est proposé par Jouvét et al.^[24] s'appuyant sur une dissociation directe (cf. figure 2.12). Cette dissociation est due au croisement de l'état électronique $\pi\pi^*$ avec l'état dissociatif $\pi\sigma^*$ et à un transfert de charge. La dynamique de cette réaction a été étudiée par une expérience pompe sonde par laser femtoseconde.^[27] Une structure du fragment m/z 204 est donnée sur la figure 2.11 où la charge est localisée sur l'indole. Cette structure est obtenue après un transfert de charge de l'indole vers le NH_3^+ qui, devenant hypervalent, peut libérer un H. Ce modèle suggère que le transfert soit favorisé par la proximité de l'indole et du NH_3^+ . A 265 nm, le fragment 204 est très intense, cette longueur d'onde est centrée dans la bande d'absorption du tryptophane et principalement gouvernée par la transition S_0 - S_1 .^[32] Les transitions $\pi\pi^*$ et $\pi\sigma^*$ sont fortement présentes dans cette zone, ce qui est en faveur du modèle proposé. Dans le cadre de ce modèle, l'absence de perte d'hydrogène à 285 nm semble indiquer qu'à cette longueur d'onde, on se situe en dessous du croisement $\pi\pi^*$ $\pi\sigma^*$.^[24] Un autre fragment présente aussi une perte de H. Il s'agit du 118.

Le fragment m/z 130. Ce fragment présente un intérêt particulier, c'est un fragment spécifiquement observé après excitation photonique, comme la perte de H. Il correspond à la rupture de la liaison $C_\alpha-C_\beta$ (chaîne latérale) comme on le voit sur la figure 2.13. Son rapport de branchement dépend fortement de la longueur d'onde. Un point particulier est à souligner, le 130 apparaît à 265 nm avec le 204, et il est maximum à 220 nm où le 204 n'est plus présent. Les spectres MS^3 de la figure 2.10 montre que le 130 est le seul fragment du 204 à 262 nm. Comme nous l'avons déjà dit, ces observations suggèrent que la formation du 130 se produit suivant deux mécanismes, un mécanisme direct à partir du tryptophane protoné (m/z 205) à 220 nm et un mécanisme indirect *via* le 204, le tryptophane radicalaire. Nos résultats ne permettent pas d'aller plus loin dans l'étude du processus.

De récents résultats théoriques et expérimentaux apportent de nouvelles informations sur cette rupture $C_\alpha-C_\beta$. Les résultats expérimentaux de Lepère *et al.*^[30] confirment bien la présence de deux processus pour la formation du fragment 130. Un processus direct et rapide (< 400 fs) à partir du m/z 205 est en compétition avec un processus indirect où la rupture de la liaison $C_\alpha-C_\beta$ se produit à partir du tryptophane radicalaire de manière plus lente (>1 ns), notons que ces expériences sont réalisées à 263 nm. A partir de résultats théoriques, Grégoire *et al.*^[33], ont proposé des mécanismes pour la formation du 130 impliquant un transfert de H^+ entre le NH_3^+ et COOH en compétition avec le transfert de charge de l'indole vers le NH_3^+ .^[33] Ces mécanismes sont présentés sur la figure 2.13. Ce mécanisme a) est illustré dans leurs calculs par un tryptophane présentant des isomères où l'état $\pi\sigma^*$ s'intercale entre les 2 états $\pi\pi^*$ L_b et L_a . Ce mécanisme est initié par un transfert d'électron de l'indole vers le groupe COOH. Ensuite un transfert de H^+ du NH_3^+ vers le COOH est possible avec la formation de deux sites radicalaires et la charge est portée par l'indole. Cette configuration électronique conduit à une rupture rapide de la liaison $C_\alpha-C_\beta$. Dans notre cas, ce mécanisme direct pourrait expliquer nos observations à 220 nm, on atteint un état électronique suffisamment élevé pour que ce processus se produise majoritairement. Dans le cas du mécanisme indirect, on commence par une perte de H suite à un transfert de charge comme discuté précédemment avec un radical porté par le cycle (cf. figure 2.13 b)), ensuite il peut y avoir dissociation vers le fragment 130. A 265 nm, les mécanismes de perte de 130, après la perte de H ou directement, sont en compétition (cf. Lepère *et al.*). A 220 nm cette perte directe est favorisée.

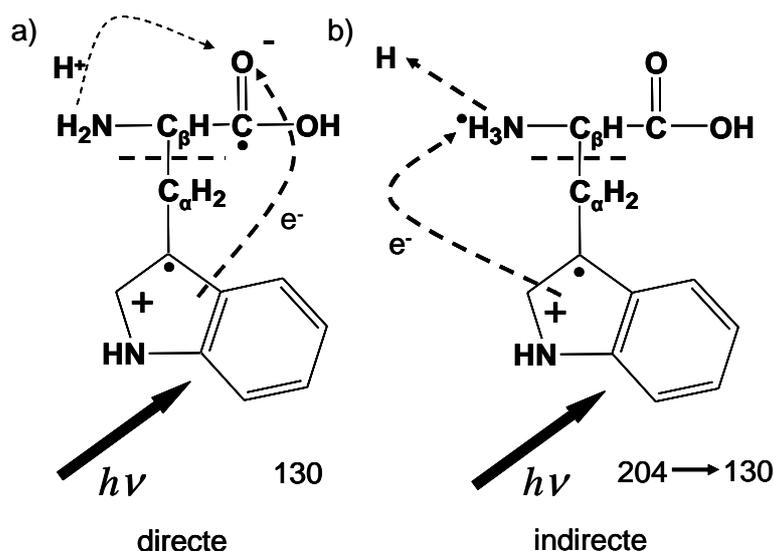


Figure 2.13 - Mécanismes compétitifs de formation du fragment 130, à partir du 205 directement ou via le 204. Inspirés du mécanisme de Grégoire et al.^[33]

Les autres fragmentations. Les spectres MSⁿ montrent par l'étude des filiations et des intensités observées, que les fragments 188, 159, 146 sont (au moins en partie) des fragments de première génération. Néanmoins, on peut remarquer sur la figure 2.10 c) que le 146 provient aussi du 188. Les spectres de photofragmentation (cf. figure 2.9) montrent une forte dépendance avec la longueur d'onde, et ces fragments sont majoritaires à $\lambda = 285$ nm et 265 nm. Le fragment 188 provient de la perte de NH₃ et le fragment 146 implique une réorganisation à partir d'une perte de NH₃ (cf. structure, figure 2.10 e) et figure 2.11) qui semble être prédominante compte tenu de l'importance du fragment 146 dans cette zone. Dans le modèle proposé sur la figure 2.12, la recombinaison du H peut conduire à cette perte de NH₃. Les résultats de Lepère et al. suggèrent que la perte de NH₃ soit issue de cette recombinaison et qu'une réorganisation lente est nécessaire pour former le fragment 146 à partir du 188.

La figure 2.14 présente l'intensité des différents fragments observés en UVPD à 262 nm en fonction du temps d'irradiation. On observe deux types de courbes, celle qui présentent un maximum (204 et 118) et celle qui présente un plateau stable (130, 117 et 91).

La production de 118 diminue à partir de 750 ms et les fragments 117 et 91 augmentent et deviennent majoritaires (parmi les cinq fragments les plus importants) un peu après 750 ms jusqu'à stabilisation. Cela suggèrent que le 118 se refragmente en 91 et 117, et que ces

fragments 117 et 91 ne se dissocient pas, cette observation est accord avec les résultats de MS³ (cf. figure 2.10 f).

Pour le 130, un plateau est présent après 1.2 ms. Cela suggère que le 130 ne se refragmente pas, d'autre part, il est majoritaire après 750ms. Parallèlement, le 204 est le fragment le plus important à 250ms puis diminue rapidement. En s'appuyant sur les spectre MS³, une interprétation possible est que la voie principale de fragmentation à 262 nm est la perte de H, puis lorsque l'on irradie avec d'autres pulses le nuage d'ions composé des fragments, le 204 réabsorbe et produit du 130 (cf. MS³ figure 2.10 b)). Ainsi le 130 devient le fragment principal après 750 ms d'irradiation et il ne se refragmente pas par la suite. Un traitement de ces courbes par des modèles de cinétique chimique pourrait apporter différentes informations sur les constantes de réaction.

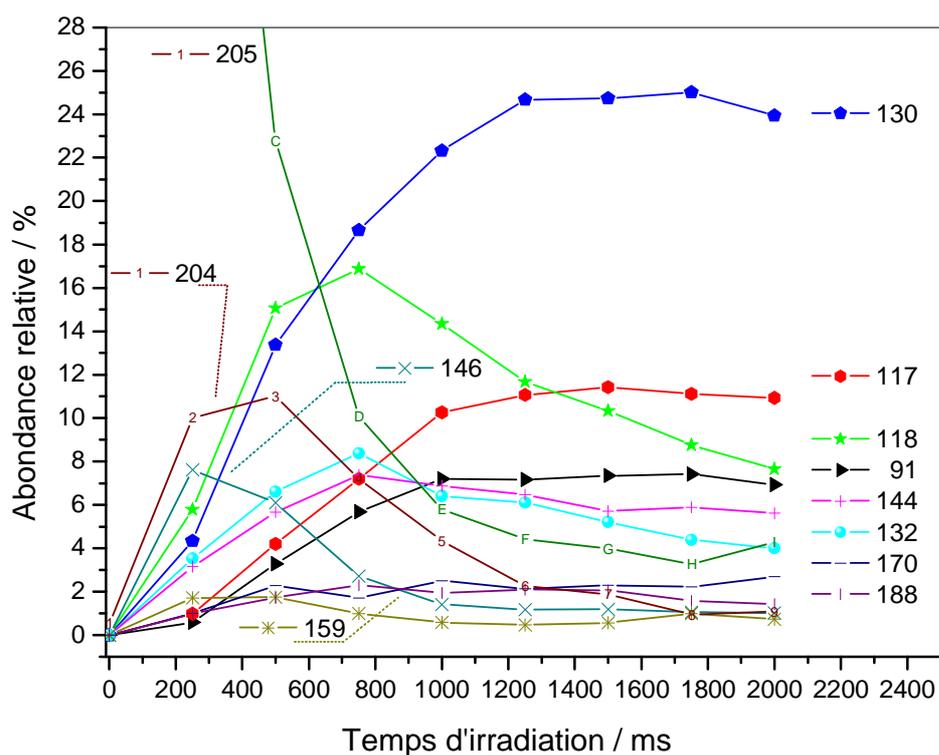


Figure 2.14 - Courbes d'intensité des fragments du tryptophane protoné en UVPD à 262 nm en fonction du temps d'irradiation. Expériences réalisées avec le laser kHz.

2.3 Peptides

2.3.1 Leucine enképhaline

La leucine enképhaline est un pentapeptide dont la séquence est Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (cf. figure 2.15). C'est un peptide neurotransmetteur endorphine qui est produit par le corps humain. Sa fragmentation en CID a été très largement étudiée par spectrométrie de masse ^[34], c'est donc un candidat modèle pour une étude comparative CID, UVPD. De plus la leucine enképhaline possède deux acides aminés aromatiques, la phenylalanine (Phe, F) et la tyrosine (Tyr, Y) qui absorbent dans le domaine 220-300 nm (cf. figure 2.4).

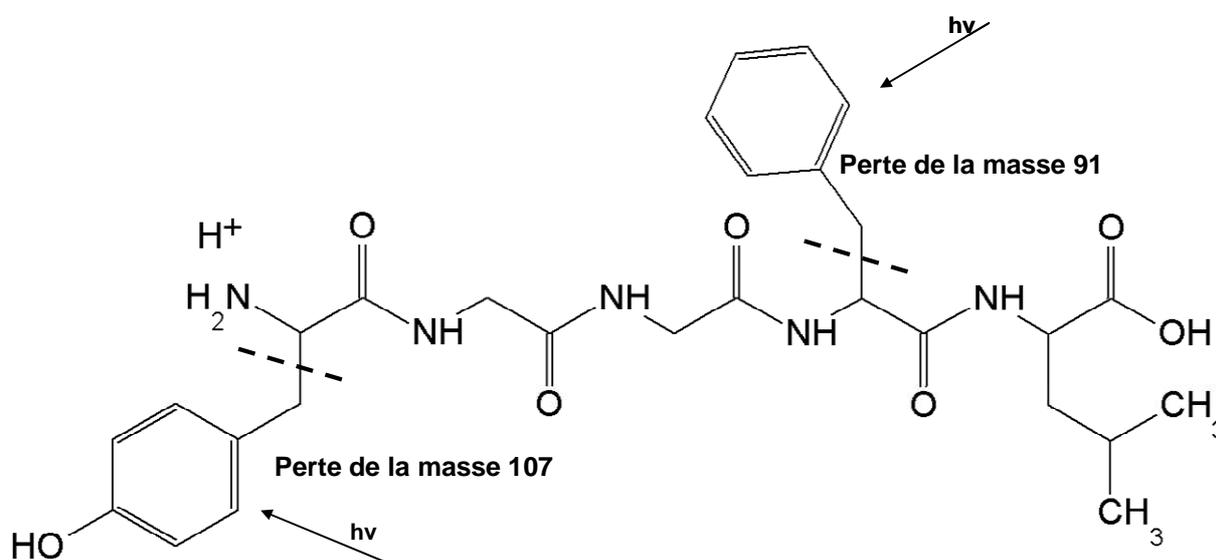


Figure 2.15 - Leucine enképhaline de séquence YGGFL. En pointillé la liaison de rupture spécifique (C_{α} - C_{β}) suite à l'absorption localisée de photons.

2.3.1.1 Expérience

La leucine enképhaline (LE) est comme la plupart de nos produits, conditionnée sous forme de poudre provenant de la société Sigma Aldrich (France). De la même manière que pour le tryptophane, cette poudre est diluée dans un mélange eau/méthanol à 50/50 (v/v) avec 3% d'acide acétique. La solution a une concentration de 100 μ M. Cette solution est injectée dans le spectromètre de masse à une vitesse de 5 μ L/min.

2.3.1.2 Les résultats

La figure 2.16 montre des spectres de dissociation activée par CID et par UVPD. En CID (figure 2.16 a)), on observe une fragmentation classique pour un peptide avec des

fragments a, b, y et des pertes de neutre comme par exemple -18 (-H₂O), ce qui est en accord avec les résultats trouvés dans la littérature.^[35]

Les spectres d'UVPD de la LE sont représentés sur les figures 2.16 b), c), d), respectivement à 280, 260, 220 nm avec un temps d'irradiation de 4s (80 pulses). A 280 nm le spectre présente un schéma de fragmentation différent de celui obtenu par CID. Le spectre (figure 2.16 b) est dominé par le fragment m/z 449 correspondant à la rupture de la liaison C_α-C_β, c'est la perte de la chaîne latérale de la tyrosine (cf. figure 2.15). On observe aussi le fragment m/z 448 correspondant à cette même perte de chaîne latérale, plus une perte de H. En plus de ces fragments très spécifiques on voit les fragments b₄, y₃ identiques à ceux trouvés en CID plus des pertes de neutres associés, b₄[°] (b₄-H₂O) et y₄^{*} (y₄-NH₃). A 260 nm le spectre est similaire, excepté la naissance d'un pic à m/z 465.

Le spectre à 220 nm présente des différences significatives, comme la présence du pic à m/z 465 correspondant à la rupture de C_α-C_β dans la chaîne latérale de la phénylalanine (cf. figure 2.15). Dans l'insert de la figure 2.16 d) on voit aussi nettement la perte de H qui n'est pas présente dans les autres spectres. En plus de ces fragments spécifiques, nous constatons que les fragments de type CID sont plus nombreux et plus abondants ce qui est dû au fait qu'une quantité supérieure d'énergie a été déposée dans l'ion. Nous remarquons sur les trois spectres obtenus par UVPD une perte de NH₃ en plus de la perte de H₂O, contrairement à la CID où il n'y a qu'une perte de H₂O. A 220 nm, les pertes de H₂O et NH₃ sont presque égales alors qu'elles ne l'étaient pas à 280 et 260 nm. Les pertes de NH₃ et de H₂O sont compétitives et gouvernées par la longueur d'onde.

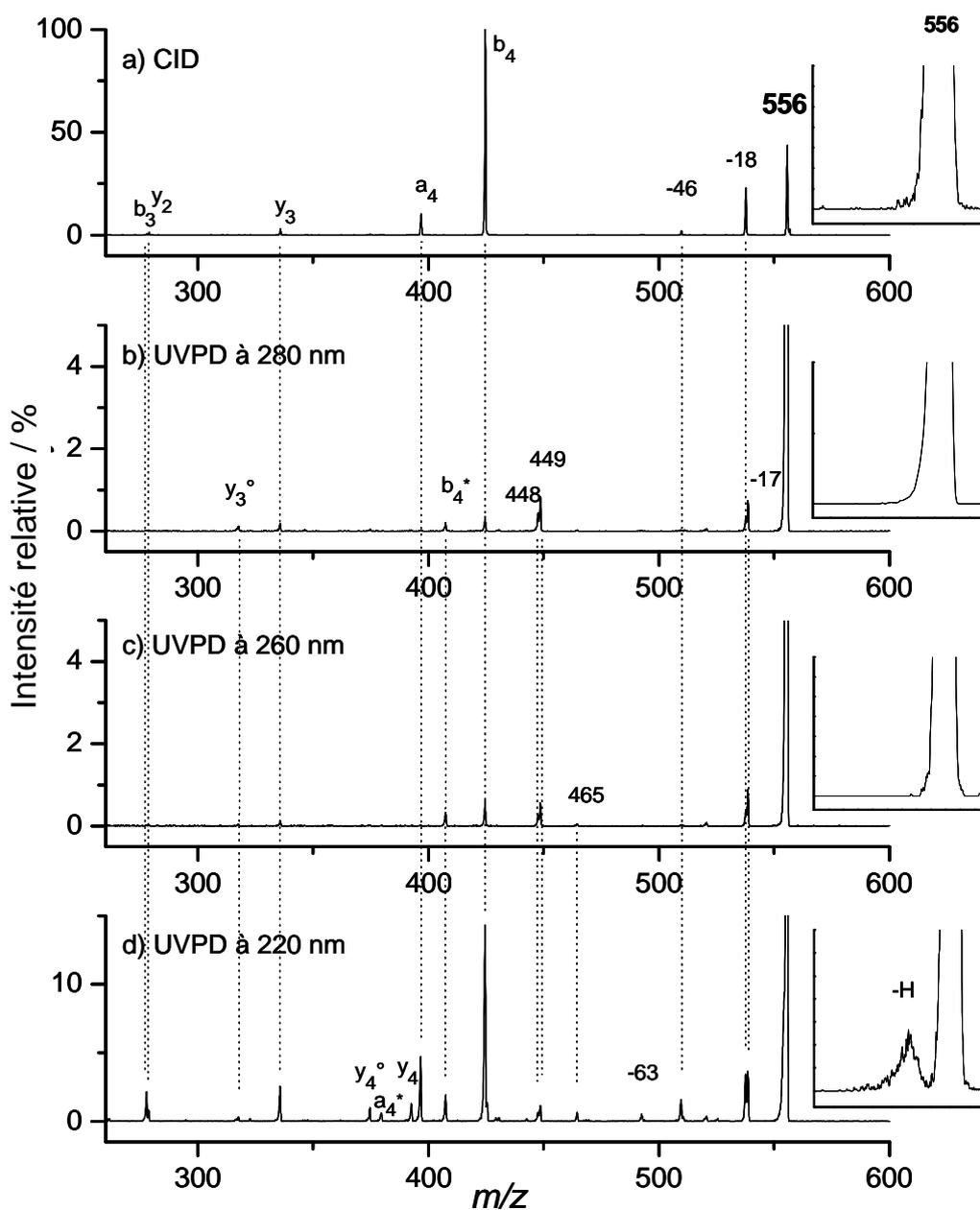


Figure 2.16 - Spectres de fragmentation de la leucine enképhaline par CID et par UVPD à différentes longueurs d'ondes. a) CID (30ms à 15%), b) UVPD à $\lambda=280$ nm, c) $\lambda=260$ nm, d) $\lambda=220$ nm. Le temps d'irradiation est de 4s pour les spectres b), c), d). Les inserts montrent un zoom scan du parent pour mettre en évidence la perte de H.

2.3.1.3 Discussion

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'excitation électronique suite à l'absorption d'un photon est un processus en une étape sur un site localisé, un chromophore. Dans notre cas, les deux chromophores sont les groupes phénol (dans la tyrosine) et phényl (dans la phénylalanine). Nous avons observé deux fragmentations particulières, la perte de H et la perte d'un chromophore, perte de 107 pour le phénol et perte de 91 pour le phényl.

Perte de H. Ce comportement déjà observé sur le tryptophane par notre groupe et par Juvet *et al.*^[24] fut, pour la première fois, observé sur un peptide. Le processus est similaire à celui proposé pour le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine ont la même transition $\pi\pi^*$ que le tryptophane. Le mécanisme implique les croisements des états électroniques $\pi\pi^*$ avec l'état dissociatif $\pi\sigma^*$ (cf. figure 2.12). Lors de la dissociation à 220 nm qui produit cette perte de H on observe une intense perte de NH_3 . A 260 et à 280 nm il y a une perte de NH_3 mais pas de perte de H. Le transfert de charge suivi d'une perte de H que l'on a observé pour le tryptophane au voisinage de 260 nm est ici fortement décalé vers le bleu (220 nm). De plus, il est à noter que le fragment formé suite à la perte de H est une espèce radicalaire, avec le radical localisé sur le N-terminal (cf. figure 2.17).

Perte de chromophore. Pour la perte du m/z 107 (tyrosyl), on constate que l'excitation électronique du chromophore et la rupture de la liaison $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ sont topologiquement proches (cf. figure 2.15). Cette proximité suggère un processus local et rapide sans redistribution d'énergie dans la molécule. Nous avons proposé deux processus possibles pour cette rupture.^[36] **i)** Dissociation directe dans l'état électronique excité. **ii)** conversion interne et rupture très rapide de la liaison $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ sans redistribution d'énergie. Ces résultats sont similaires à ceux observés sur le tryptophane.^[25] Sur le tryptophane, les calculs réalisés par Juvet *et al.* impliquant un transfert de proton sont en faveur de la 1^{er} hypothèse. Ces canaux de dissociation ont aussi été observés sur des peptides neutres après ionisation multi photonique.^[37] Dans ce cas, la charge est portée par le cycle aromatique. Cette différence peut s'expliquer par la localisation et/ou la mobilité de la charge lors de l'absorption. Comme dans le cas de la perte de H, les fragments résultants sont des espèces radicalaires (cf. figure 2.17).

Le résultat principal de cette étude a été de démontrer la possibilité de générer des fragments différents de ceux obtenus en CID, suite à une excitation laser spécifique sur un peptide. De plus, le choix de la longueur d'onde permet d'orienter le processus de fragmentation.

Pour terminer, les fragments a, b, y observés en CID sont dominants à 220 nm. D'une part l'énergie déposée en grand excès peut en partie se redistribuer et, d'autre part, à cette longueur d'onde, les transitions $n\pi^*$ et $\pi\pi^*$ des liaisons peptidiques (transition des CO), peuvent permettre une absorption non négligeable par les carbonyles de la chaîne principale.

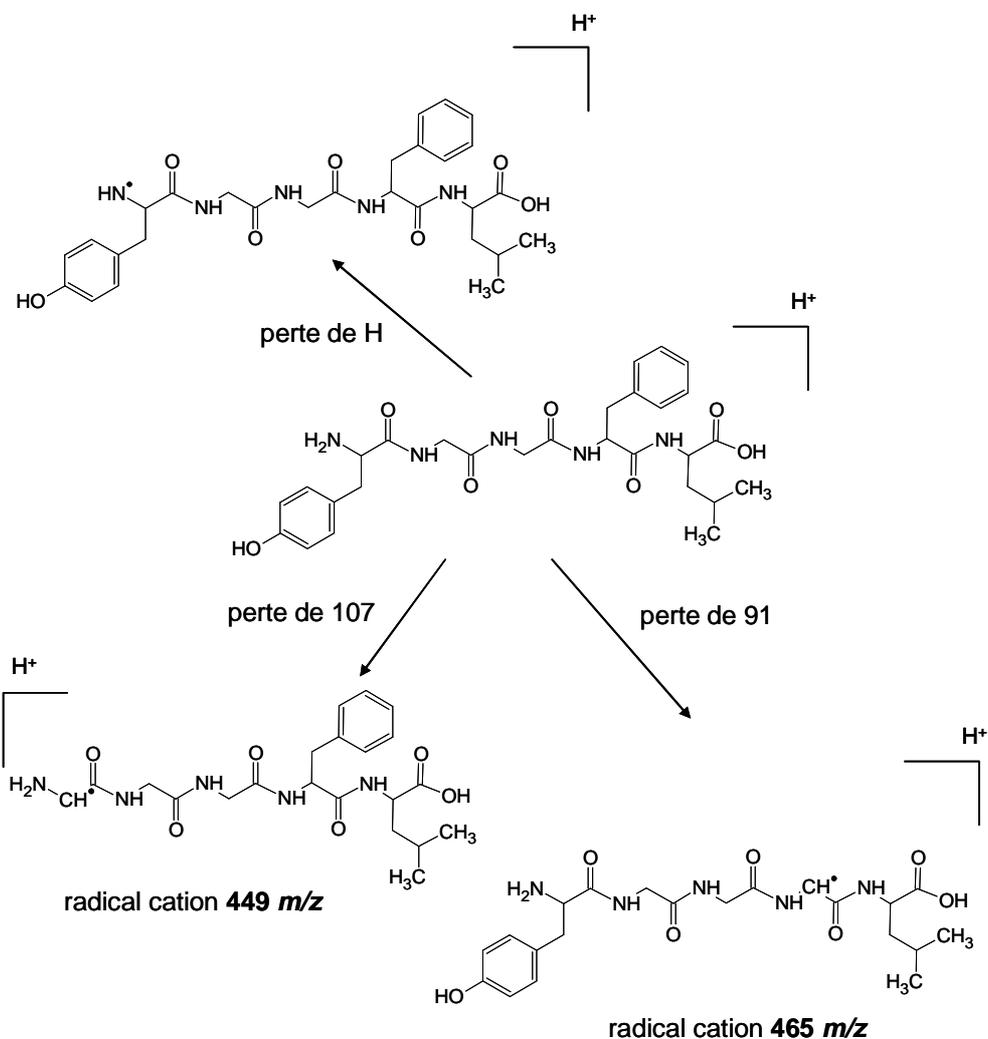


Figure 2.17 - Schéma de la fragmentation spécifique de la leucine enképhaline. Perte des chromophores ou de H et formation d'espèces radicalaires.

2.3.2 Expérience MSⁿ

L'activation laser permet d'obtenir des radicaux cations suite à la perte de H et aux pertes de cycles aromatiques. Ces fragments radicalaires de masse m/z 449 et 465 sont isolés dans une étape de MS supplémentaire, puis ce fragment est activé soit par laser soit par collision. Les spectres obtenus sont présentés sur la figure 2.18. Le fragment 449 obtenu après 4s d'irradiation à $\lambda=220$ nm, est isolé puis excité par CID à 20 % (figure 2.18 a)) ou par laser

à $\lambda=220$ nm pendant 4s (figure 2.18 b)). En CID, comme en UVDP, on observe une importante perte de H. Le radical est formé près du N-terminal, cela suggère que le fragment radicalaire se stabilise par perte de H et aboutit à la formation d'un ion de type immonium avec un proton non mobile (cf. schéma fragmentation d) de la figure 2.19). La faible fragmentation de type CID obtenue, renforce l'idée de la faible mobilité de la charge.

Les fragments observés pour l'ion m/z 465 correspondant à la perte de la chaîne latérale de la phénylalanine, sont plus difficiles à interpréter, bien que des mécanismes aient été proposés.^[36] A la différence du cas précédent, la forme radicalaire est portée par un carbone central dans la chaîne peptidique. Sans entrer dans les détails, nous noterons que l'on observe, à la fois après excitation laser et collisionnelle, le détachement du second chromophore plus un carbone (107+12) donnant le fragment m/z 346. Comme on le voit sur le mécanisme proposé sur la figure 2.20 b), celui-ci suppose un repliement de la molécule.

Nous allons maintenant présenter des résultats similaires sur des polypeptides et montrer que la formation de radicaux par les pertes de H ou de chromophores peut se généraliser. Nous discuterons de l'intérêt des expériences UVDP/CID sur des radicaux photo-induits d'un point de vue analytique.

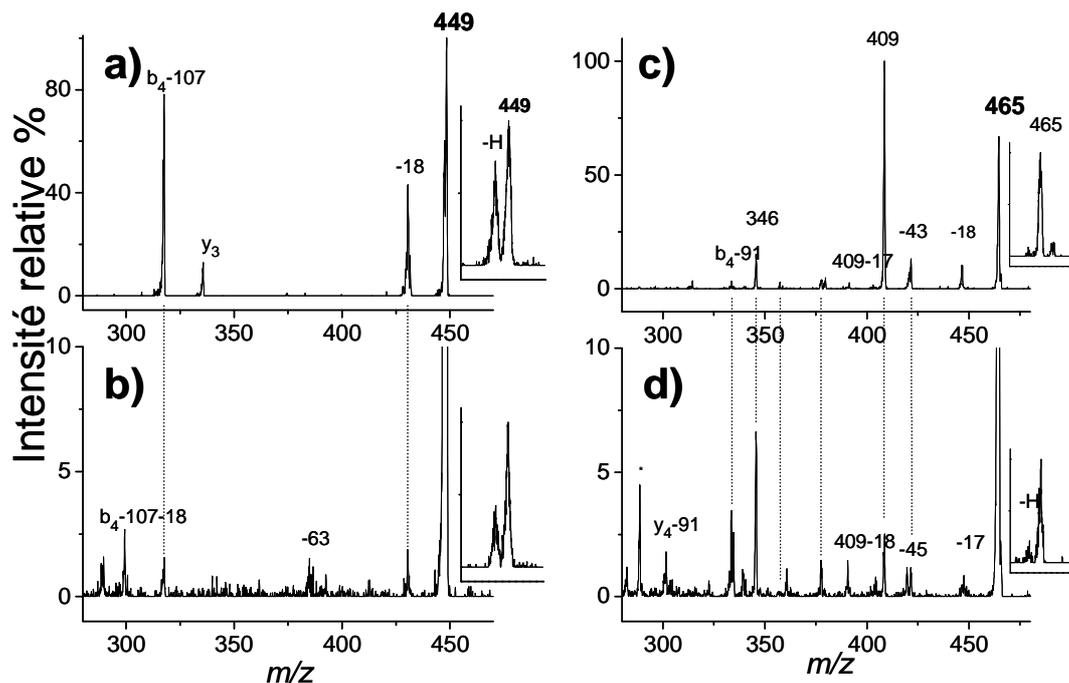


Figure 2.18 - Spectres MS^3 . L'ion m/z 449 (-107) est produit par UVPD à 220 nm (4s). a) CID du 449, à 20% sur 30ms. b) UVPD à 220 nm (4s) du 449. L'ion m/z 465 (-91) est produit par UVPD à 220 nm (4s). c) CID du 465, à 20% sur 30ms. d) UVPD du 465 à 220 nm pendant 4s. Les zooms scans dans les inserts de chaque spectre montrent la perte de H.

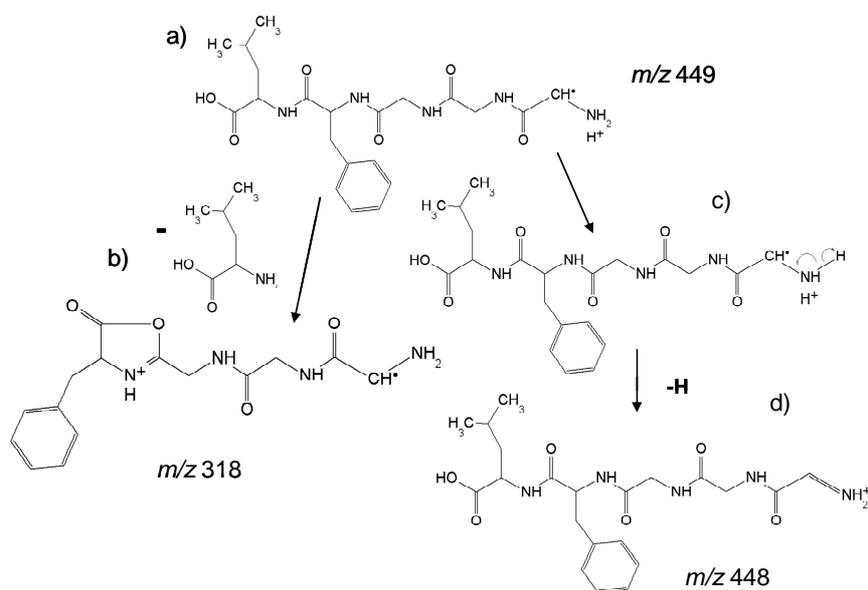


Figure 2.19 - Schéma de fragmentation du radical m/z 449. a) 449, b) 318 qui correspond à b_4-107 , c) état intermédiaire conduisant à la perte de H avec le fragment 448 d).

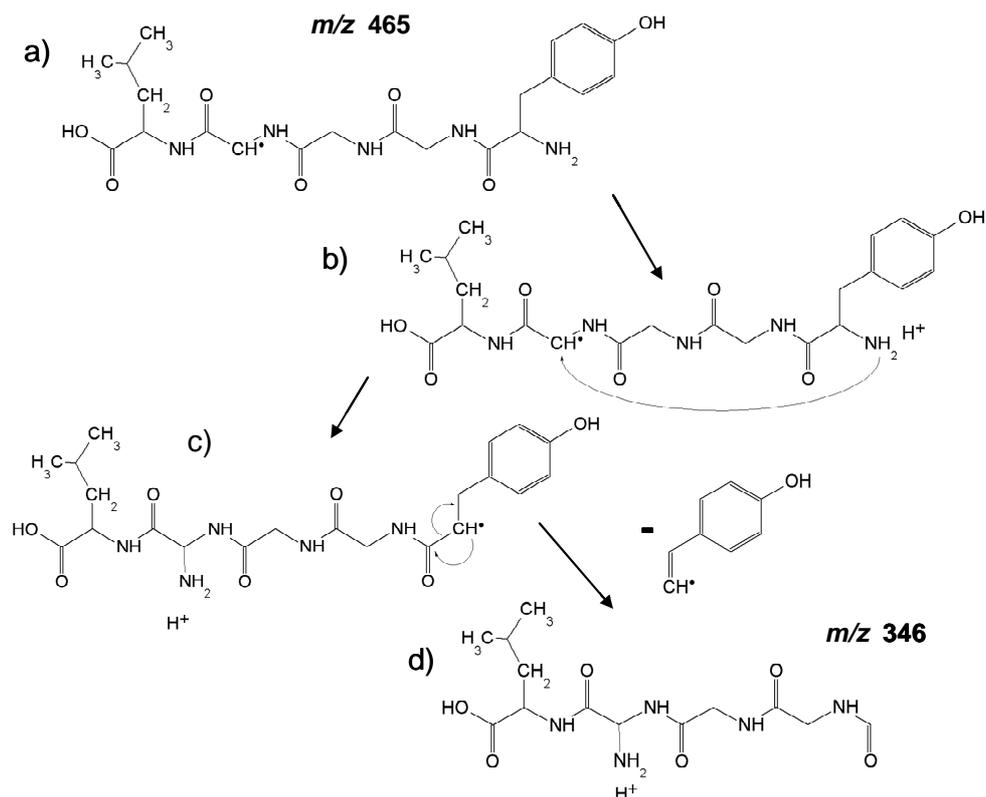


Figure 2.20 - Schéma de fragmentation du radical m/z 465 vers le 346. a) 465, b) état intermédiaire avec repliement du N-terminal sur le radical, transfert d'un NH_3^+ sur le site radicalaire et d) le 346.

2.3.3 Gramicidine A et phosphopeptides

Avant de présenter la gramicidine, parmi les nombreux systèmes peptidiques que nous avons étudiés, nous avons observé une tendance assez générale sur le détachement de H ou de chromophore. Sur la figure 2.21, on voit que les trois peptides, l'hormone lutéinisante humaine, la corazonine et l'angiotensine II, présente des pertes de un à plusieurs H et des pertes de chromophores lors de la photodissociation, en particulier à 220 nm. De cette observation découle une règle : « quand une importante quantité d'énergie (un photon UV) est introduit de manière localisée dans un ion possédant un grand nombre d'hydrogène, une partie de ces hydrogènes sont expulsés ». Nous allons détailler ce mode de fragmentation pour la gramicidine. Notons tout de suite que l'éjection de plusieurs hydrogènes ne peut s'expliquer uniquement dans le cadre d'un transfert d'électron vers un NH_3^+ .

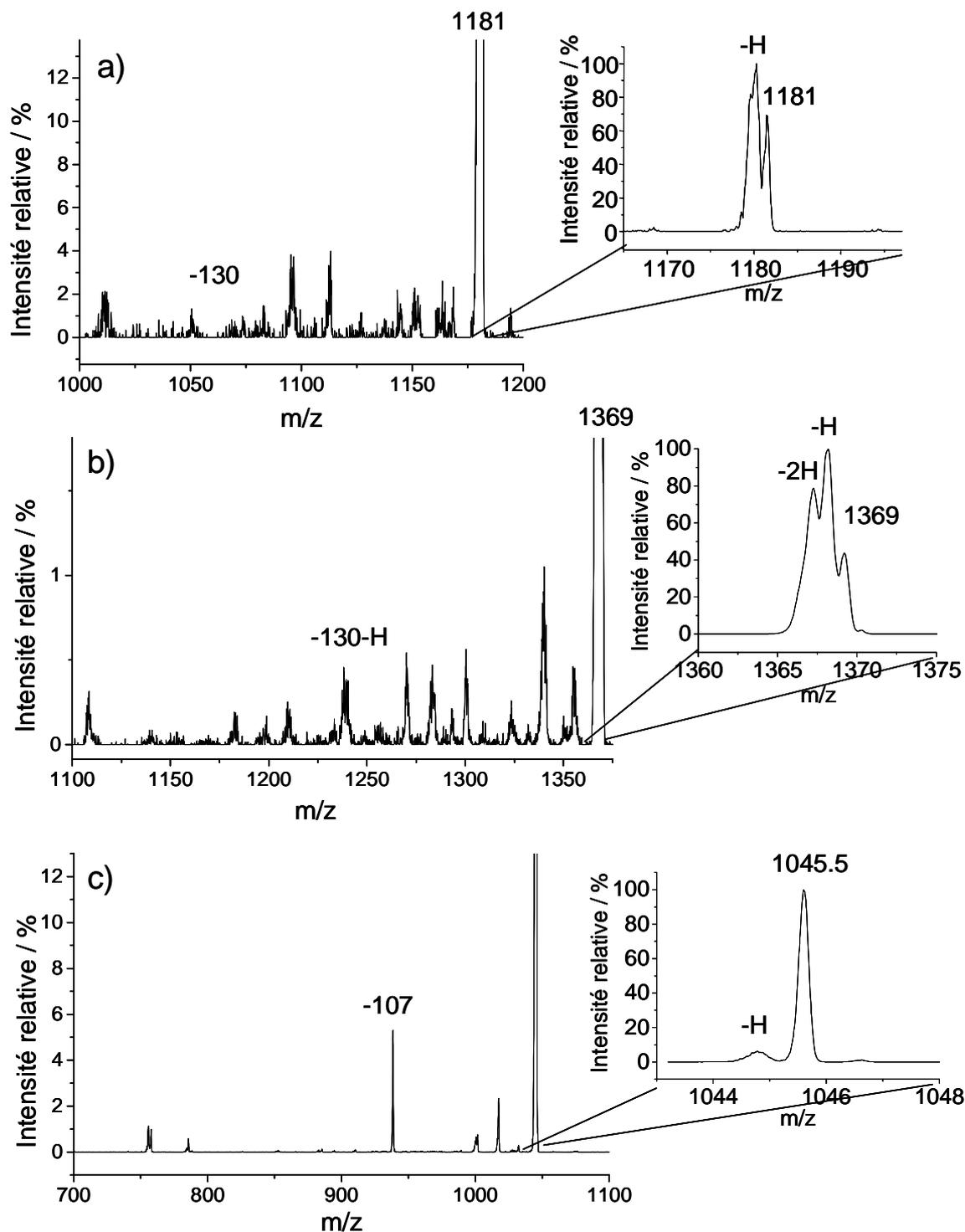


Figure 2.21 - Spectres de photodissociation à 220 nm pendant 2s. a) luteinizing hormone, b) corazonine, c) angiotensine II. Pour les trois spectres, le temps d'irradiation est de 10s. On observe des pertes de H et des pertes d'indole.

2.3.3.1 Formation et activation radicalaire : généralisation

La gramicidine est issue de la culture du bacillus de brevis et est utilisée comme antibiotique, cette molécule possède une structure en hélice, lui permettant de jouer le rôle de canal ionique.^[38] Il existe quatre variantes de gramicidine (A, B, C, D). La forme qui nous intéresse est la gramicidine A. Nous l'observons sous sa forme sodiatée à la masse m/z 1904 de formule $([\text{HCO-VGALAVVVVWLWLWLW-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]\text{-Na}^+)$. On remarque que la gramicidine A possède quatre chromophores qui sont des tryptophanes.

Le spectre de masse en CID est donné par la figure 2.22 a). Il est dominé par une perte de H_2O venant du C-terminal, ainsi que par quelques fragments a, b et y. Ces résultats sont en accord avec la littérature.^[22]

Les spectres UVPD à $\lambda=260$ nm et à $\lambda=220$ nm sont respectivement représentés sur les figures 2.22 b) et c). On constate que les spectres sont dominés par de multiples pertes de H. On a deux pertes de H à 260 nm et jusqu'à quatre à 220 nm. Plus on injecte d'énergie, plus il y a de pertes de H : c'est la règle énoncée en début de paragraphe. Des fragments décalés de quelques unités de masse atomique par rapport aux fragments CID y_{15} , y_{14} , a_{16} , b_{16} sont observés sur le spectre de la figure 2.22 c). Ils sont attribués aux fragments y_{15} , y_{14} , a_{16} , b_{16} plus des pertes de H.

Nous avons aussi deux pertes notables par rapport à la CID. Une perte de 28 correspondant à une perte de CO et l'autre de $(130+n)$ correspondant à une perte de l'indole plus n hydrogènes. La perte de CO peut provenir du N-terminal, et les tryptophanes sont regroupés du côté C-terminal. Cette perte peut se produire après conversion interne ou suite à un repliement comme nous l'avons suggéré pour la leucine enképhaline. De plus, il est remarquable de voir qu'à 260 nm la perte de CO prédomine et la perte de H_2O devient négligeable. A 220 nm la perte de CO est moins importante au profit d'un plus grand nombre de perte de H. Premièrement, par un mécanisme d'apport énergétique différent (CID vs UVPD), il y a ouverture d'un nouveau canal de fragmentation conduisant à la perte de CO au détriment de la perte de H_2O . Ces deux fragmentations se produisent de part et d'autre de la chaîne peptidique, ce qui peut être comparé au mécanisme entre NH_3 (N-terminal) et H_2O (C-terminal) dans le cas de la leucine enképhaline. Ensuite il y a compétition entre deux canaux en fonction de l'énergie des photons : la perte de H associée à un mécanisme direct et la perte de CO associée à un mécanisme de redistribution d'énergie. La perte de l'indole plus quelques H est fortement favorisée à haute énergie (220 nm). D'autre part, on observe la perte de 4

atomes d'hydrogènes et nous avons 4 tryptophanes. A noter que les pertes de H ne peuvent provenir du N-terminal. Ces remarques suggèrent que les pertes de H se produisent à proximité des tryptophanes. Il existe sans doute d'autres mécanismes conduisant à l'évaporation d'hydrogène que celui faisant intervenir le transfert électronique, proposé par Jouvét et *al.*^[31] En effet, ici, il n'y a pas de protonation côté N-terminal. D'ailleurs les deux C- et N- terminal sont bloqué et la charge n'est pas portée par un proton mais par un cation Na⁺. Ce qui tend à montrer que la redistribution d'énergie dans un système complexe à grand nombre de degré de liberté n'est pas trivial.

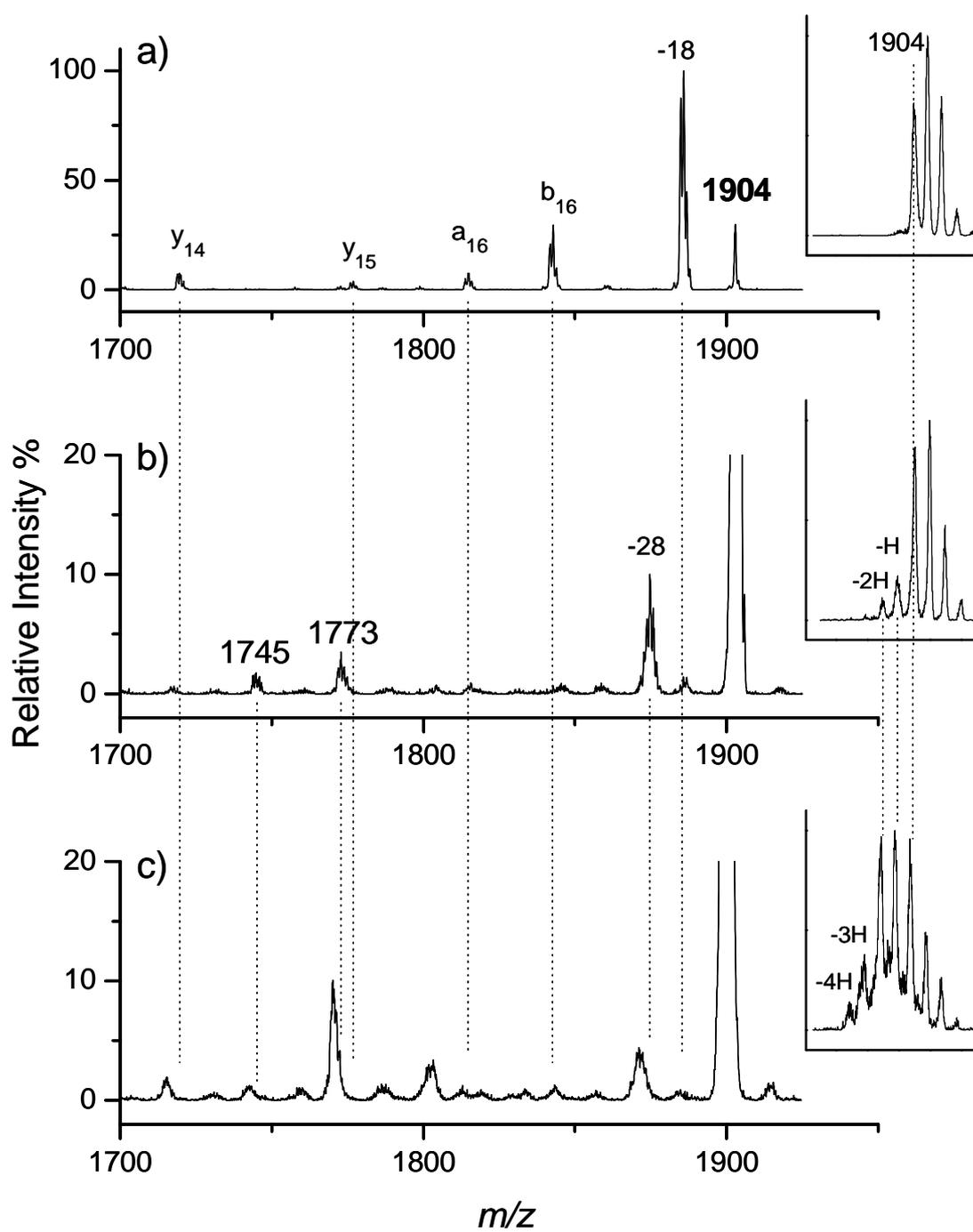


Figure 2.22 - Spectres de la gramicidine A. a) CID, b) UVPD à $\lambda=260$ nm pendant 10s, c) UVPD à $\lambda=220$ nm pendant 10s.

2.3.3.2 Application analytique : peptide phosphorylé

Nous avons montré que suite à une activation laser, une voie de dissociation privilégiée pour un peptide est le photoclivage d'un chromophore et la création d'une espèce radicalaire. Je vais présenter un résultat assez marquant sur l'utilisation que l'on peut faire de cette technique pour l'analyse peptidique. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le professeur Jérôme Lemoine du laboratoire des sciences analytiques de l'université Claude Bernard de Lyon 1. Nous nous sommes intéressés à l'analyse de peptides phosphorylés. Ce type de peptide est impliqué dans des mécanismes fondamentaux tel que la phase de transcription post-transductionnelle ou encore dans l'apoptose (suicide cellulaire). Ces peptides possèdent un ou plusieurs phosphates (H_3PO_4) qui sont fixés sur des groupes alcool tel que ceux de la serine (Ser, S), la thréonine (Thr, T) et la tyrosine (Tyr, Y). Ces phosphates leur confèrent leurs fonctions.

Le peptide de séquence (Ac-VYKpSPVVS GD TSPRHL-NH₂) a été synthétisé. Ce peptide porte un phosphate sur une serine et il possède une tyrosine. Il est injecté dans le spectromètre de masse à une concentration de 60 μ M dans un mélange eau/méthanol à 50/50 (v/v) avec 3% d'acide acétique.

La figure 2.23 a) montre un spectre de CID du peptide doublement protoné positivement. On constate que les principaux fragments sont la perte de H_3PO_4 et de H_2O . Ce comportement est très caractéristique des peptides phosphorylés qui perdent en premier lieu leurs phosphates. Malheureusement l'information essentielle est la position du phosphate. La figure 2.23 b) présente la dissociation induite par le laser à 220 nm pendant 10s ce qui correspond à 200 pulses laser. On observe une fragmentation simple composée de 2 fragments, la perte de CO (-28) et la perte de la chaîne latérale de la tyrosine (-107) avec formation d'une espèce radicalaire doublement chargée. Contrairement à la CID, il n'y a aucune perte de phosphate qui est la voie de fragmentation la plus faible en énergie. Le mécanisme semble très localisé et l'IVR, qui aurait pu aboutir au détachement du phosphate, est complètement bloqué (*quenché*). Notons que pour un peptide de cette taille l'absorption d'un photon conduit après IVR à une augmentation faible de la température et ne suffit pas à fragmenter l'ion. Seules les voies impliquant un mécanisme rapide sans redistribution complète de l'énergie peuvent être observées.

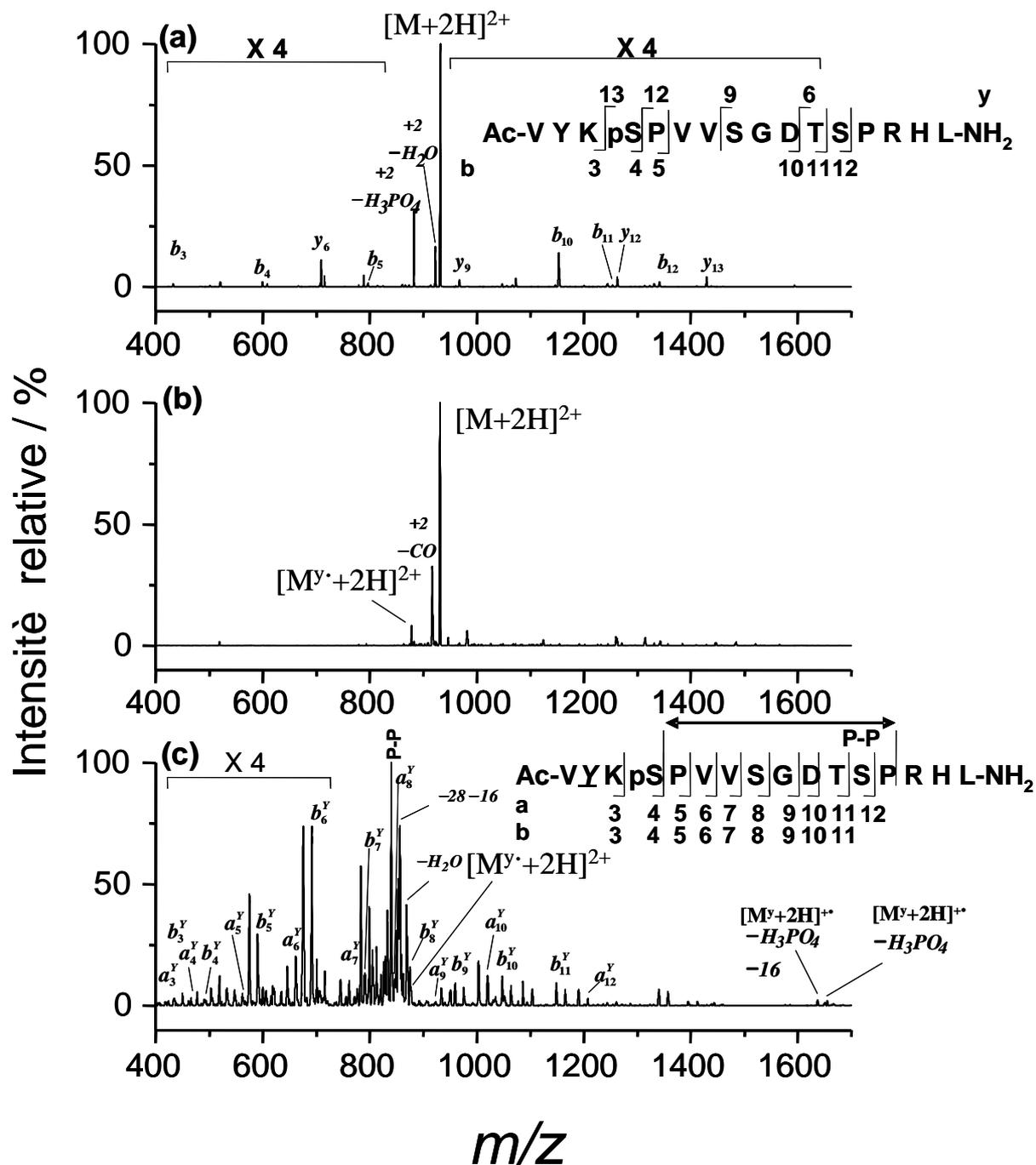


Figure 2.23 - Spectres d'un peptide phosphorylé doublement chargé $[M+2H]^{2+}$. a) CID à 20% pendant 30 ms. b) UVPD à 220 nm pendant 10s. c) Spectre MS^3 , isolation du fragment $[M^y+2H]^{2+}$ créé par UVPD à 220 nm pendant 10s, puis le fragment isolés, est activé par CID.

L'originalité de l'expérience vient dans la seconde étape, l'étape de MS^3 . Le fragment radicalaire, issu de la perte de 107 noté $[M^y+2H]^{2+}$, est isolé suite à sa formation par une irradiation laser à 220 nm pendant 10s, puis lors d'une deuxième séquence, le fragment -107 devenu parent est fragmenté par CID pendant 100ms de manière à avoir 60 % d'atténuation

du pic parent. Le spectre obtenu est donné par la figure 2.23 c). La première remarque est la richesse des fragments comparativement au spectre de CID du parent $[M+2H]^{2+}$. La couverture de séquence des fragments a et b est quasiment complète. Les pertes de phosphate directes ou associées à un fragment sont faibles. La présence d'un radical sur l'ion vient fortement stabiliser le phosphate. D'un point de vue mécanistique, le radical ouvre de nouvelles voies de fragmentation par cette nouvelle espèce radicalaire. Ces nouvelles voies de fragmentation reproduisent la dissociation du squelette peptidique observée habituellement en CID sur des peptides. D'un point de vue analytique l'intérêt est de taille puisque la production de ce radical cation permet une couverture presque complète de la séquence sans perte de phosphate et donc une augmentation de l'information. De manière similaire, l'utilisation des peptides radicalaires a été proposée par Beauchamp et *al.*^[39], c'est le FRIPS (*Free Radical Initiated Peptide Sequencing*). Contrairement à nous, il utilise un initiateur sous forme de ligand chromophore greffé au peptide. Une idée intéressante serait de combiner les deux approches et de fixer un chromophore fragile sur un site particulier de la protéine et de former un radical par irradiation à l'endroit souhaité sur le peptide.

2.3.4 Conclusion

La photodissociation de systèmes plus complexes tels que peptides ou polypeptides reste efficace et les résultats obtenus sont prometteurs. L'UVPD ouvre des voies de fragmentation différentes de la CID. En adaptant la longueur d'onde, on peut favoriser des voies de fragmentation particulières et en inhiber d'autres. Une voie de fragmentation bien spécifique à l'UVPD est la formation d'espèce radicalaire suite au détachement d'un chromophore (trp, tyr, phe) ou bien suite à la perte de H, on a observé que ce comportement est assez général pour les peptides ayant au moins un acide aminé aromatique.

Une fois l'espèce radicalaire formée, une étape supplémentaire de MS^n permet d'obtenir par activation par laser ou par collision sur le radical, une couverture de séquence bien plus complète que celle observée par CID. Par exemple dans le cas d'un phosphopeptide où le schéma de fragmentation en CID est fortement inhibé par la perte du phosphate, la formation d'un radical cation permet de bloquer la perte de phosphate au profit d'une couverture de séquence quasi complète et d'information plus précise. Cette procédure apporte de nouveaux outils aux sciences analytiques et a été récemment validée par notre équipe sur des peptides issus de digestions protéiques.^[40]

2.4 Comparaison de différents type d'excitation : Pentapeptide du GDR

Les expériences de fragmentation que nous venons de présenter, permettent d'obtenir des informations sur les canaux de fragmentation en fonction de l'énergie. Pour ces résultats, certains modèles de fragmentation proposent des mécanismes faisant intervenir le croisement entre des états électroniques excités et des états dissociatifs. Ces mécanismes suggèrent dans le cas d'une longue chaîne flexible, une forte influence de la structure et du « repliement » de la molécule. Afin d'étudier plus en détail cette idée, dans le cadre du GRD 2758 (Groupe De Recherche), en collaboration avec différents laboratoires, nous avons réalisé un ensemble d'expériences mettant en œuvre plusieurs méthodes de fragmentation et de simulation sur un peptide modèle : le pentapeptide Ala-Gly-Trp-Leu-Lys. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Julia Chamot-Rooke et Guillaume van der Rest du LMR à l'Ecole Polytechnique, Claude Dedonder-Lardeux et Christophe Jovet du LPPM à Orsay, Gilles Grégoire et Charles Desfrancois du LPL à Villetaneuse et Delphine Onidas du LCAM à Orsay.

2.4.1 Expériences et peptide

Les expériences d'ECD et certaines de CID ont été réalisées sur un spectromètre de masse à transformée de Fourier (FTICR, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) à Palaiseau. La fragmentation par capture électronique (ECD) est obtenue grâce à un faisceau d'électrons thermiques et la CID utilise la technique SORI (*Sustained Off Resonance Irradiation*).^[41] A Orsay, un laser à 266 nm avec des impulsions de durée 100 femtosecondes ou 100 nanosecondes croisant un jet moléculaire permet de réaliser une partie des expériences d'UVPD. Pour finir, notre montage à Lyon fournit des résultats en UVPD à différentes longueurs d'ondes et en CID.

Le peptide choisi est un pentapeptide de séquence AGWLK synthétisé spécialement pour cette expérience et répondant à deux critères principaux. Il possède deux groupes basiques, une lysine (lys, K) du côté C-terminal, et le NH₂ (côté N-terminal), ce qui permet de charger deux fois positivement le peptide. L'espèce doublement chargée permet de réaliser les expériences d'ECD. Ce peptide possède un tryptophane au centre et cela permet la dissociation induite par laser UV. Dans toutes ces expériences, le peptide est transféré en phase gazeuse par la technique d'electrospray à partir d'une solution du type eau/méthanol 50/50 (v/v) et 3% d'acide acétique.

2.4.2 Les résultats

Les résultats se répartissent en deux parties, la fragmentation de l'espèce simplement chargée par CID et UVPD et celle doublement chargée par CID, UVPD et ECD.

Simplement chargé. Sur la figure 2.24, sont représentés les spectres de fragmentation du pentapeptide simplement chargé $[AGWLK+H]^+$ à m/z 574. La CID (cf. figure 2.24 a)) présente une fragmentation classique avec des fragments a, b, y et une perte de H_2O . L'UVPD à 260 nm (cf. figure 2.24 b)) donne des fragments b_3^+ , b_4^+ et une perte de H_2O identique à ceux observés en CID ainsi qu'une perte spécifique et caractéristique de l'UVPD, la perte de l'indole (-130). Des résultats similaires à 266 nm sont obtenus avec le montage utilisant le laser femto seconde. Lorsque l'on passe à 220 nm, on observe une intense perte de 130 ainsi que la perte de un et de deux H. L'intensité des pics -130 et -H est importante. Le comportement de ce peptide après irradiation UV est similaire à celui observé pour les peptides présentés au début de ce chapitre.

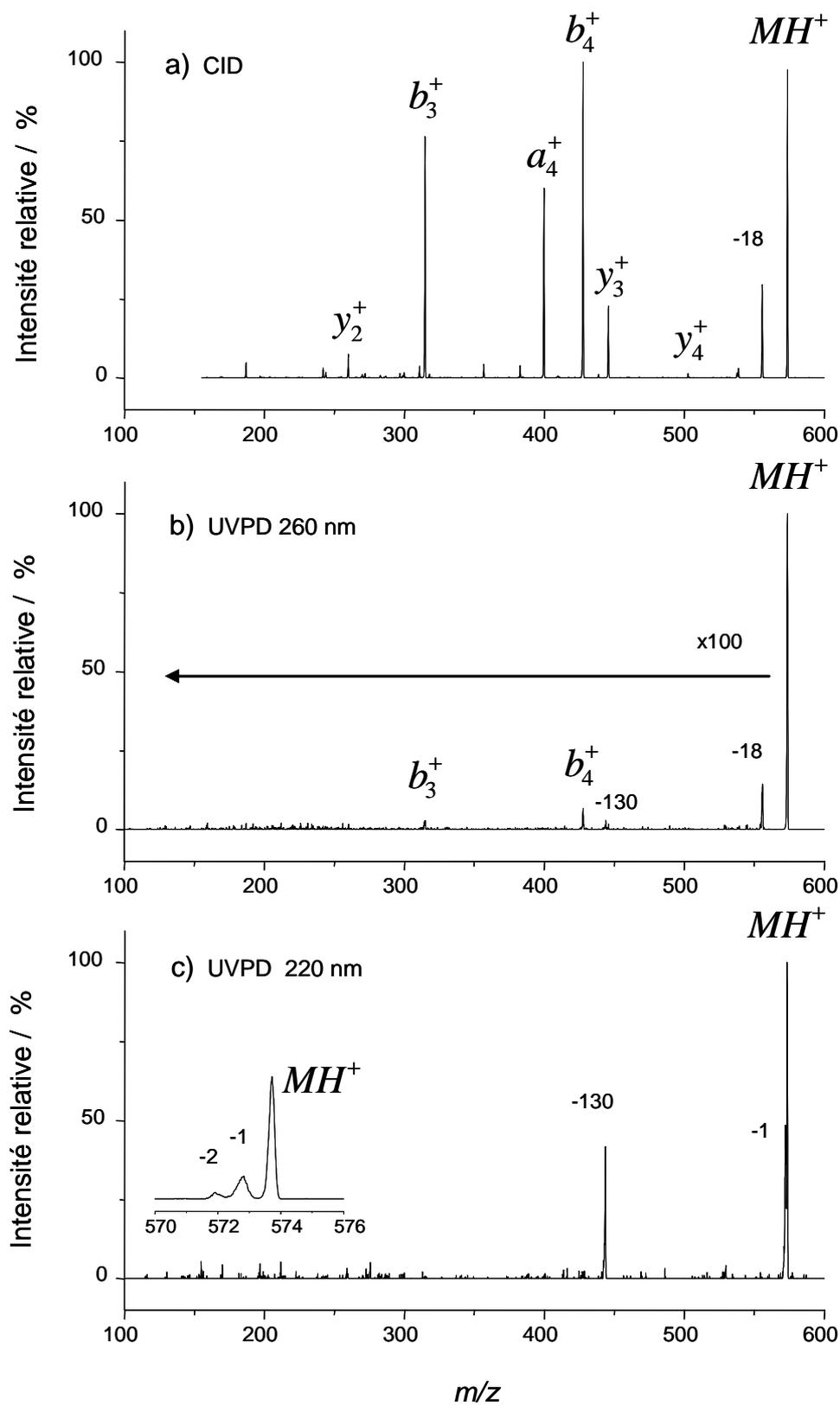


Figure 2.24 - Spectres de masse du simplement chargé $[AGWLK+H]^+$ réalisés sur le LCQ^{Duo}. a) CID, b) UVPD à 260 nm, c) UVPD à 220 nm.

Doublement chargé. Sur la figure 2.25 a), le spectre de CID de l'espèce doublement chargée montre un schéma de fragmentation habituel avec des ions a, b, y simplement chargés. Le spectre d'UVPD à 220 nm de la figure 2.25 b) montre une fragmentation très faible, presque négligeable de l'ordre de 50 fois moins intense que celle du simplement chargé. Le même résultat est observé à 260 nm en nanoseconde et à 266 nm en femtoseconde sur l'expérience de jet moléculaire. Sur la figure 2.25 c), on voit que l'ECD génère des fragments de type a, b, y simplement chargés identiques à ceux observés en CID et un fragment w_2 . Les fragments c, z attendus en ECD, ne sont pas présents.

Ces résultats expérimentaux montrent que les chemins de fragmentation dépendent fortement de la méthode employée pour apporter l'énergie dans le système. La CID, l'UVPD et l'ECD présentent des schémas de fragmentation bien distincts. La variété des canaux de fragmentation qui sont observés et la sensibilité du processus d'excitation montrent qu'il s'avère difficile de proposer un modèle général pour la fragmentation des peptides.

L'espèce doublement chargée est très peu sensible à la photofragmentation et les fragments c ou z caractéristiques de l'ECD, ne sont pas observés. La différence observée en UVPD entre le simplement et le doublement chargé pourrait s'expliquer par un changement du domaine d'absorption. Cependant la transition $\pi\pi-\pi\pi^*$ conduisant à la fragmentation suite à l'absorption d'un photon, reste dans le même domaine pour le Trp neutre ou protoné en phase gazeuse et en solution^[25, 42], cette bande d'absorption semble peu sensible à l'environnement.

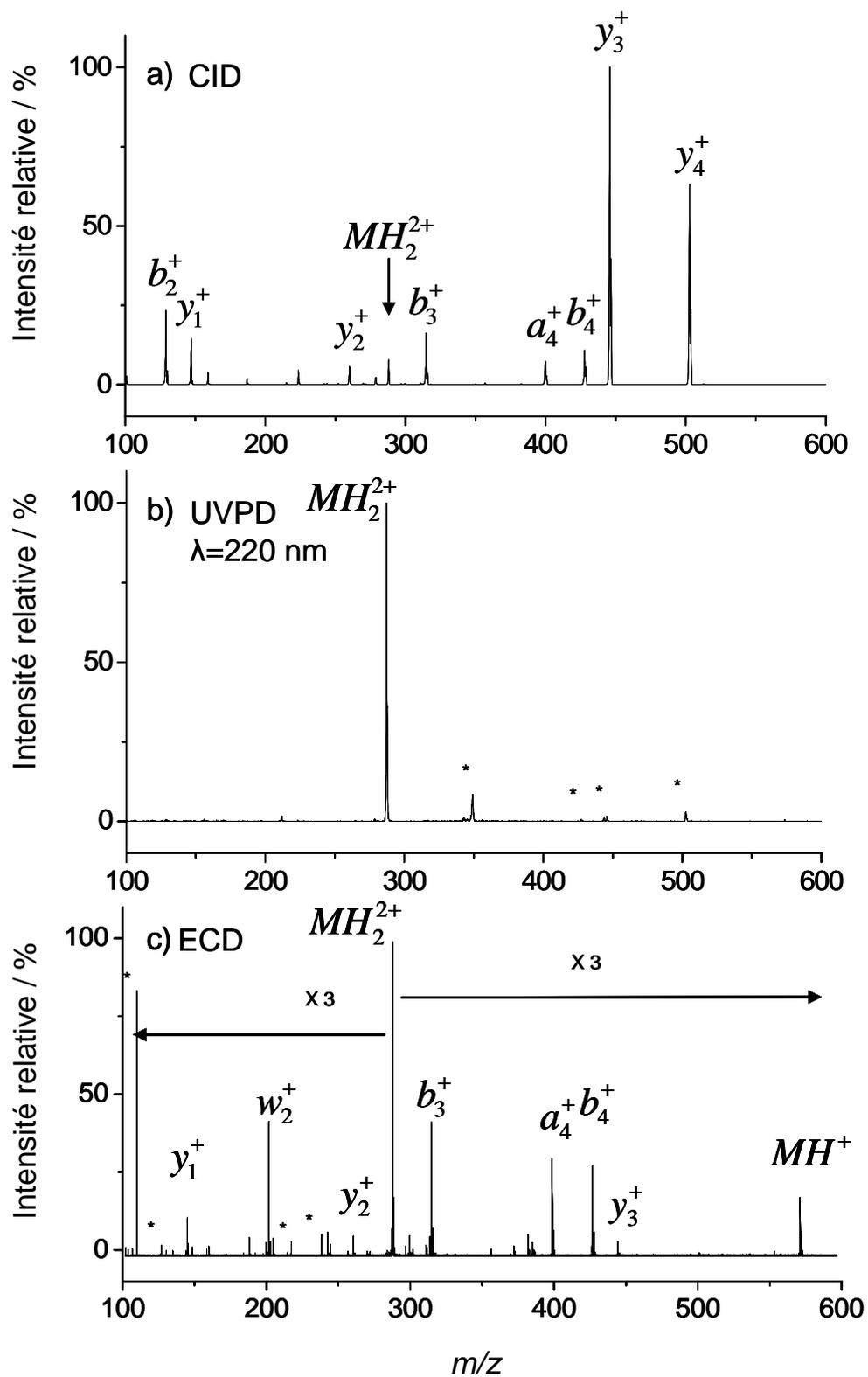


Figure 2.25 - Spectres de dissociation du doublement chargé. a) CID , b) UVPD à 220 nm et c) ECD.

2.4.3 Le modèle

Un modèle déjà évoqué, proposé par Sobolewsky *et al.*, permet de dégager quelques pistes. Le mécanisme de fragmentation est déclenché par le couplage entre l'état électronique $\pi\pi^*$ localisé sur l'indole et l'état dissociatif $\pi\sigma^*$, correspondant à un transfert de charge. La figure 2.26 permet de visualiser correctement ce processus. Suite à ce couplage, le NH_3 devient hypervalent et radicalaire. On peut, comme nous l'avons déjà vu, avoir deux évolutions : soit une dissociation vers la perte de H ou une conversion interne par couplage entre l'état $\pi\sigma^*$ et l'état fondamental. La perte de 130 est expliquée par un mécanisme un peu différent comme nous l'avons déjà évoqué. Pour que le processus de transfert de charge ait lieu, il semble nécessaire que le NH_3 soit proche de l'indole, sinon la fragmentation n'apparaît pas. Dans le cadre de ce modèle, la coordonnée de réaction et donc la géométrie du système joue un rôle fondamental. L'utilisation de simulations va apporter des informations sur les conformations les plus probables et permettre ainsi d'expliquer au moins qualitativement ces résultats.

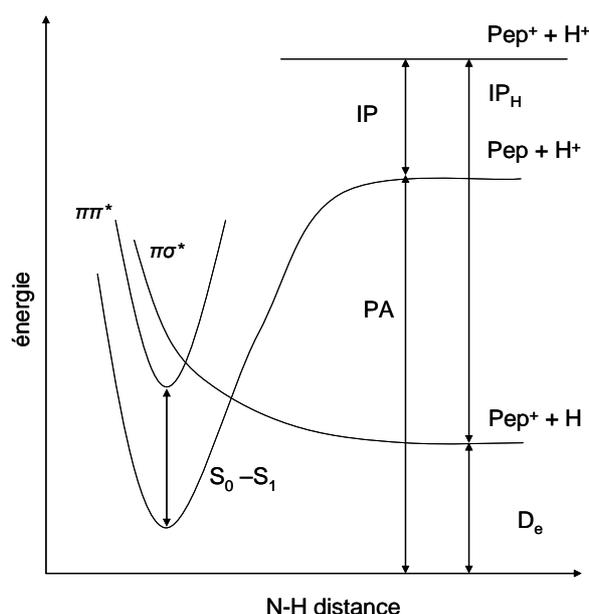


Figure 2.26 - Schéma du mécanisme de transfert d'électron entre l'indole du tryptophane et la charge^[27] pour un peptide noté « Pep ». S_0-S_1 est la transition depuis l'état fondamental vers l'état excité $\pi\pi^*$, supposé identique pour les molécules neutre et protoné. IP est le potentiel d'ionisation, IP_H est le potentiel d'ionisation de l'hydrogène (13.6 eV) et PA l'affinité protonique du peptide et D_e l'énergie de dissociation de l'hydrogène.

2.4.4 Simulation et interprétation

Les simulations ont été réalisées dans notre laboratoire par Pierre Poulain durant sa thèse soutenue en juillet 2006.^[43] Il s'est intéressé aux méthodes de simulation de structure à température finie pour des systèmes complexes comme les peptides et protéines.

Ses calculs utilisent le champ de force Amber96.^[44] Un algorithme de type Monte Carlo d'échange (REM, *Replica Exchange Monte Carlo*)^[45, 46] permet de faire évoluer structurellement le système afin d'explorer la surface d'énergie potentielle pour déterminer les différentes conformations possibles. Par rapport au Monte Carlo simple, le REM permet de mieux explorer le paysage énergétique. Pendant un algorithme de Monte Carlo, à une température donnée T_e , on choisit une structure initiale possible (i) et on détermine son énergie E_i , puis on modifie aléatoirement cette structure vers un état final (f) et on recalcule l'énergie E_f du nouvel état. La nouvelle structure est retenue dans les conditions suivantes :

$$\begin{aligned} E_f < E_i & \Rightarrow OK \\ E_f > E_i, \varepsilon < \exp\left(-\frac{E_f - E_i}{KT_e}\right) & \Rightarrow OK \end{aligned}$$

Autrement, on revient à la structure initiale et on recommence le tirage aléatoire de la prochaine structure, ε est un nombre aléatoire entre 0 et 1. Comme on le voit sur la figure 2.27 a), certaines zones de la surface de potentiel sont inexplorées à cause de barrières de potentiel trop élevées. Dans le REM, plusieurs simulations à différentes températures sont lancées simultanément et indépendamment, et à certains moments, on effectue un échange entre deux conformations de température différente. Cela permet ainsi de passer des barrières de potentiel (cf. figure 2.27 b)).

Les simulations ont été réalisées pour le pentapeptide simplement et doublement protonés, les charges (sous formes de protons) ont été positionnées sur les sites les plus basiques qui sont l'arginine et le N-terminal (alanine), $AGWLK^+$, A^+GWLK^+ . Les simulations en REM sont constituées de 9 répliques aux températures de 180, 206, 302, 380, 474, 588, 725, 893 et 1100 K. Les observables relevées au cours des simulations sont les distances entre l'atome d'azote de l'indole et de la lysine [$d(N_{\text{Indole}}-N_{\text{Lys}})$] et entre l'azote de l'indole et celui du N-terminal [$d(N_{\text{ter}}-N_{\text{Indole}})$].

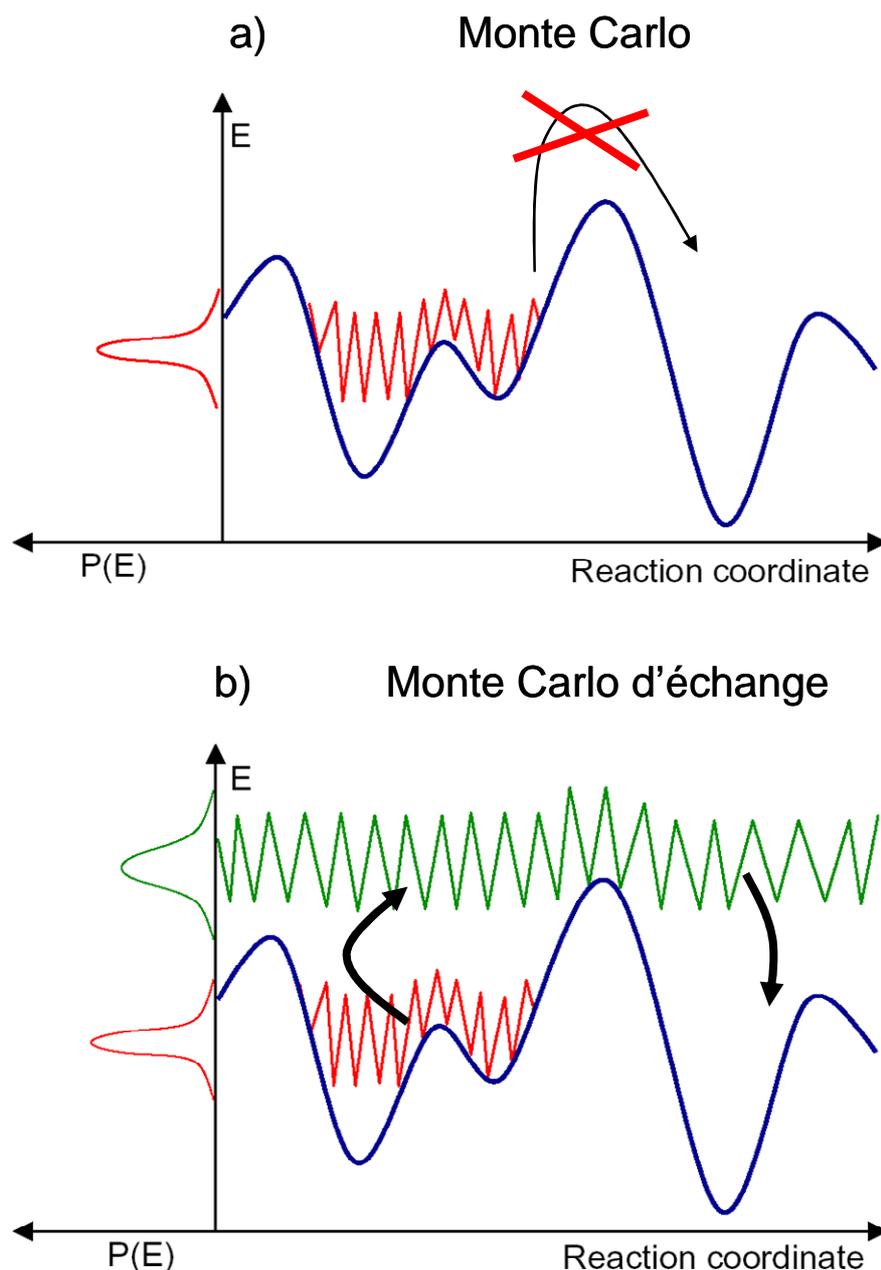


Figure 2.27 - Schéma de principe des méthodes de Monte Carlo (a) et de Monte Carlo d'échange (b).

Les résultats pour la température 302 K se présentent sous forme de carte à trois dimensions qui définissent des zones peuplées par les différentes structures. Les résultats du pentapeptide simplement chargé sont présentés sur la figure 2.28 a) et c). La structure la plus probable observée est un repliement de l'ion où la lysine protonée est proche de l'indole. Cette proximité entre l'indole et le proton permet un transfert de charge efficace qui conduit à la fragmentation. Pour le doublement chargé (cf. figure 2.28 b)), il n'y a pas de structure abondante où un proton est proche de l'indole. Le maximum sur la carte correspond à une

structure où les charges sont solvatées par les carbonyles. En moyenne la distance proton indole est élevée et aucun transfert de charge ne peut se produire. Cette géométrie peut donc expliquer la faible fragmentation observée pour le doublement chargé.

En ce qui concerne l'ECD, les fragments a, b, y sont observés lorsque les électrons ont une énergie élevée, 10 eV ou plus. C'est une expérience dite « d'ECD chaude ». Cooper a montré que les fragments a, b, y ne proviennent pas des c et z aussi observés dans ses expériences et il suggère que la fragmentation apparaît après une perte de H suite au dépôt d'énergie.^[47] Dans les mécanismes d'ECD, la neutralisation du proton qui induit un transfert d'hydrogène sur le squelette peptidique est en compétition avec la perte de H.

Les calculs Monte Carlo montre que le nombre d'interactions entre une charge et les carbonyles environnants est plus petit pour le doublement chargé. En prenant la distance de coupure entre l'atome d'hydrogène et l'atome d'oxygène à 2.5 Å, on a en moyenne 1.1 atome d'hydrogène (issue d'un NH₃⁺) en interaction avec un CO.

La perte d'hydrogène peut être favorisée lorsque la solvation du NH₃⁺ par le squelette peptidique est faible, ce qui est le cas pour les structures obtenues pour le doublement chargé. L'observation du fragment *m/z* 574 et a, b et c est en accord avec cette remarque.

En conclusion, les simulations nous ont permis de voir que la distance charge-indole est plus petite pour le simplement chargé. Cette proximité est en faveur du mécanisme pour l'UVPD proposé impliquant un transfert de charge entre l'indole et le NH₃. Par l'étude des conformations on peut ainsi expliquer la différence d'efficacité en UVPD entre le simplement et le doublement chargé.

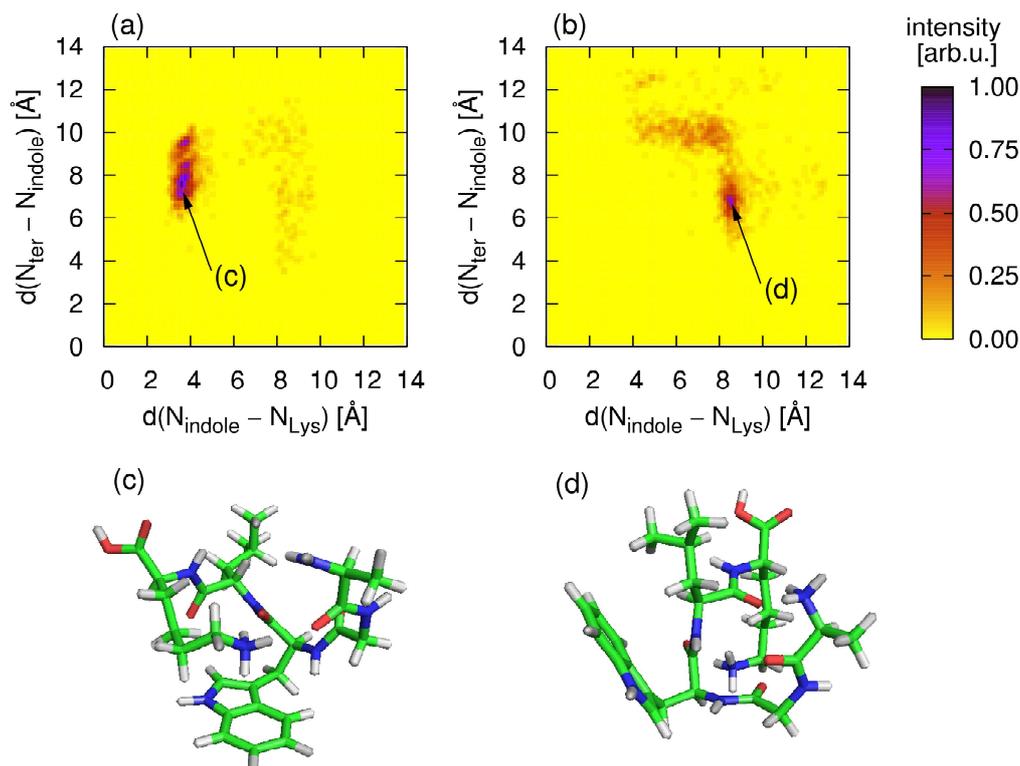


Figure 2.28 - Résultats des simulations. Cartes trois dimensions de la population en fonction des distances [$d(N_{\text{Indole}}-N_{\text{Lys}})$] et [$d(N_{\text{Indole}}-N_{\text{Lys}})$], a) simplement chargé et b) doublement chargé. Structures les plus probables observées, c) simplement chargé, d) doublement chargé.

2.5 Conclusion

La photodissociation de molécules d'intérêts biologiques possédant un chromophore naturel est efficace et fournit des fragments différents des autres méthodes telles que la CID ou l'ECD. En utilisant un OPO, nous avons réalisé des spectres de photodissociation à différentes longueurs d'onde, on observe que parmi les fragments obtenus certains dépendent fortement de la longueur d'onde utilisée. Les mécanismes mis en jeu sont complexes. Les expériences de MS^n apportent des informations importantes pour comprendre ces mécanismes, en particulier les liens de filiation. La formation d'espèce radicalaire suite à l'excitation électronique est fréquente et elle dépend fortement de la longueur d'onde. On peut contrôler un détachement d'hydrogène ou d'un groupe fonctionnel chromophore en ajustant la longueur d'onde. L'utilisation de ces espèces radicalaires dans des étapes successives de fragmentation montre que le radical permet de bloquer des voies de fragmentation non désirées et d'ouvrir des schémas de fragmentation plus complets, sans doute par un

abaissement global des barrières de potentiel dû au radical. Cela fournit des perspectives intéressantes en sciences analytiques. Le dernier point abordé dans ce chapitre a été la comparaison des simulations avec des expériences. Ces résultats suggèrent une forte influence du repliement de la molécule sur les mécanismes de fragmentation induit par les charges. Des expériences plus systématiques corrélées à des simulations sont nécessaires pour conclure. Si cela est vérifié, la fragmentation pourrait être utilisée pour suivre les changements de conformation des peptides ou des protéines en phase gazeuse.

Bibliographie

- [1] F. Kjeldsen, O. A. Silivra, R. A. Zubarev, Zwitterionic states in gas-phase polypeptide ions revealed by 157-nm ultra-violet photodissociation, *Chemistry-a European Journal* **2006**, *12*, 7920.
- [2] T. E. Creighton, *Proteins : Structures an Molecular Properties*, Second ed., Freeman, **1993**.
- [3] H. Du, R. A. Fuh, J. Li, A. Corkan, J. S. Lindsey, PhotochemCAD : A compute-aided design and research tool in photochemistry, *Photochemistry and Photobiology* **1998**, *68*, 141.
- [4] I. A. Papayannopoulos, The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides, *Mass Spectrometry Reviews* **1995**, *14*, 49.
- [5] B. Paizs, S. Suhai, Fragmentation pathways of protonated peptides, *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24*, 508.
- [6] V. H. Wysocki, G. Tsaprailis, L. L. Smith, L. A. Brexi, Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1399.
- [7] D. S. Bomse, R. L. Woodin, J. L. Beauchamp, Molecular activation with low-intensity CW infrared laser radiation. Multiphoton dissociation of ions derived from diethyl ether, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5503.
- [8] R. C. Dunbar, BIRD (blackbody infrared radiative dissociation): Evolution, principles, and applications, *Mass Spectrometry Reviews* **2004**, *23*, 127.
- [9] D. S. Gross, Y. Zhao, E. R. Williams, Dissociation of heme-globin complexes by blackbody infrared radiative dissociation: Molecular specificity in the gas phase?, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 519.
- [10] R. A. Zubarev, Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase, *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22*, 57.

- [11] J. E. P. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry, *PNAS* **2004**, *101*, 9528.
- [12] R. Antoine, L. Joly, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, J. Lemoine, Photo-induced formation of radical anion peptides. Electron photodetachment dissociation experiments, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 265.
- [13] R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty, Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3265.
- [14] H. J. Cooper, K. Håkansson, A. G. Marshall, The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis, *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24*, 201.
- [15] R. A. Zubarev, E. K. Fridriksson, D. M. Horn, N. L. Kelleher, N. A. Kruger, B. K. Carpenter, F. W. M. Lafferty, Account: Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation: a historical perspective and modern ideas, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 563.
- [16] H. Oh, K. Breuker, S. K. Sze, Y. Ge, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, Secondary and tertiary structures of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry and photofragment spectroscopy, *PNAS* **2002**, *99*, 15863.
- [17] C. M. Adams, F. Kjeldsen, R. A. Zubarev, B. A. Budnik, K. F. Haselmann, Electron capture dissociation distinguishes a single -amino acid in a protein and probes the tertiary structure, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15*, 1087.
- [18] W. Anusiewicz, J. Berdys-Kochanska, J. Simons, Electron attachment step in electron capture dissociation (ECD) and electron transfer dissociation (ETD), *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 5801.
- [19] P. Skurski, M. Sobczyk, J. Jakowski, J. Simons, Possible mechanisms for protecting N-C-alpha bonds in helical peptides from electron-capture (or transfer) dissociation, *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *265*, 197.
- [20] F. Turecek, N-C-alpha bond dissociation energies and kinetics in amide and peptide radicals. Is the dissociation a non-ergodic process?, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5954.

- [21] W. D. Bowers, S. S. Delbert, R. L. Hunter, R. T. McIver, Fragmentation of oligopeptide ions using ultraviolet laser radiation and fourier transform mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7288.
- [22] E. R. Williams, J. J. P. Furlong, F. W. McLafferty, Efficiency of Collisionally-activated dissociation and 193-nm photodissociation of peptide ions in fourier transform mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1990**, *1*, 288.
- [23] J. Y. Oh, J. H. Moon, M. S. Kim, Chromophore effect in photodissociation at 266 nm of protonated peptides generated by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI), *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*, 899.
- [24] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux, C. Juvet, Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive $1[\pi]^*$ states: A new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*, 1093.
- [25] F. O. Talbot, T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, Photodissociation spectroscopy of trapped protonated tryptophan, *The Journal of Chemical Physics* **2005**, *122*, 074310.
- [26] H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Juvet, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.-P. Schermann, M. Barat, J. A. Fayeton, Control of Bond-Cleaving Reactions of Free Protonated Tryptophan Ion by Femtosecond Laser Pulses, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 2417.
- [27] H. Kang, C. Juvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.-P. Schermann, M. Barat, J. A. Fayeton, Ultrafast deactivation mechanisms of protonated aromatic amino acids following UV excitation., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7*, 394.
- [28] D. Nolting, C. Marian, R. Weinkauff, Protonation effect on the electronic spectrum of tryptophan in the gas phase., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 2633.
- [29] H. ElAribi, G. Orlova, A. C. Hopkinson, K. W. M. Siu, Gas-Phase Fragmentation Reactions of Protonated Aromatic Amino Acids: Concomitant and Consecutive Neutral Eliminations and Radical Cation Formations, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3844.
- [30] V. Lepère, B. Lucas, M. Barat, J. A. Fayeton, Y. J. Picard, C. Juvet, P. Carcabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, A. Fujii, Comprehensive characterization of the photo-dissociation pathways of protonated tryptophan, *JCP* **2007**, *In press*.

- [31] H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.-P. Schermann, M. Barat, A. Fayeton, Control of Bond-Cleaving Reactions of Free Protonated Tryptophan Ion by Femtosecond Laser Pulses, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 2417.
- [32] T. R. Rizzo, Y. D. Park, L. Peteanu, D. H. Levy, Electronic spectrum of the amino acid tryptophan cooled in a supersonic molecular beam, *The Journal of Chemical Physics* **1985**, *83*, 4819.
- [33] G. Gregoire, C. Jouvet, C. Dedonder, A. L. Sobolewski, Ab initio Study of the Excited-State Deactivation Pathways of Protonated Tryptophan and Tyrosine, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6223.
- [34] W. Gabryelski, L. Li, Photo-induced dissociation of electrospray generated ions in an ion trap/time-of-flight mass spectrometer, *Review of Scientific Instruments* **1999**, *70*, 4192.
- [35] X. Cai, C. Dass, Structural characterization of methionine and leucine enkephalins by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 1.
- [36] T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, Specific photodissociation of peptides with multi-stage mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 2883.
- [37] J. Grotemeyer, E. W. Schlag, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 399.
- [38] B. Roux, M. Karplus, Ion transport in a model gramicidin channel. Structure and thermodynamics., *Biophys. J.* **1991**, *59*, 961.
- [39] R. Hodyss, H. A. Cox, J. L. Beauchamp, Bioconjugates for Tunable Peptide Fragmentation: Free Radical Initiated Peptide Sequencing (FRIPS), *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12436.
- [40] L. Joly, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, J. Lemoine, Specific UV photodissociation of tyrosyl-containing peptides in multistage mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42*, 818.
- [41] J. Laskin, J. H. Futrell, Collisional activation of peptide ions in FT-ICR mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22*, 158.
- [42] T. R. Rizzo, Y. D. Park, L. A. Peteanu, D. H. Levy, The electronic spectrum of the amino acid tryptophan in the gas phase, *The Journal of Chemical Physics* **1986**, *84*, 2534.
- [43] P. Poulain, Science thesis, Claude bernard LYON1 (LYON), **2006**.

- [44] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179.
- [45] P. Poulain, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, Monte Carlo simulations of flexible molecules in a static electric field: electric dipole and conformation, *Chemical Physics Letters* **2005**, *401*, 1.
- [46] R. H. Swendsen, J.-S. Wang, Replica Monte Carlo Simulation of Spin-Glasses, *Physical Review Letters* **1986**, *57*, 2607 LP
- [47] H. J. Cooper, Investigation of the Presence of b Ions in Electron Capture Dissociation Mass Spectra, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1932.

CHAPITRE III

SYSTEMES COMPLEXES HYBRIDES : AGREGAT METALLIQUE-BIOMOLECULE

3.1	Introduction.....	108
3.2	Production de complexe biomolécule-métal.....	110
3.2.1	Source electrospray et complexe de tryptophane argent.....	110
3.2.2	Différents types de complexes produits.....	112
3.2.3	Mécanisme proposé pour la formation des complexes.....	114
3.2.4	Etude des complexes par CID et MS ⁿ	116
3.3	Du tryptophane protoné au tryptophane argent : propriétés optiques.....	118
3.3.1	Méthodes expérimentales et théoriques.....	118
3.3.2	Tryptophane protoné.....	119
3.3.3	Tryptophane argent.....	122
3.4	Complexes tryptophane agrégat d'argent : effet de taille et de structure.....	127
3.4.1	Structures CS et ZW.....	127
3.4.2	Spectres calculés pour les complexe tryptophane-agrégat d'argent.....	128
3.5	Photodissociation et voies de fragmentation de [Trp•Ag _n] ⁺	135
3.5.1	Section efficace de photodissociation et taille.....	136
3.5.2	Spectre de photodissociation et structure.....	138
3.5.3	Canaux de fragmentation spécifique.....	144

CHAPITRE III

SYSTEMES COMPLEXES HYBRIDES : AGREGAT METALLIQUE-BIOMOLECULE

3.1 Introduction

Depuis quelques années les nanoparticules métalliques et en particulier les nanoparticules d'argent sont utilisées pour de nombreuses applications. Elles présentent des propriétés optiques adaptatives, due à la position du plasmon qui dépend de la taille de la particule.^[1] Leur utilisation ouvrent des perspectives dans les domaines du stockage optique d'information, des composants pour l'optique logique et de la biosensibilité.^[2, 3]

L'étude des interactions entre des objets métalliques et des biomolécules implique, entre autre, un couplage entre le plasmon de surface du métal et l'excitation de la biomolécule. Ces études peuvent ouvrir de multiples portes pour la compréhension et l'analyse de biomolécules.

Récemment, de petits agrégats d'argent ont été reconnus comme une sonde particulièrement adaptée à la reconnaissance de biomolécule par leur biocompatibilité. On peut utiliser la nanoparticule comme fluorophore pour marquer certaines molécules ou cellules.^[4] Les applications des nanoparticules comme sonde pour la biologie sont aussi basées sur la remarquable augmentation d'efficacité des processus de photoabsorption et d'émission, observés sur des biomolécules au contact (ou proches) de surfaces métalliques ou de petits agrégats.^[3] On utilise notamment ce phénomène dans des expériences de fluorescence ou de diffusion raman sur une particule unique.^[5] Par exemple le SERS (*Surface Enhancement Raman Spectroscopy*) consiste à réaliser des expériences de spectroscopie Raman sur des biomolécules déposées sur un film d'argent. L'excitation a lieu dans la bande de plasmon de l'argent, il y a alors amplification du champ électronique au niveau de la biomolécule et possibilité d'enregistrer des spectres sur une biomolécule unique. Un autre

exemple est l'utilisation du SPR (*Surface Plasmon Resonance*) couplé à la spectrométrie de masse, le SPR permet de quantifier et d'isoler une protéine et la spectrométrie de l'étudier.^[6]

L'étude d'un système hybride constitué d'une biomolécule et d'un atome ou d'une petite nanoparticule métallique peut fournir les bases pour comprendre les propriétés structurales, les transferts de charges, et les transferts d'excitation dans des complexes métal-biomolécule. En utilisant un système modèle de petites tailles en phases gazeuses, on pourra comparer les résultats expérimentaux à des calculs *ab initio* et obtenir une description précise de la structure, des états électroniques excités du système et de la densité de charge. Des résultats disponibles dans la littérature sur des complexes métal-biomolécule en phase gazeuse ont été obtenus sur des systèmes comportant un atome ou un cation métallique et un acide aminé^[7] ou une protéine^[8, 9].

En particulier, les études de Shoeib et Sui par dissociation obtenue par collision associée à des calculs de DFT ont permis d'obtenir des informations sur les structures, sur la stabilité des liaisons ainsi que sur la fragmentation de complexes métal-acide aminé^[10] et notamment sur des complexes d'argent et d'acide aminé.^[11, 12]

Les travaux en spectroscopie infrarouge sur des complexes de sodium et d'acides aminés permettant d'accéder à la structure de l'état fondamental grâce à la signature vibrationnelle.^[7] La spectroscopie infrarouge permet notamment de différencier des structures zwitterioniques de structures de type charge solvatée.^[7, 13-16] Les études en phase gazeuse de molécule organo-métallique par Willey et *al.*^[17, 18] et Yang et *al.*^[19] ont également montré que le transfert de charges peut être l'étape initiale dans la photofragmentation de tels systèmes.

Dans ce chapitre, je vais présenter les études menées sur des systèmes complexes agrégats d'argents tryptophane. Ces études ont été réalisées en collaboration avec le groupe de Chimie théorique de l'Université de Humbolt à Berlin dirigé par le professeur Vlasta Bonacic-Koutecky. Les expériences de photofragmentation permettent d'obtenir des spectres optiques. Les calculs nous donneront les structures, les spectres d'absorption et les transitions caractéristiques associées. L'étude portera sur différentes tailles d'agrégats, $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_n^+$ ($n=1-5,9$).

Nous verrons que ces systèmes peuvent adopter deux types de structures : CS et ZW. La nature des excitations électroniques dépend de la structure du complexe. Nous verrons que la comparaison entre les résultats expérimentaux et théoriques (notamment les voies de

fragmentations) permet de déterminer la structure du complexe et donc la nature des excitations observées.

3.2 Production de complexe biomolécule-métal

3.2.1 Source electrospray et complexe de tryptophane argent.

Les complexes avec cations métalliques sont produits dès la présence de très faible quantité de cation métallique dans la solution.^[11, 20, 21] Quelques publications montrent qu'il est possible de former des complexes « agrégats-ions » à partir d'une solution.^[22, 23] Par exemple des complexes d'argent avec des peptides ont pu être formés par une source electrospray à partir d'un mélange en solution de sel métallique et de peptide ou d'acide aminé.^[24] O'Hair et *al.* ont montré la possibilité de produire de petits agrégats d'argent (Ag_4H) par dissociation multiple (MS^4) à partir de complexes peptide-argent.^[25] Au cours de ce travail, nous avons pu pour la première fois produire et manipuler des agrégats de taille > 10 par une approche similaire.^[26]

Nous avons utilisé un mélange d'une solution de sel de nitrate d'argent à 1 mM dans eau/méthanol 50/50 (v/v) et d'une solution de tryptophane à 200 μ M dans eau/méthanol 50/50 (v/v). 3% d'acide acétique ont été rajouté à la solution finale. La solution est injectée dans la source electrospray. Après des réglages adaptés de la source, on obtient le spectre de masse présenté sur la figure 3.1. Parmi les nombreuses solutions préparées, différents modes opératoires ont été utilisés en terme de concentration de Trp et d'Ag et en proportion d'eau/méthanol. Les paramètres de source ont été adaptés à chaque solution pour optimiser le signal.

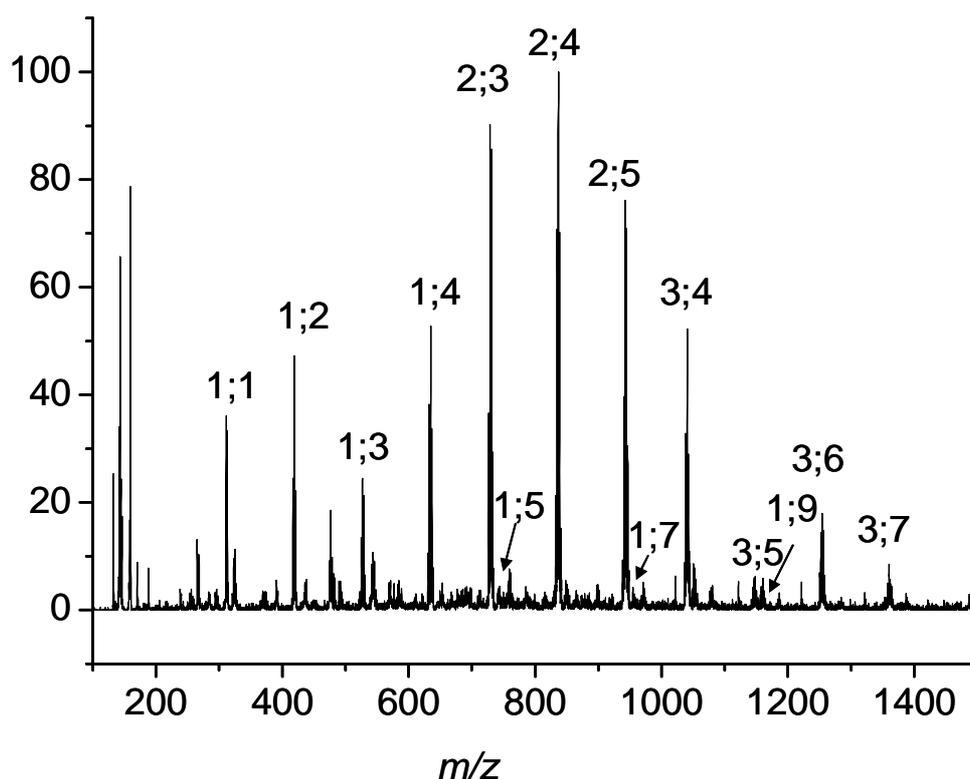


Figure 3.1 - Spectre de masse issue d'une solution de tryptophane et de nitrate d'argent. Les étiquettes correspondent aux complexes tryptophane argent $n;m$ où n est le nombre de tryptophane et m le nombre d'atome d'argent.

1;1	$[\text{Trp}+\text{Ag}]^{\bar{+}}$	2;3	$[(\text{Trp}-\text{H}+\text{Ag})_2+\text{Ag}]^+$
1;2	$[\text{Trp}-\text{H}+\text{Ag}_2]^{\bar{+}}$	2;4	$[2\text{Trp}-3\text{H}+4\text{Ag}]^+$
1;3	$[\text{Trp}+\text{Ag}_3]^{\bar{+}}$	2;5	$[2\text{Trp}-4\text{H}+5\text{Ag}]^+$
1;4	$[\text{Trp}-\text{H}+\text{Ag}_4]^{\bar{+}}$	3;4	$[(\text{Trp}-\text{H}+\text{Ag})_3+\text{Ag}]^+$
1;5	$[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_5]^{\bar{+}}$	3;6	$[3\text{Trp}-4\text{H}+5\text{Ag}]^+$
1;7	$[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_7]^{\bar{+}}$	3;7	$[3\text{Trp}-5\text{H}+6\text{Ag}]^+$
1;9	$[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_9]^{\bar{+}}$		

Tableau 3.1 - Stoechiométrie des espèces produites par la source électrospray et observées dans le spectromètre de masse. Observation réalisée par zoom scan.

3.2.2 Différents types de complexes produits

Sur la figure 3.1, on observe différents pics correspondants aux espèces produites dans la source. Les étiquettes utilisées pour noter les différentes espèces ont la forme générale $n;m$ où n correspond au nombre de tryptophane et m au nombre d'atomes d'argent. Notre attention s'est portée sur les complexes ne contenant qu'un seul tryptophane auquel est attaché un ou plusieurs atomes d'argent.

Le premier problème posé par ces résultats est la composition exacte du complexe. Pour pouvoir répondre à cette question essentielle, nous utilisons dans un premier temps le mode zoom scan pour obtenir la distribution isotopique des espèces observées dans le piège. Nous prenons le complexe 1;7 pour illustrer la démarche. Sur la figure 3.2 a), en encart, nous avons le spectre zoom scan enregistré, il est en accord avec le spectre théorique calculé de l'espèce $[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_7]^+$. Il est important de noter que nous ne sommes pas en présence d'une substitution de n atomes d'hydrogène par n atomes d'argent comme par exemple, en encart, le spectre théorique de $[\text{Trp}-6\text{H}+6\text{Ag}]\text{Ag}^+$. En revanche, on voit qu'il y a perte de deux atomes d'hydrogène, $[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_7]^+$. Dans un second temps, la CID sur le $[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_7]^+$, sur le spectre de la figure 3.2 b), produit un agrégat pur Ag_7^+ . Cela nous montre que le complexe $[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_7]^+$ contient un tryptophane moins 2H associé à un agrégat d'argent Ag_7^+ .

Pour les complexes de type $[\text{Trp}\cdot\text{Ag}_n]^+$, nous avons observé les formes exactes suivantes : $[\text{Trp}+\text{Ag}]^+$, $[\text{Trp}+\text{Ag}_3]^+$, $[\text{Trp}-\text{H}+\text{Ag}_n]^+$ ($n=2,4,6,8$) et $[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_n]^+$ ($n=5, 7, 9$).^[26] Ces stochiométries correspondent toutes à des systèmes comportant un nombre pair d'électrons et sont résumées dans le tableau 3.1. Par la suite avec d'autres solutions, nous avons obtenu pour le complexe 1;9, la forme $[\text{Trp}+\text{Ag}_9]^+$. Le processus de formation reste encore mal maîtrisé. Il faut être prudent lorsque l'on change de solution ou lorsque la solution vieillit (substitution par hydrogène amplifiée). C'est d'ailleurs une des raisons qui a imposé le contrôle systématique de l'espèce étudiée par l'analyse des distributions isotopiques.

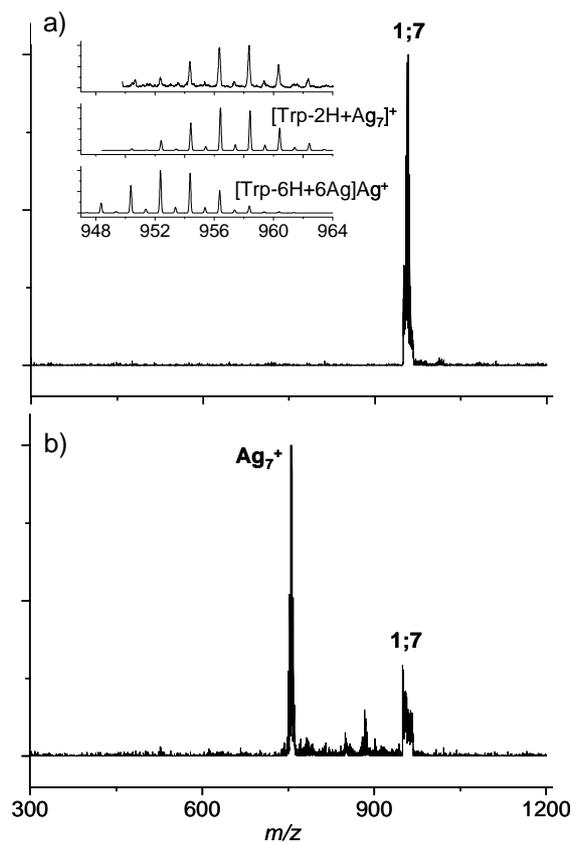


Figure 3.2 - Spectre de $[Trp-2H+Ag_7]^+$, a) isolation de $[Trp-2H+Ag_7]^+$, en insert le zoom scan et des spectres théoriques correspondant à des formes différentes : $[Trp-2H+Ag_7]^+$, $[Trp+(Ag_6-H)]Ag^+$. b) spectre CID de $[Trp-2H+Ag_7]^+$.

A titre de comparaison, la figure 3.3 montre des résultats similaires enregistrés pour le peptide, substance P. Dans ce cas on voit que les argents ont substitué des atomes d'hydrogène du peptide et qu'il n'y a sans doute pas de formation d'agrégat.

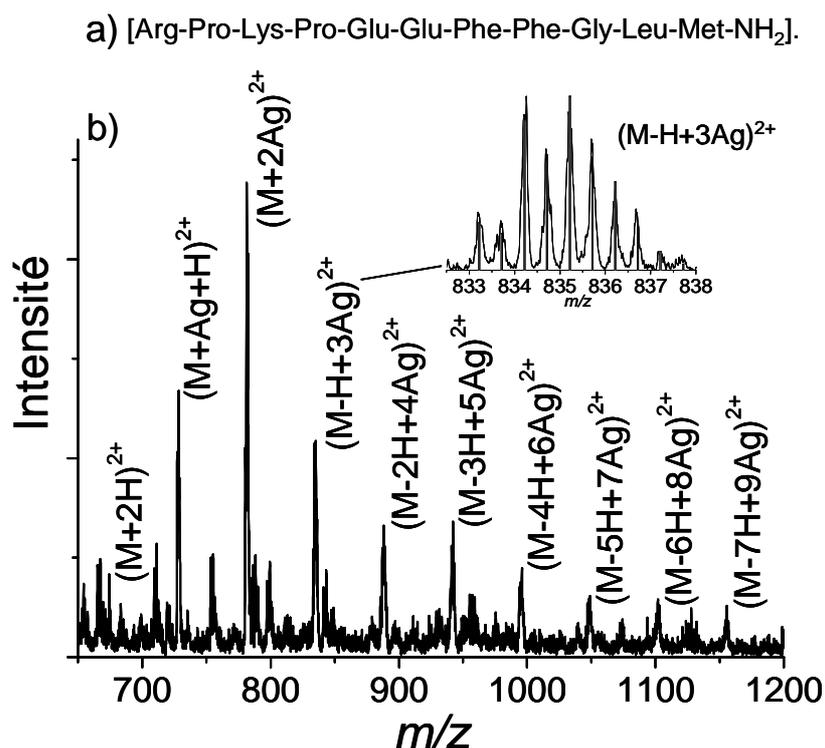


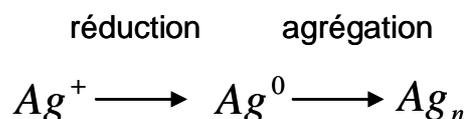
Figure 3.3 - a) séquence de la substance P. b) spectre de masse d'une solution de substance P et de nitrate d'argent. Les compositions des espèces observées montrent que la substitution argent hydrogène est systématique.

3.2.3 Mécanisme proposé pour la formation des complexes

Deux observations sont importantes pour comprendre la formation de ces complexes. Le spectre UV-vis de la solution ne présente pas de résonance plasmon, ce qui indique que les atomes d'argent ne sont pas sous forme d'agrégat dans la solution. De plus, lorsque nous injectons une solution pure de sel d'argent nous n'observons aucun agrégat, la formation d'agrégats nécessite la présence d'une molécule organique.

La formation d'un complexe composé d'un cation métallique avec un acide aminé ou un peptique à partir d'une source electrospray est facile^[8, 9, 13] et peut être parfois source de pollution, par exemple, pollution des spectres de masse par du sodium. Par contre, le mécanisme conduisant à la formation des complexes agrégat-biomolécule est plus complexe. Nous nous appuyons sur nos résultats et ceux de O'Hair et *al.*^[25, 27, 28] pour proposer un mécanisme de formation.

Pour que l'agrégation d'atomes d'argent ait lieu, il faut d'abord une réduction initiale du cation métallique présent en solution :



En utilisant une solution avec du sel d'argent et de la glycine (G), O'hair observe en sortie de son spray des espèces de forme $[(G-H+Ag)_n+Ag]^+$ jusqu'à $n=6$. Dans notre cas on observe aussi ce type de systèmes notés 2;3 et 3;4 (cf. figure 3.1) avec la même composition (cf. tableau 3.1). Ensuite, par réaction collisionnelle sur ces espèces il obtient de nouveaux complexes dont entre autres, $[G+3Ag]^+$ et $[G+4Ag-H]^+$. La formation de ce type de système nécessite :

- (1) la formation d'un précurseur du type $[Ag(AgX)_n]^+$ par l'électrospray puis,
- (2) que le ligand X possède des propriétés d'oxydoréduction favorable pour faciliter la réduction de Ag^+ lors de l'activation par CID.

Selon ces observations, la présence simultanée du groupe amine et carboxylique d'un acide aminé en fait le candidat parfait pour réaliser ces deux étapes. En effet, lorsque l'acide aminé ne possède plus sa fonction amine (par exemple acétate, Ac), la réduction de complexe $[Ag(AgOAc)_n]^+$ n'a plus lieu. Et en utilisant le méthyle ester de glycine (suppression la fonction acide) les complexes de l'étape (1) ne sont plus réduits.^[27, 28] L'acide aminé tryptophane (dans notre cas) ou glycine (dans le cas de O'Hair) joue un rôle de réducteur pour les atomes d'argent. Nous proposons un mécanisme sur la figure 3.4.

Notons que pour les peptides, les fonctions amine et acide se trouve beaucoup plus espacé et ce mécanisme de réduction est plus délicat à réaliser. Pour la substance P présentée, on peut faire remarquer que la fonction acide est bloquée par un NH_2 .

Dans notre cas nous obtenons directement des complexes formés dans le piège. Les conditions de source sont critiques et, comme on le sait, une fragmentation en source (CID in-source) est fortement probable. Notre hypothèse est que, dans notre cas, les réactions induites par collision proposées par O'Hair se produisent dans la source. De plus, la multitude des espèces qu'il observe et les nombreuses réactions qui s'en suivent, peuvent expliquer la composition des espèce que nous observons.^[28]

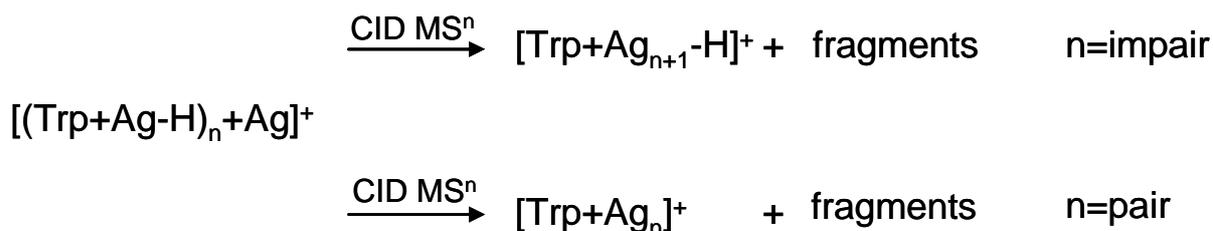


Figure 3.4 - Schéma de réaction proposé pour la formation de complexe tryptophane agrégats d'argent induit par collision en source.

3.2.4 Etude des complexes par CID et MSⁿ

Lorsque les complexes sont produits, ils peuvent être manipulés dans le piège. L'un des principaux atouts du piège est sa gamme dynamique c'est-à-dire sa capacité à isoler un type d'ion présent en quantité infime dans le piège. Sur la figure 3.1, on voit que le complexe 1;7 peut être isolé, pourtant le pic est à 10⁻² % (du signal maximum). Lorsqu'on isole ce pic, le mode AGC va augmenter le temps d'injection jusqu'à ce que le pic soit détectable. Le système est capable de charger le piège pendant un temps très long (quelques secondes). On peut alors isoler un pic donné en éjectant tous les autres ions piégés et le fragmenter comme le montre la figure 3.5, malgré un signal relatif extrêmement faible.

Les expériences de MSⁿ permettent de réaliser des manipulations variées sur les complexes et les agrégats. Comme présenté sur la figure 3.5, nous pouvons, à partir de l'espèce [Trp-2H+Ag₉]⁺, produire par CID (MS²) l'agrégat pur Ag₉⁺. Cet agrégat pur peut ensuite être isolé (voir figure 3.5) (a) puis fragmenté (b). On peut réitérer cette méthode et observer la fragmentation successive des agrégats par évaporation d'atomes d'argent. On peut ainsi observer la filiation complète de Ag₉⁺ et donc contrôler complètement l'histoire de la fragmentation. Sur ces spectres de fragmentation, on retrouve la stabilité particulière des agrégats comportant un nombre pair d'électrons. Les fragments obtenus sont en accord avec ceux rapportés par Schweikhard et al.^[29] où les agrégats sont produits par évaporation laser et la CID est réalisée dans un piège de Penning. Deux points notables de cette expérience sont à relever. Malgré le faible signal du complexe 1;9 observé sur la figure 3.1, nous avons été capable d'effectuer jusqu'à six étapes de MS (MS⁶). D'autre part, la manipulation des agrégats d'argent (par CID ou UVPD) issue d'une source electrospray dans un piège est réalisable.

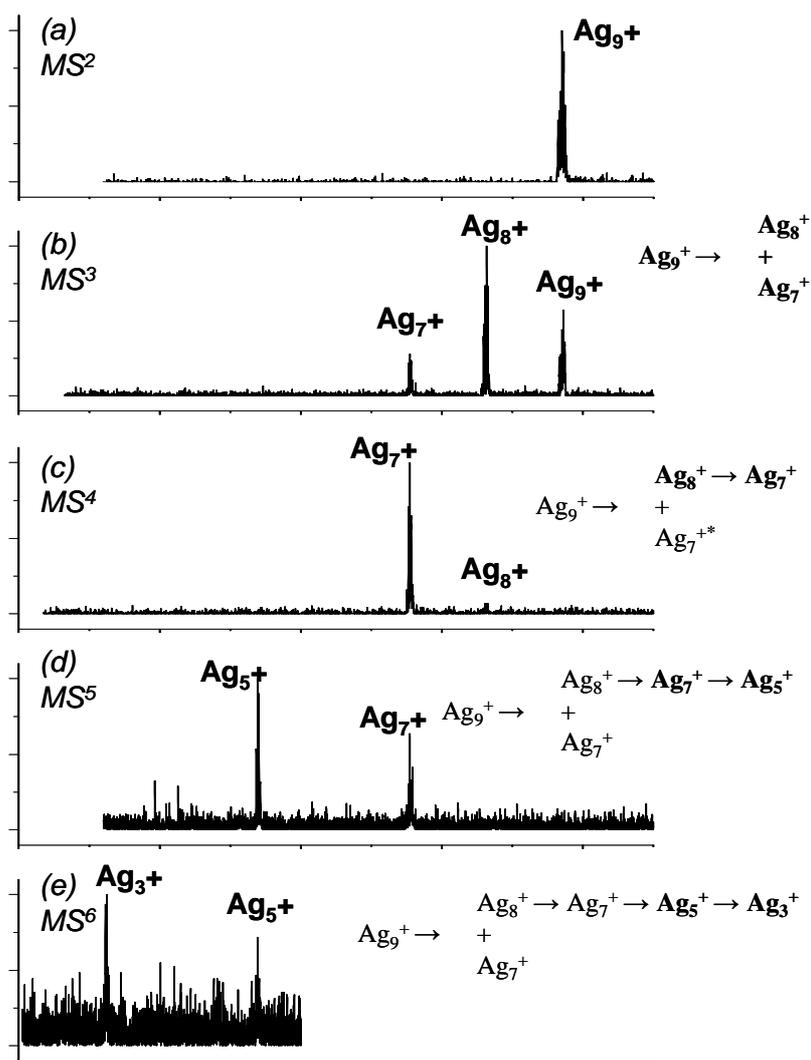


Figure 3.5 - Spectre de masse par multiple étape (MS^n) d'agrégat d'argent. L'agrégat d'argent parent Ag_9^+ a été produit à partir du $[Trp-2H+Ag_9]^+$. L'encart du spectre a) montre la pureté de l'agrégat. Des étapes successives de CID sont réalisées a) sur l' Ag_9^+ , b) sur le Ag_8^+ fragment de Ag_9^+ , c) sur l' Ag_7^+ issue de Ag_8^+ et pour finir sur l' Ag_5^+ produit de Ag_7^+ . Les schémas de fragmentation représentés à chaque étape.

3.3 Du tryptophane protoné au tryptophane argent : propriétés optiques

3.3.1 Méthodes expérimentales et théoriques

Expérience. Les expériences présentées dans ce chapitre permettent de réaliser des spectres optiques de photodissociation résolus en longueur d'onde.

En balayant la longueur d'onde du laser à l'aide de l'OPO, on va pouvoir enregistrer un spectre de photodissociation pour chaque longueur d'onde sur la gamme 215 à 320 nm par pas de 2.5 nm. En faisant le bilan des fragments produits lors de chaque spectre, on obtient la section efficace de photodissociation par la formule suivante :

$$\sigma(\lambda) = \frac{1}{\Phi} \ln \left(\frac{\text{parent} + \Sigma \text{fragments}}{\text{parent}} \right) \quad 1-1$$

où *parent* est l'aire du pic parent, $\Sigma \text{fragment}$ est la somme des aires de chaque pic fragment et Φ est la fluence laser calculée à partir de la puissance laser recueillie pendant l'acquisition par une réflexion sur une lame quartz (cf. chapitre I). Cette grandeur est proportionnelle au nombre de photons injectés sur le nuage d'ions. La puissance laser injectée dans le piège est inférieure à 200 μJ par pulse.

A partir de ces résultats expérimentaux on peut obtenir trois informations pour l'analyse. i) la courbe de section efficace de photodissociation. ii) les différentes voies de fragmentations observées sur les spectres de masse. iii) les rapports de branchement de ces différentes voies en fonction de la longueur d'onde.

Théorie. L'ensemble des calculs a été réalisé par le groupe du professeur Bonacic Koutecky à Berlin.

Structure. Les propriétés structurelles dans l'état fondamental sont déterminés par la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) avec une fonctionnelle hybride B3LYP.^[30, 31] La recherche initiale de conformation utilise une procédure de simulation par dynamique moléculaire dans le cadre d'une méthode semi empirique AM1. Les structures ainsi obtenues sont ré-optimisées avec la méthode DFT en utilisant pour l'atome ou l'agrégat d'argent, le potentiel 19el- RECP du groupe de Stuttgart.^[32] Pour le tryptophane, la base d'orbital

atomique 6-311G** augmentée par des fonctions diffuses est utilisée pour une description appropriée et plus précises des états excités.

Réponse optique. Les spectres d'absorption optique ont été obtenus par TD-DFT (théorie de la fonctionnelle de la densité dépendant du temps) en utilisant le pseudo potentiel 11eI- RECP (développé par le groupe de Koutecky^[32]). Le potentiel a été optimisé pour décrire de manière précise les états électroniques excités des agrégats d'argent.

Les spectres obtenus par le calcul vont se présenter sous deux formes distinctes. i) le spectre d'absorption optique à 0 K avec représentation des transitions par des barres (ou moyennées par des lorentziennes). ii) Pour certaines tailles le spectre d'absorption optique simulé à température finie T (300 K).

Dans ce cas, le spectre est obtenu en réalisant un calcul de dynamique moléculaire à T=300K dans l'état fondamental et en calculant à intervalles de temps réguliers le spectre d'absorption optique correspondant à la géométrie obtenue. Deux niveaux de calculs ont été utilisés. Pour le TrpH⁺, TrpAg⁺ un calcul de dynamique moléculaire avec la méthode semi-empirique de type AM1 puis un calcul des états excités avec cette méthode en incluant les interactions de configuration. Pour TrpAg₃⁺, la dynamique a été réalisée avec la DFT, les états excités par un calcul de TD-DFT et l'ensemble avec une base plus réduite que celle donnée dans le paragraphe précédent.

3.3.2 Tryptophane protoné

Spectre optique. Le spectre du rendement de photodissociation mesuré pour le tryptophane protoné en fonction de la longueur d'onde est donné figure 3.6 a). Une photodissociation a été observée pour les longueurs d'ondes inférieures à 310 nm avec une large bande centrée autour de 270 nm. Ce spectre est en accord avec le spectre partiel (270 nm à 295 nm) mesuré par Weinkauff *et al.*^[33] De plus la photodissociation est obtenue dans le domaine optique pour lequel une absorption est observée pour le tryptophane en solution^[34] et en phase gazeuse.^[35] Le spectre calculé par le groupe de Vlasta Bonacic Koutecky est montré sur la figure 3.6 b). La courbe correspond à un spectre calculé à 300 K avec la méthode AM1, les traits verticaux indiquent les transitions TD-DFT. Excepté pour la partie haute énergie dont les états n'ont pas été inclus dans le calcul AM1, les résultats expérimentaux et théoriques sont en bon accord. La large bande observée autour de 260 nm sur le spectre expérimental est attribuée à la transition π - π^* représentée sur le spectre théorique b), ce qui

est en accord avec les différents calculs de la littérature.^[36-40] Une transition de type transfert de charge (CT) est calculée à 270 nm, la force d'oscillateur correspondante est faible. Sur la figure c), une représentation des orbitales HOMO et LUMO permet de voir les charges se transférer de l'indole vers le NH_3^+ lors de la transition CT.

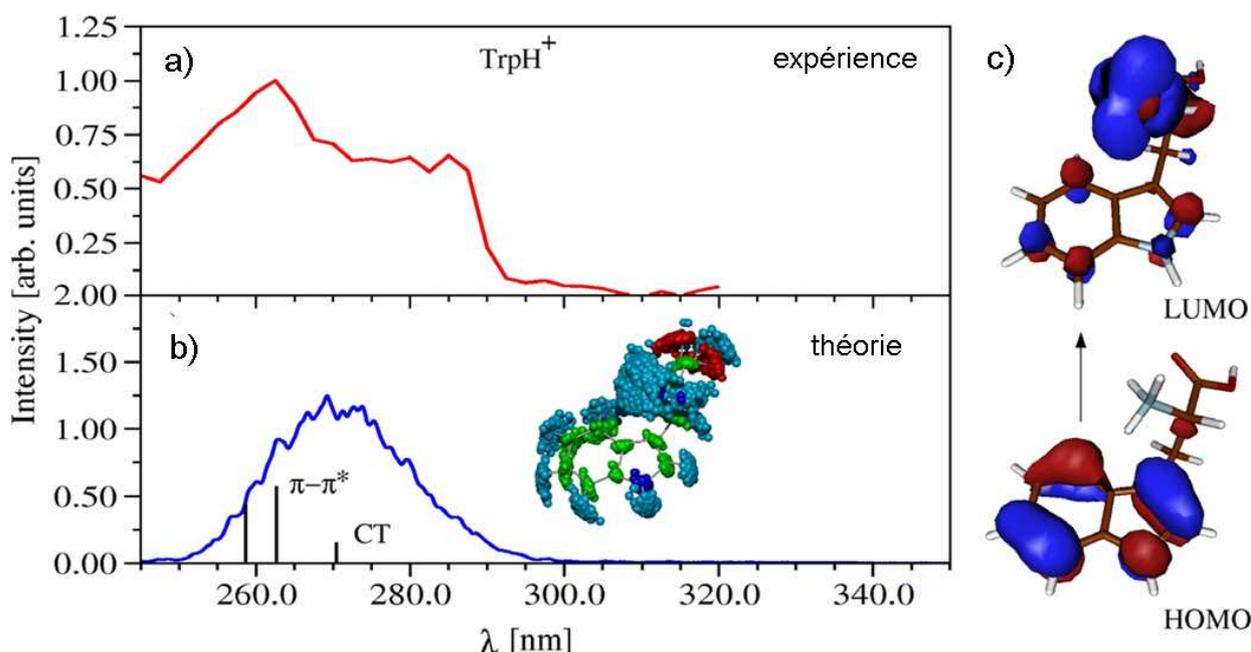


Figure 3.6 - Spectre optique du $[\text{Trp}+\text{H}]^+$. a) courbe de section efficace de photodissociation mesurée, b) courbe d'absorption optique calculée, les traits verticaux correspondent aux principales transitions calculées à 0 K° ($\pi\pi^*$ et un transfert de charge (CT)). En insert, on voit la représentation de la vibration des atomes à 300 K° autour de la position d'équilibre. c) déplacement des orbitales HOMO vers LUMO lors de la transition à CT.

Rapport de Branchement. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de la fragmentation de nos systèmes suite à une excitation électronique, nous avons tracé les rapports de branchement des différents fragments sur la figure 3.7. Cette information donne le chemin réactionnel le plus favorable en fonction de la longueur d'onde. On constate que les fragments n'évoluent pas de la même manière et peuvent dépendre fortement de la longueur d'onde. L'interprétation de ces courbes est délicate, l'irradiation dure ici 1s (50 pulses laser) donc les fragments produits peuvent absorber des photons et des fragmentations successives peuvent avoir lieu. On peut cependant dégager quelques informations importantes.

Par exemple, le fragment de masse m/z 204, correspondant à la perte d'un H, apparaît au centre de la bande observée (240 – 280 nm). Cette observation est en accord avec la proposition de mécanisme de Jouvét présenté au chapitre II, où la perte de H est induite par le

transfert sur l'état $\pi\text{-}\pi^*$ activé à 266 nm et qui est suivie d'un croisement avec l'état dissociatif $\sigma\pi^*$. Cette transition correspond au transfert de charge vers le NH_3^+ qui est observé autour de 270 nm (cf. figure 3.6 c)).

Le fragment m/z 130 correspondant à la chaîne latérale du tryptophane, est majoritaire au dessous de 240 nm. Cette observation est en faveur des mécanismes proposés dans le chapitre II, les niveaux électroniques atteints permettent de dissocier plus rapidement dans la voie de fragmentation du 130 que dans les autres voies. Cette rupture de la liaison $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ a déjà été faite sur des spectres de dissociation en UVPD dans le chapitre précédent, par exemple pour la leucine enképhaline ou la gramicidine.

Le fragment 146 est le fragment principal observé dans la zone correspondant au transfert de charge. Ce transfert de charge neutralise le NH_3^+ , ce qui se traduit par l'apparition d'une charge sur l'indole. On remarque que ce mécanisme est très similaire à celui décrit pour la perte de H. Cependant dans ce cas il n'y pas assez d'énergie pour coupler l'état dissociatif qui conduit à la perte de H et il y a recombinaison du H *via* une conversion interne (cf. figure 2.12).

Il est cependant difficile d'aller plus loin dans une quelconque interprétation à cause, d'une part, de la complexité de filiation observé pour les différents fragments (cf. chapitre II) et d'autre part du temps élevé d'activation laser (1 s, 50 pulses).

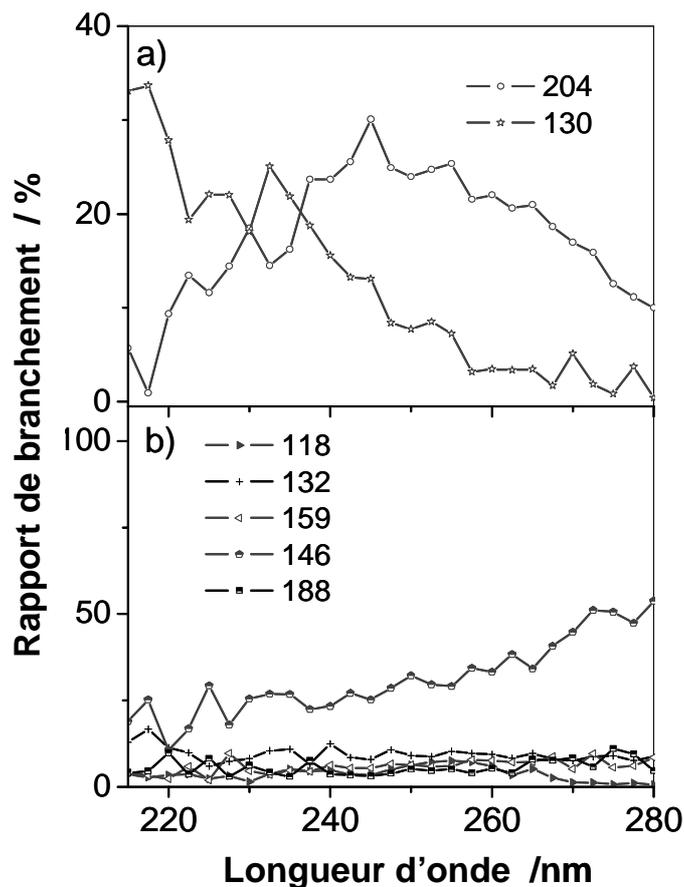


Figure 3.7 - Rapport de branchement des principaux fragments, en fonction de la longueur d'onde d'excitation issue de la photodissociation du tryptophane protoné.

3.3.3 Tryptophane argent

Le tryptophane argent est le premier système hybride biomolécule métal que nous avons étudié. Ce système se distingue des autres complexes puisqu'il ne fait intervenir qu'un seul atome d'argent sous la forme d'un cation.

Structure. La figure 3.8, présente deux structures de basse énergie obtenue par DFT. Elles caractérisent deux types d'attachements particuliers entre l'atome d'argent et le tryptophane : la forme charge solvatée (CS, structure de plus basse énergie) et la forme zwitterionique (ZW). La compétition entre ces deux structures dans les systèmes, acide aminée avec cation métallique, a été étudiée par de nombreux groupes.^[7, 12, 41, 42] Il a notamment été montré qu'il était possible dans certains cas de stabiliser avec le cation métallique la structure ZW. Pour la structure CS représentée sur la figure 3.8 a), la partie métallique sous forme d'un atome d'argent est attachée au tryptophane par deux liaisons aux

carbones du cycle indole, par une liaison sur l'oxygène (en bleu) du groupe COOH et par une liaison sur l'azote (en rouge) du NH₂. Dans la forme zwitterionique (ZW) représentée sur la figure 3.8 b), l'atome d'argent est attaché par une liaison de type pont salin sur les deux oxygènes du groupe COO⁻ avec un transfert de H⁺ sur le NH₂. Deux autres structures de type CS, mais plus haute en énergie, sont également montrées sur la figure 3.9, c) et d).

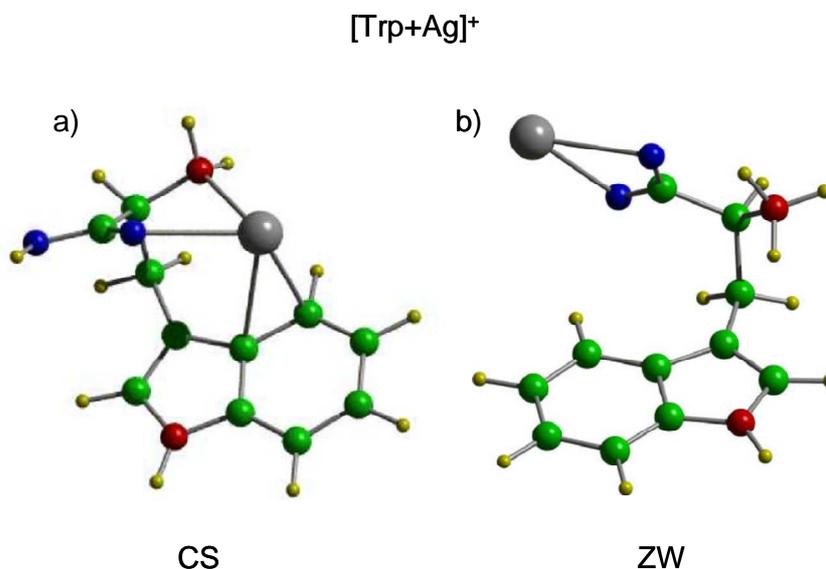


Figure 3.8 - Structure de [Trp+Ag]⁺. a) forme charge solvatée (CS) et b) forme zwitterionique (ZW). Atome de carbone en vert, d'oxygène en bleu et d'azote en rouge.

Spectres d'absorption optique. Sur la figure 3.9, les spectres d'absorptions optiques associés aux quatre structures des plus basses énergies sont obtenus par les calculs de TD-DFT. On retrouve les structures de type charge solvatée CS sur les figures a), b), d) et la forme zwitterionique c). Les structures CS présentent une transition dans la partie rouge du spectre (350-400 nm) notée CT, cette transition électronique implique la participation de l'atome d'argent. Elle est associée à un transfert de charge des électrons délocalisés des liaisons π de l'indole vers le cation métallique. Cette propriété est caractéristique de la structure CS. Le transfert est fortement favorisé par la proximité de l'indole et de l'atome d'argent que l'on voit sur les figures 3.9 a) et b). Ceci est confirmé par la structure CS sans liaison indole-Ag (cf. figure 3.9 d)), pour laquelle l'intensité de la transition CT est très faible. Cette transition n'existe pas pour la structure ZW, figure 3.9 c). La partie bleue du spectre est principalement attribuée à l'excitation du tryptophane.

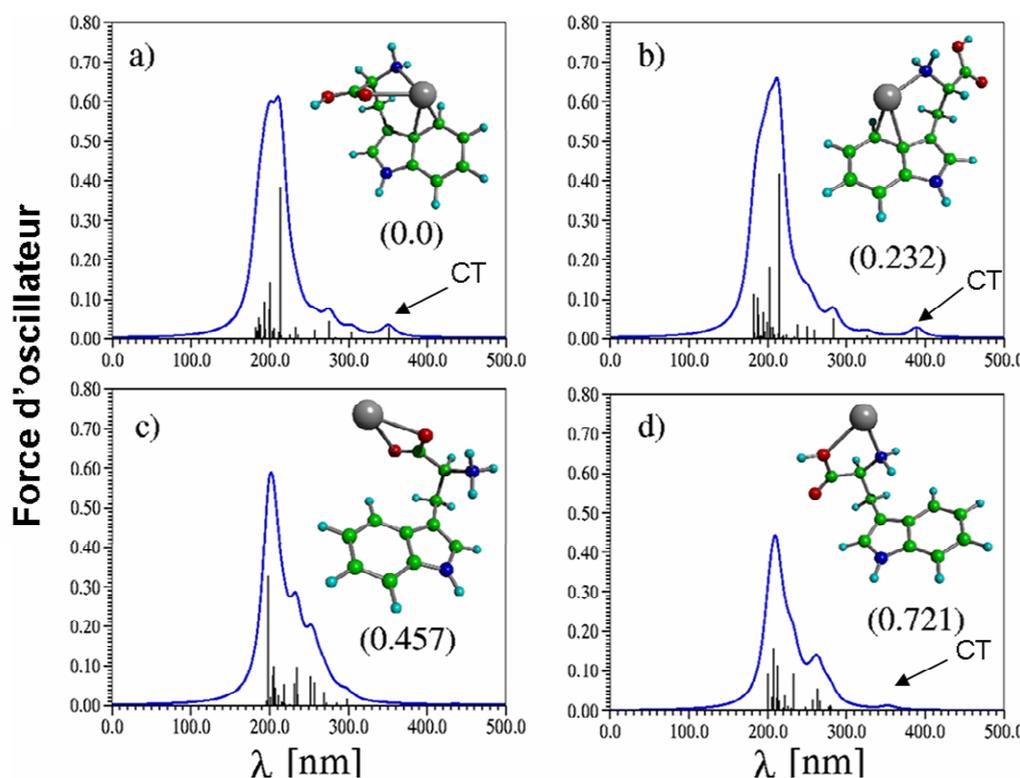


Figure 3.9 - Spectre d'absorption optique du complexe $[Trp+Ag]^+$ pour différente structure de basse énergie. On retrouve les deux types de structure ZW et CS. a) forme charge solvaté CS de plus basse énergie, b) forme charge solvatée CS, c) forme zwitterionique ZW, d) forme CS de plus haute énergie.

Spectre de photodissociation. La figure 3.10 présente le spectre a) de photodissociation mesuré et le spectre b) d'absorption optique calculé pour la structure la plus stable. Le spectre théorique présenté est, comme pour le $TrpH^+$, une moyenne des spectres calculés pour différentes structures autour de la structure CS d'équilibre la plus stable à 300 K, basé sur la méthode semi-empirique AM1-CI. Cette méthode permet d'obtenir une description précise des états excités de type transfert de charge à basse énergie. Le spectre expérimental présente une large bande centrée autour de 280 nm. Cette bande est semblable à celle observée pour le $TrpH^+$ (cf. figure 3.6 a)). En addition, on observe une seconde bande autour de 330 nm et une forte remontée de l'absorption dans la partie la plus UV du spectre. Le spectre théorique, mise à part la partie bleue, (<240 nm) qui ne peut pas être calculée, est en bon accord avec l'expérience. Les courbes théoriques et expérimentales présentent toutes deux la large bande centrée à 280 nm qui est gouvernée par des transitions $\pi-\pi^*$ caractéristiques de l'excitation de l'indole déjà observée pour le $TrpH^+$. La bande centrée autour de 330 nm correspond au transfert de charge, le calcul reproduit bien cette bande. La

chute brutale sur le spectre de photodissociation à 330 nm est due à une chute de la puissance laser. Nous sommes à la limite de fonctionnement de l'OPO.

Cette nouvelle bande est localisée dans le proche UV (transition principale à 330 nm). On peut rappeler que l'atome d'argent présente une transition 2s vers de 2p localisée à 337 nm.^[43] Les orbitales HOMO LUMO (cf. figure 3.10 c)) montre que ce transfert de charge correspond à un déplacement des électrons délocalisés de l'orbital π de l'indole (HUMO) vers une orbitale s de l'atome d'argent (LUMO). L'atome d'argent a permis un transfert de charge plus efficace et a déplacé ce CT par rapport à TrpH^+ (cf. figure 3.6 b) et 3.10 b)). On constate d'autre part une augmentation de l'efficacité de photodissociation entre le TrpH^+ et $[\text{Trp}\bullet\text{Ag}]^+$ d'un facteur 2 dans la bande central (260-280 nm), en observant les spectres des figure 3.6 a) et 3.10 b), on constate la même amélioration de photoabsorption sur les spectres théoriques (cf. figure 3.5 a) et 3.9 a)). Ce transfert de charge spécifique à la structure CS observée théoriquement et expérimentalement nous permet d'assigner le complexe $[\text{Trp}\bullet\text{Ag}]^+$ à la structure CS.

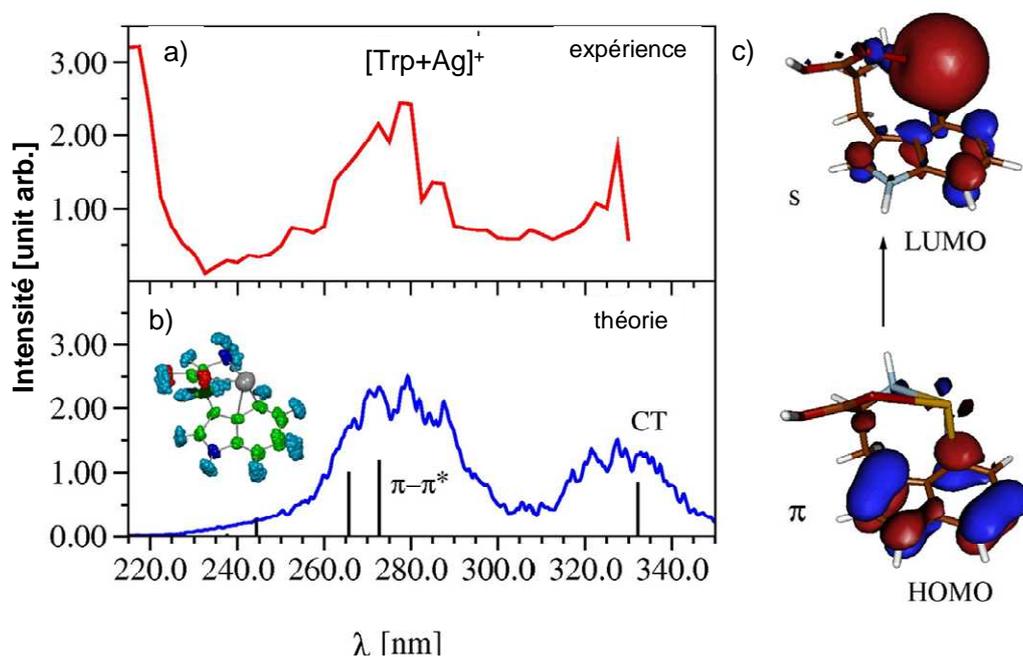
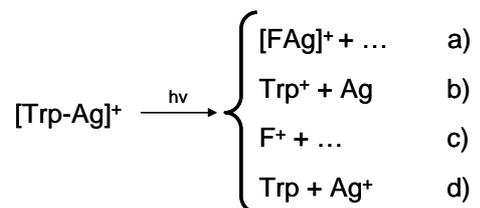


Figure 3.10 - Spectre optique expérimental et théorique du $[\text{Trp}\bullet\text{Ag}]^+$. a) spectre de photodissociation mesuré, b) spectre d'absorption calculé, c) représentation des orbitales HOMO \rightarrow LUMO correspondant au transfert de charge CT à 330 nm.

Les voies de fragmentation. Les fragments observés après irradiation laser sont résumés par le schéma suivant :



où F correspond aux fragments internes du tryptophane. Les rapports de branchement correspondant à ces fragments sont représentés sur la figure 3.11. Les fragments de types $[\text{FAg}]^+$ où le tryptophane se fragmente pour produire un atome d'argent accroché à l'indole, sont peu dépendants de la longueur d'onde. L'énergie de liaison entre l'atome d'argent et le tryptophane est estimée à environ 3.1 eV (pour la structure CS de plus basse énergie), cette énergie est supérieure à celle nécessaire pour fragmenter le tryptophane (1 eV).^[44] Les fragments de type F^+ sont principalement observés à haute énergie dans le domaine 220-260 nm, ce mécanisme nécessite de casser les liaisons argent-indole et l'énergie résiduelle est suffisante pour fragmenter le tryptophane. Toutefois le fragment Trp^+ issue de la perte de l'atome d'argent dépend fortement de la longueur d'onde et est observé au dessus de 300 nm, ce chemin de fragmentation spécifique est corrélé au transfert de charge de l'indole vers l'argent observé dans les calculs. Le transfert de l'indole vers l' Ag^+ induit une perte de l'argent neutre. La dissociation directe de $[\text{Trp}\bullet\text{Ag}]^+$ en Trp^+ est donc déclenchée par le transfert de charge photo induit. Cette voie de dissociation et sa dépendance en longueur d'onde sont des signatures de la structure CS.

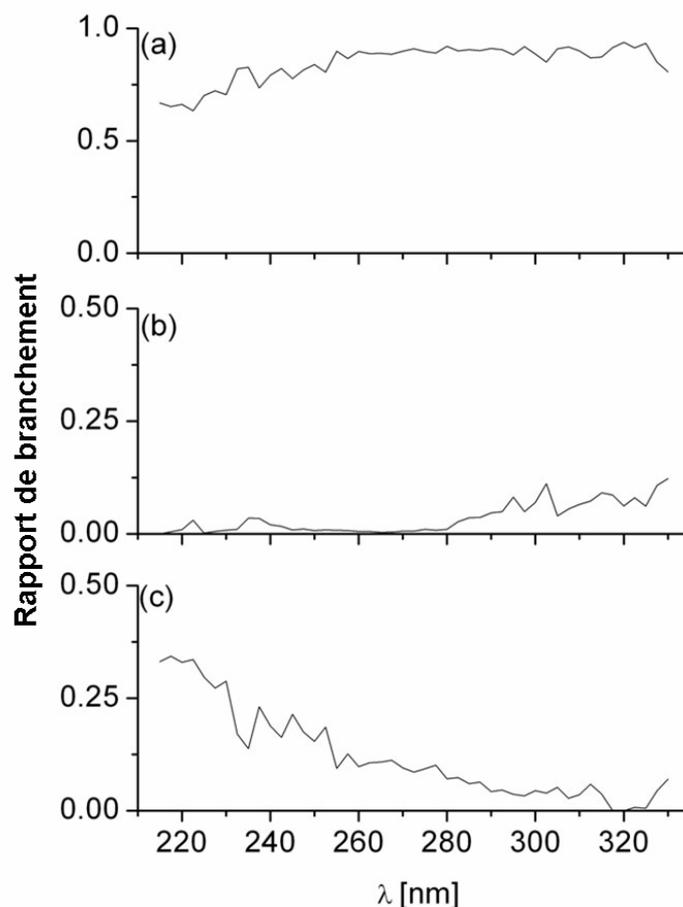


Figure 3.11 - Rapport de branchement des différents types de fragments observés lors de la fragmentation du $[Trp\bullet Ag]^+$. a) fragment de Trp avec Ag, b) perte d'Ag, c) fragment de Trp.

En conclusion, le complexe présente une forte augmentation de sa photodissociation par rapport au $TrpH^+$. L'apparition d'une nouvelle bande CT caractérisée par un transfert de charge du cycle aromatique vers le cation métallique est associée à une structure particulière CS et conduit à un fragment spécifique.

3.4 Complexes tryptophane agrégat d'argent : effet de taille et de structure

3.4.1 Structures CS et ZW

Pour les complexes tryptophane agrégat d'argent, les deux types d'attachements CS et ZW entre la partie métallique et le tryptophane sont possibles. On considère que les atomes d'argent viennent se positionner sous forme d'agrégats métallique et ne sont pas distribués sur l'ensemble de la molécule comme semble le montrer les spectres de CID.

En utilisant des calculs de DFT, le groupe du professeur Vlasta Bonacic-Koutecky détermine les structures pour plusieurs tailles d'agrégats dans les complexes $[\text{Trp}\bullet\text{Ag}_n]^+$ ($n=1-5,9$). Sur la figure 3.12, les deux types de structure de chaque complexe sont classés par leur énergie de liaison tryptophane-agrégat. Les petites tailles d'agrégats ont une plus grande stabilité pour des structures CS ($n=1-4$), et les grosses tailles favorisent les structures ZW (5, 9). Cette évolution est probablement due à l'augmentation de la polarisabilité de l'agrégat (effet de taille) et à une plus forte interaction ion-dipôle induit. Il peut également y avoir un effet d'encombrement stérique qui défavorise les structures CS pour de gros agrégats d'argent.

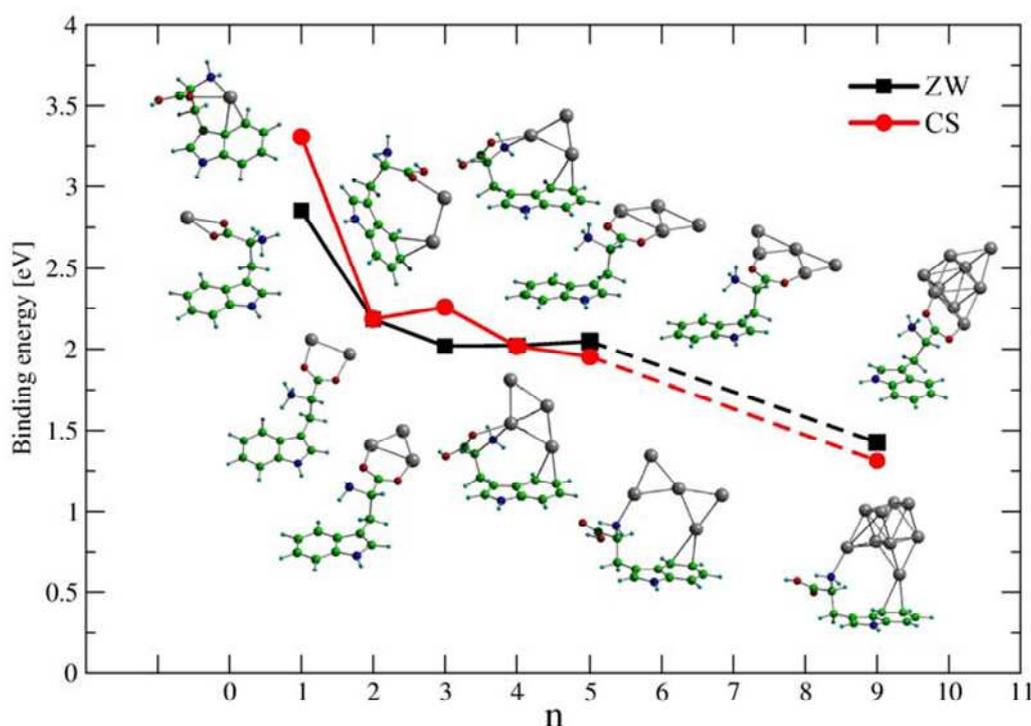


Figure 3.12 - Energie de liaison entre le Ag_n^+ $n=1-5,9$ et le tryptophane. On distingue les structures charge solvatée (CS) avec la courbe en rond rouge et les structures zwitterioniques (ZW) avec la courbe en carré noir. Les structures ZW possèdent uniquement des liaisons agrégat-oxygènes (en rouge), les autres sont les structures CS.

3.4.2 Spectres calculés pour les complexes tryptophane-agrégat d'argent

Les systèmes $[\text{Trp}\bullet\text{Ag}_n]^+$ se distinguent du $[\text{Trp}\bullet\text{Ag}]^+$ puisque que leur partie métallique passe d'un à plusieurs atomes et devient un agrégat. Les agrégats ont des propriétés optiques particulières, c'est le plasmon de surface^[1] où les électrons sont impliqués dans une excitation

collective suite à l'application d'un champ électromagnétique adapté.^[45] Le plasmon de surface dans une couche est réalisé à 310 nm dans les nanoparticules, il se déplace vers le rouge jusqu'à environ 350 nm pour les plus petites tailles. La structure des agrégats d'argent varie avec la taille, on a une structure plane jusqu'à 4 et à partir de 5 on a une structure 3D^[1] (cf. figure 3.12).

3.4.2.1 [Trp•Ag₂]⁺

Les spectres d'absorption optique calculés pour le [Trp•Ag₂]⁺ sont montrés sur la figure 3.13 a) et b), respectivement pour les deux structures CS_B et ZW, la notation d'indice pour CS_B est utilisée pour identifier les différentes structures de type CS. La figure 3.13 c) présente le spectre de Ag₂⁺ pur. La structure CS possède des transitions de faible énergie à 370 et 460 nm impliquant un transfert de charge de l'indole vers l'agrégat d'argent. Cette empreinte optique de la structure CS s'oppose nettement à celle de la structure ZW. En effet pour la forme ZW (cf. figure 13 b)), on observe une forte transition isolée à 525 nm. Comme on le voit dans l'insert de cette figure, la transition est assignée à l'excitation de l'orbitale liante σ (HOMO) du dimère d'argent Ag₂⁺ vers l'orbital non-liante π (LUMO) de Ag₂⁺. Cette transition peut conduire à la rupture de la liaison Ag-Ag. Cette transition est propre à l'agrégat d'argent pur Ag₂⁺. D'ailleurs, on retrouve sur le spectre de l'Ag₂⁺ pur (la figure 3.13 c)) une transition isolée de même caractère autour de 380 nm, le décalage vers le rouge dans le cas du complexe peut être expliqué par l'influence du COO⁻ et du NH₃⁺ auquel vient se lier l'agrégat. Sur la figure 3.13 b), on remarque une importante transition à 270 nm de type CT de Ag₂⁺ vers NH₃ qui est spécifique à la structure ZW.

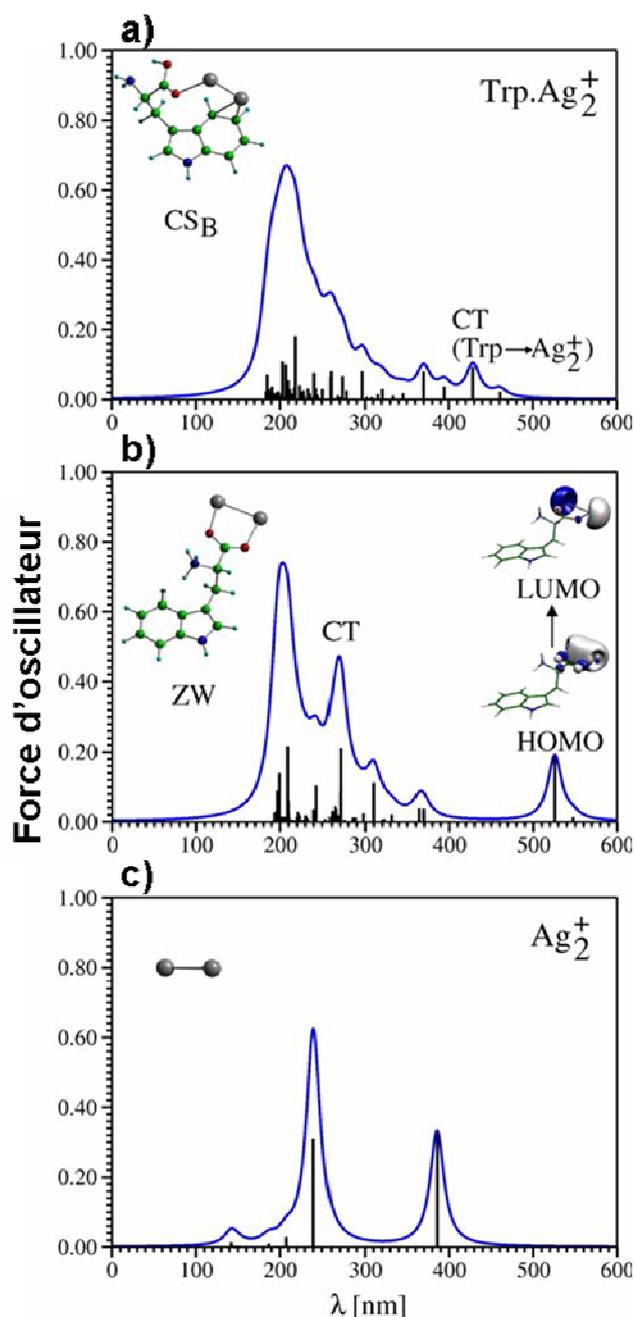


Figure 3.13 - Spectre d'absorption optique du $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_2^+$ et Ag_2^+ . a) structure CS_B , b) structure ZW , c) agrégat d'argent pur Ag_2^+ . Des transitions à transfert de charge sont identifiées (CT) pour CS_B et ZW . Pour ZW , en insert on voit les orbitales de la transition sp dans Ag_2^+ . Plusieurs structures CS ont été obtenues d'où la nécessité de les différencier par des indices.

3.4.2.2 L'effet de taille : $[\text{Trp}\cdot\text{Ag}_{3,4,5}]^+$

Lorsque la taille des agrégats va augmenter nous allons observer une contribution croissante des transitions propres à l'agrégat pur dans le spectre du complexe associé. La

figure 3.14, présente les spectres calculés des trois tailles d'agrégats 3, 4, 5, sur le tryptophane, pour les structures CS et ZW, ainsi que pour les trois agrégats purs.

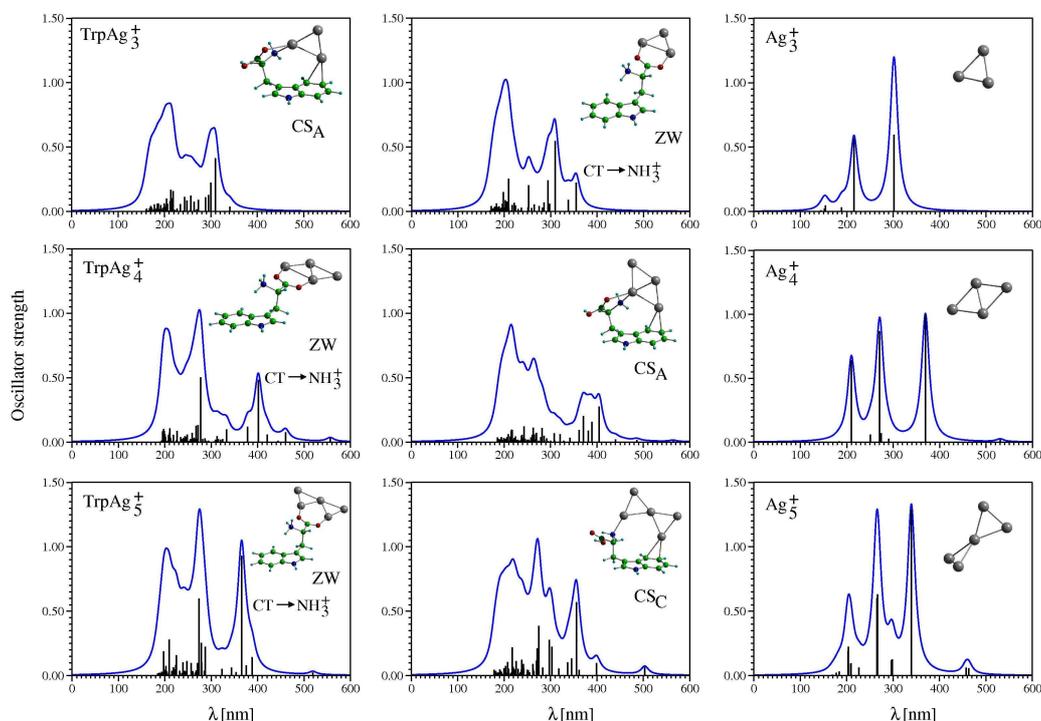


Figure 3.14 - Spectre pour les tailles 3, 4, 5. Les structures CS, ZW et les agrégats purs sont présentés. Les structures de plus basse énergie sont CSA pour TrpAg_3^+ et ZW pour TrpAg_4^+ et TrpAg_5^+ . CT indique les transferts vers le NH_3 suite à une excitation dans l'argent.

$\text{Trp}\cdot\text{Ag}_3^+$. Ce complexe présente une structure de plus basse énergie de type CS (cf. figure 3.12), l'agrégat est attaché par deux liaisons sur l'indole, une sur l'oxygène du COOH ainsi qu'une sur le NH_2 . Cette structure présente de fortes transitions dans le domaine 200 à 300 nm qui concorde avec les deux transitions observées sur le spectre de l' Ag_3^+ pur (cf. figure 3.14). De plus les deux transitions du Ag_3^+ pur sont en résonance avec le transfert de charge et la transition $\pi\text{-}\pi^*$ du tryptophane. La représentation sur la figure 3.15, des orbitales moléculaires suite à l'excitation à 310 nm, nous confirme une forte interaction entre l'excitation de l'argent et l'excitation due au transfert de charge entre le tryptophane et l'agrégat. Pour la structure ZW, une transition de type transfert de charge de Ag_3^+ vers NH_3^+ autour de 340 nm apparaît, elle n'est pas observée pour la structure CS. Cette signature de la structure ZW a déjà été observée pour $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_2^+$.

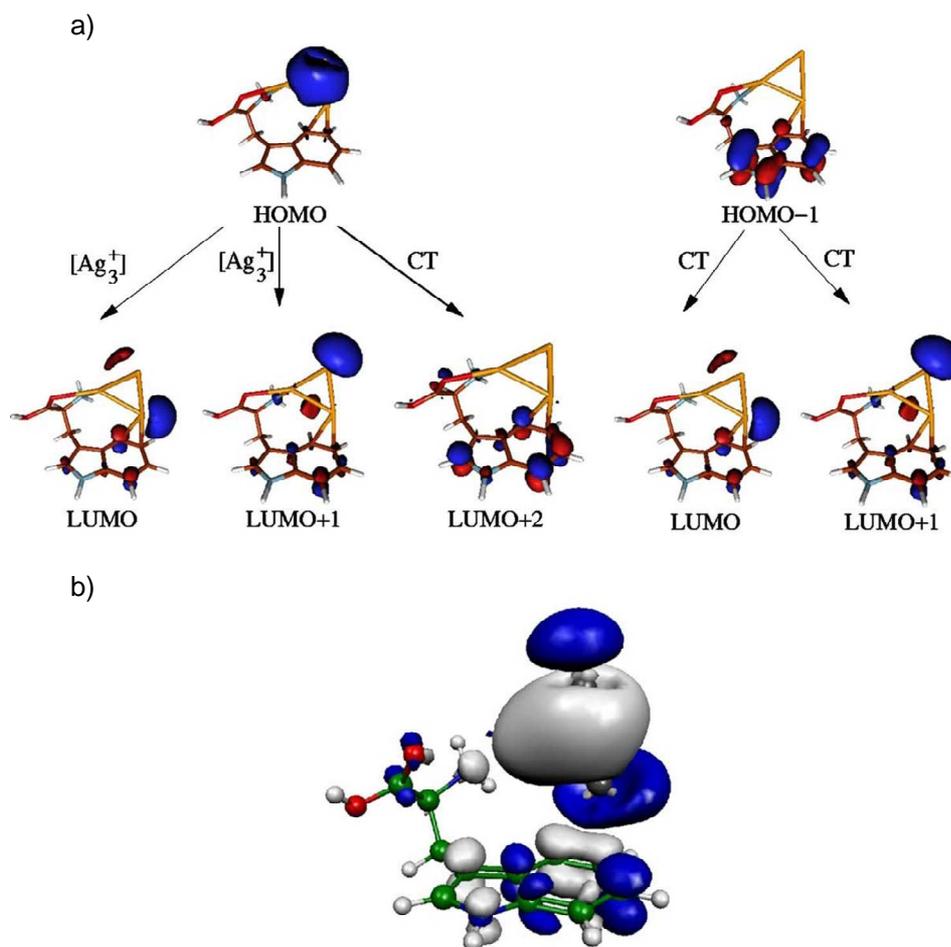


Figure 3.15 - a) Principales excitation correspondants à la transition calculée à 310 nm de la HOMO localisé sur l'agrégat Ag_3^+ et de la HOMO-1 localisé sur l'indole. On observe d'une part une excitation de Ag_3^+ et d'autre part des transferts de charge entre l'indole et Ag_3^+ . b) Différence de densité électronique après excitation de la transition dominante à 310 nm ($\delta\rho = \rho_{\text{excité}} - \rho_{\text{fond.}}$). En blanc les zones de réductions d'électrons et en bleu, les zones d'accumulation.

Trp•Ag₄⁺, Trp•Ag₅⁺. A partir de ces deux complexes, on rentre dans un régime où la structure ZW est calculée comme la structure la plus stable même si la structure CS est proche en énergie. Pour les agrégats purs (cf. figure 3.14), le tétramère et le pentamère présentent en plus des deux intenses transitions similaire au trimère, une troisième transition très intense localisée à 370 nm pour le Ag_4^+ et à 340 nm pour le Ag_5^+ . On retrouve la mémoire de ces trois transitions dans les spectres du complexe $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_4^+$ (CS et ZW). Les deux importantes transitions à 210 et 280 nm impliquent une résonance entre les transitions de Ag_4^+ pur et les transitions $\pi\text{-}\pi^*$ du tryptophane comme nous l'avons déjà commenté. L'analyse des transitions de basse énergie observées autour de 400 nm, montre que l'excitation dans cette

zone d'énergie est gouvernée par un transfert de charge vers le NH_3^+ suite à l'excitation de la partie métallique.

Un résultat très similaire est obtenu pour le $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_5^+$. Les trois transitions de l' Ag_5^+ pur sont retrouvées sur le spectre de la structure ZW, ainsi que sur celui de la structure CS mais moins prononcé. Pour les deux structures on retrouve la transition de basse énergie très proche, à 365 pour ZW et à 358 pour CS. Malgré leur proche localisation, ces deux transitions ne sont pas de même nature selon la structure. La forme ZW est guidée par le transfert de charge de la partie métallique vers le NH_3 , alors que pour la forme CS, cette transition implique un CT entre l'argent et l'indole.

$\text{Trp}\bullet\text{Ag}_9^+$. La situation change complètement dans le cas de $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_9^+$ puisque la partie métallique prend une structure 3D comme on le voit sur la figure 3.16. Le spectre de l'agrégat pur présente une intense bande au voisinage de 300 nm. On retrouve cette bande caractéristique de l'agrégat Ag_9^+ dans les spectres optiques des deux structures CS et ZW. Cependant, la nature des excitations est propre à chaque structure. Dans le cas de la forme ZW, les transitions localisées à 299 nm et à 308 nm impliquent une excitation dans l'agrégat et un transfert de charge de Ag_9^+ vers NH_3^+ . La différence de densité de charge entre l'état fondamental et l'état excité localisé à 308 nm présenté sur la figure 3.17 confirme ce transfert de charge de Ag_9^+ vers NH_3^+ . Pour la structure CS, les intenses transitions localisées à 312, 307, 289 nm sont dues à l'excitation de l'agrégat et conduit à des transferts de charge entre l'indole et la partie métallique suite à l'excitation de l' Ag_9^+ .

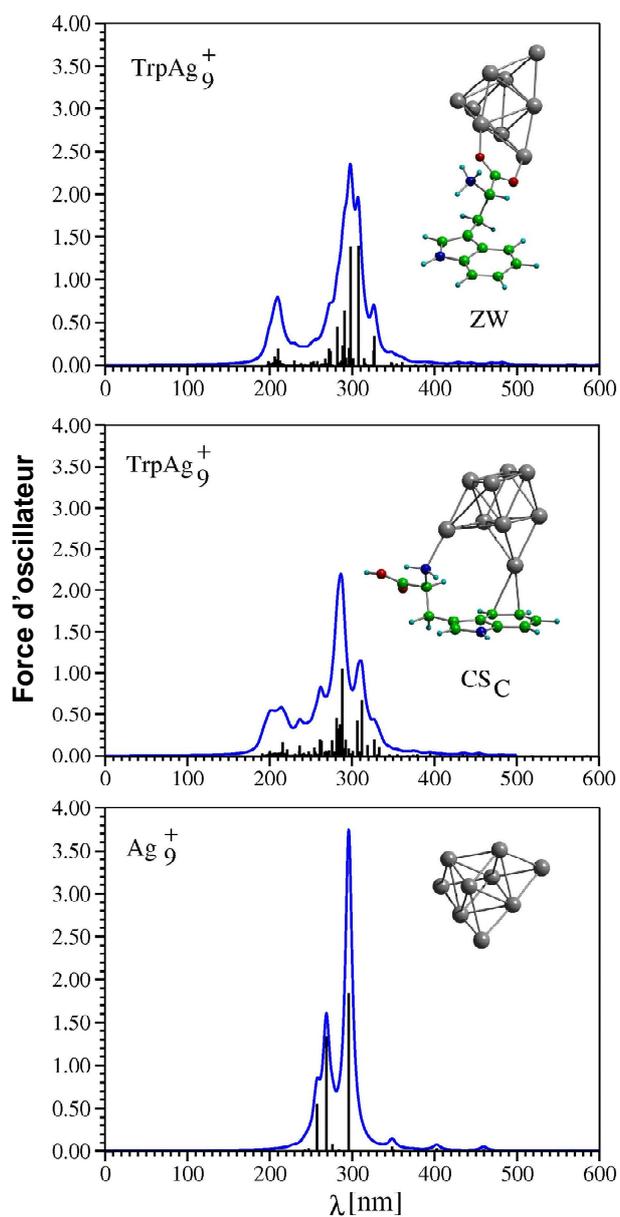


Figure 3.16 - Spectre d'absorption optique de $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_9^+$ pour les structures ZW et CS et de Ag_9^+ . La structure de plus basse énergie est ZW.

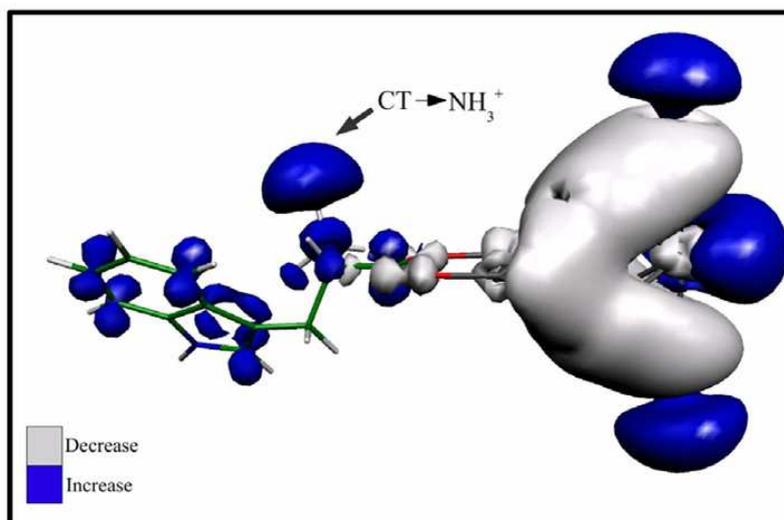


Figure 3.17 - $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_9^+$. Différence de densité électronique après excitation à 308 nm de la partie métallique pour la structure ZW. Transfert de charge négative vers le NH_3^+ .

L'analyse théorique des différents complexes a montré que l'augmentation de la taille de l'agrégat favorise la structure ZW. L'analyse des transitions révèle des transferts de charge de nature différente selon la structure. La forme CS présentant une forte interaction entre la partie métallique et le tryptophane conduit à des transitions avec transfert de charge entre l' Ag_n^+ et l'indole alors que la structure ZW va plutôt transférer les charges de l' Ag_n^+ vers le NH_3^+ .

3.5 Photodissociation et voies de fragmentation de $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_n^+$

Dans cette partie, je vais présenter les spectres expérimentaux obtenus pour des complexes de différentes tailles, que nous comparerons aux résultats théoriques. Nous avons réalisé ces expériences sur les tailles 1, 2, 3, 4, 5, 9, cependant, seul les tailles 1, 3, 9 sont de la forme pur $[\text{Trp}+\text{Ag}_n]^+$. La taille 5 est principalement de la forme $[\text{Trp}+\text{Ag}_n]^+$ mais nous observons une faible quantité de forme $[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_n]^+$, par contre les tailles 2 et 4 sont clairement identifiées comme de la forme $[\text{Trp}-\text{H}+\text{Ag}_n]^+$. Seules les tailles 3, 5, 9 seront donc comparées aux spectres calculés. Il est important de noter que les spectres expérimentaux sont des spectres de photofragmentation. Ils donnent le rendement de fragmentation observé en fonction de la longueur d'onde. Les spectres calculés sont des spectres d'absorption. La comparaison suppose que la fragmentation est directement proportionnelle à l'absorption. Nous verrons que ce n'est pas le cas pour les grands systèmes étudiés ici.

3.5.1 Section efficace de photodissociation et taille

Sur la figure 3.18, les spectres de photodissociation mesurés sont présentés pour les tailles 1, 2, 3, 4, 5 et 9. Afin de pouvoir comparer les intensités relatives, ces spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions. Pour chaque longueur d'onde, on a enregistré des spectres de masse pour chaque taille à la suite avec la même solution. Pour les tailles 1 et 3, nous disposons de spectres bien mieux résolus. Sur la figure 3.18, ils ont été normalisés afin de pouvoir comparer les intensités relatives. Le temps d'irradiation est de 500 ms. Tous ces complexes photodissocient dans le domaine de 220 à 330 nm avec une large bande centrée aux environs de 270-300 nm et une augmentation de la dissociation dans la partie UV du spectre. On observe une augmentation globale de l'efficacité de photodissociation avec la taille de l'agrégat entre la taille 1 et 4. On peut constater des différences de localisation des maximums entre les différents systèmes comme par exemple le $[\text{Trp}+\text{Ag}_3]^+$ autour de 300 nm et le $[\text{Trp}-2\text{H}+\text{Ag}_4]^+$ autour de 270. Pour les tailles 5 et 9, on observe de manière assez surprenante que l'intensité diminue par rapport aux tailles précédentes alors que l'on pourrait s'attendre à une absorption plus forte lorsque la partie métallique augmente de taille, compte tenu de l'augmentation globale du nombre d'électrons et donc de la force d'oscillateur, et des résultats des calculs pour les spectres d'absorption optique.

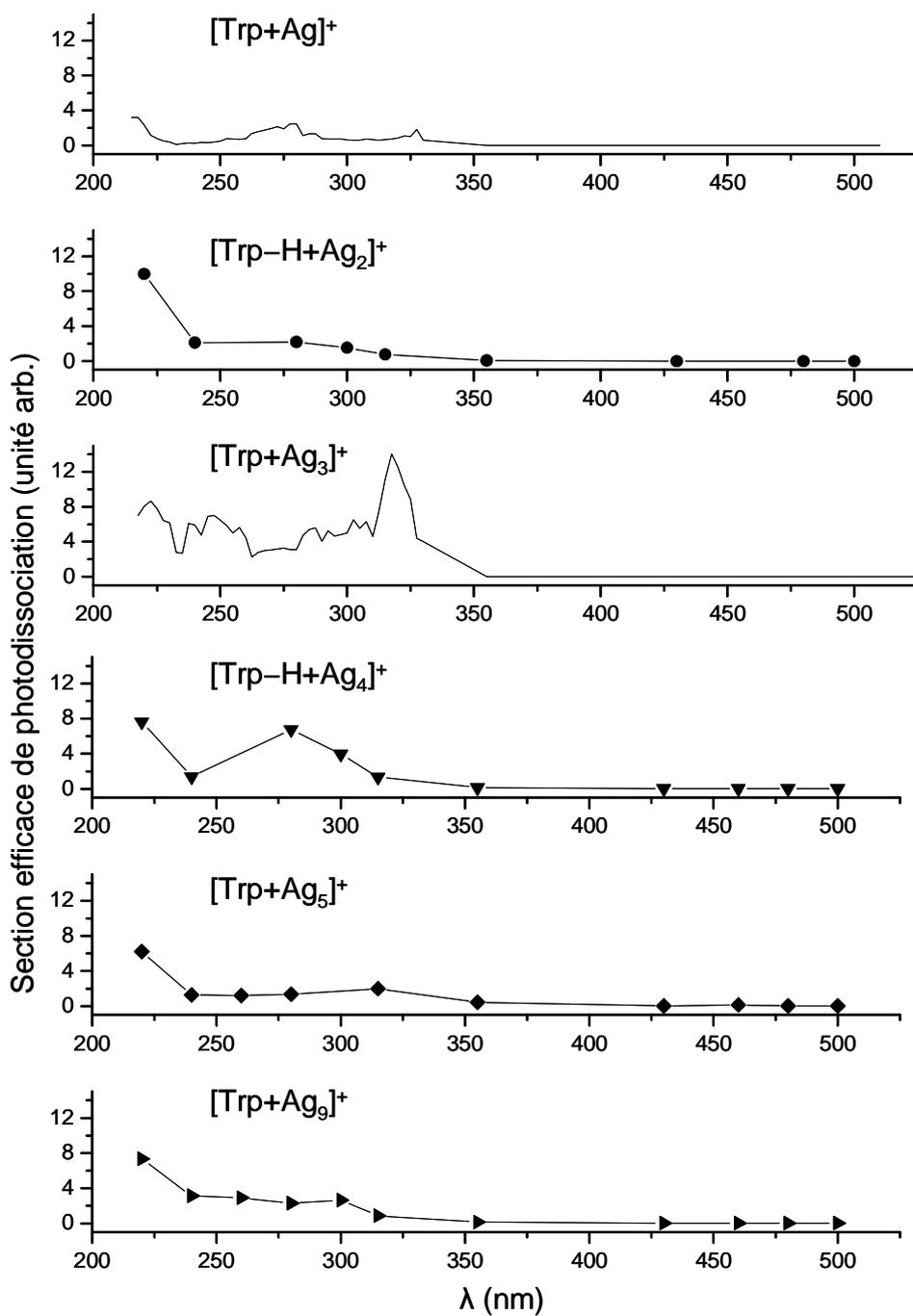


Figure 3.18 - Section efficace de photodissociation pour plusieurs tailles de complexe $Trp \cdot Ag_n^+$, $n=1, 2, 3, 4, 5, 7, 9$. Les spectres sont normalisés de façon à pouvoir comparer les rendements de dissociations pour les différentes tailles.

3.5.2 Spectre de photodissociation et structure

Trp•Ag₃⁺. Le spectre de photodissociation de Trp•Ag₃⁺, est comparé sur la figure 3.19, avec le spectre optique calculé. On retrouve la montée de la bande vers 220 nm mais le laser ne permet pas de passer en dessous de 220 nm. La forte transition à 310 nm due en partie à l'excitation de Ag₃⁺ et aux transferts de charge est bien présente dans l'expérience. Par contre on constate que la transition autour de 350 nm propre à la structure ZW n'est absolument pas observée. Cette observation expérimentale est en faveur d'une structure de type CS. Enfin, il est important de voir que l'augmentation globale du rendement de photofragment observée de la taille 1 à 3 est parfaitement reproduite par la théorie.

Trp•Ag₅⁺, Trp•Ag₉⁺ et Ag₉⁺. Les spectres mesurés et calculés pour les tailles 5 et 9 sont présentés sur la figure 3.19. La dissociation est observée dans la zone pour laquelle une absorption est calculée. Alors que la position des bandes d'absorption semble bien représentée, l'accord sur les intensités est beaucoup moins bon. Comme déjà mentionné, les rendements de dissociation sont plus faible pour les Trp•Ag₉⁺, Trp•Ag₅⁺ que pour le Trp•Ag₃⁺, alors que dans le calcul l'absorption augmente régulièrement avec la taille. Pour comprendre ce faible taux nous avons mesuré le spectre de photodissociation de l'agrégat Ag₉⁺ que nous avons pu comparer au calcul et à des expériences de jet moléculaire.

Cet agrégat est préparé à partir de la dissociation successive par CID de [Trp-2H+Ag₁₁]⁺. Une première étape de CID donne entre autre le Ag₁₁⁺ qui est à son tour fragmenté par CID dans une 3^{ème} étape de MS et produit le Ag₉⁺. On retrouve les spectres correspondants à ces étapes sur les figures 3.20 a) et b). Ensuite on réalise l'UVPD de Ag₉⁺, on observe sur le spectre à 300 nm (cf. figure 3.20 c) les fragments correspondants à l'évaporation successive d'atome Ag et de dimère Ag₂.

Le spectre optique de Ag₉⁺ est présenté sur la figure 3.19, il est comparé avec la courbe théorique, on retrouve bien la très forte bande de l'Ag₉⁺ pur, qui est en parfait accord avec les résultats en jet moléculaire de Meiwes Broer et *al.*^[46], de plus le taux de photofragmentation observé est trois fois supérieur à celui du Trp•Ag₃⁺. En comparant le spectre de Trp•Ag₉⁺ et celui de Ag₉⁺ sur la figure 3.21 il est clair qu'une grande part de la dissociation due à l'absorption de l'Ag₉⁺ est manquante dans le spectre du complexe. Les calculs et le spectre d'absorption de Ag₉⁺ sont toutefois en faveur d'une forte absorption dans cette région. Nous pensons que le complexe absorbe mais sa désexcitation n'entraîne pas la fragmentation du complexe.

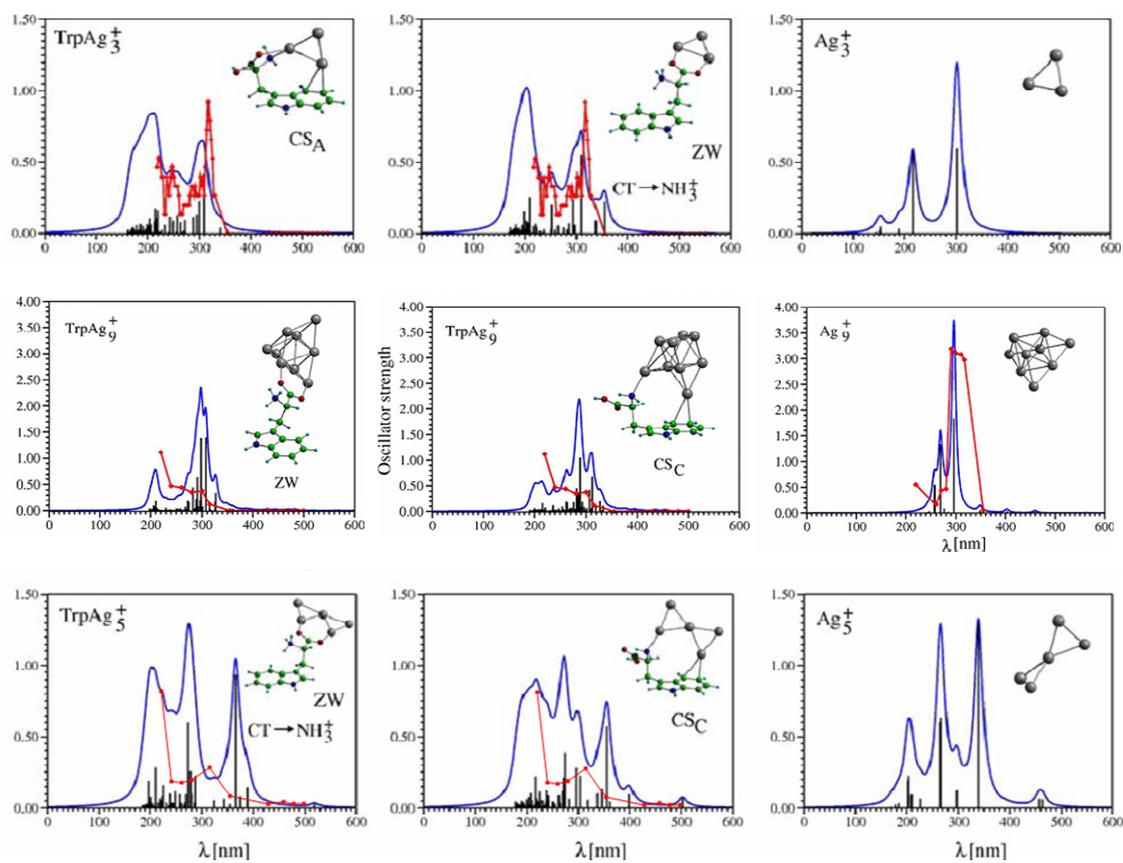


Figure 3.19 - Spectre optique de TrpAg_3^+ , TrpAg_5^+ , TrpAg_9^+ théorique et expérimental.

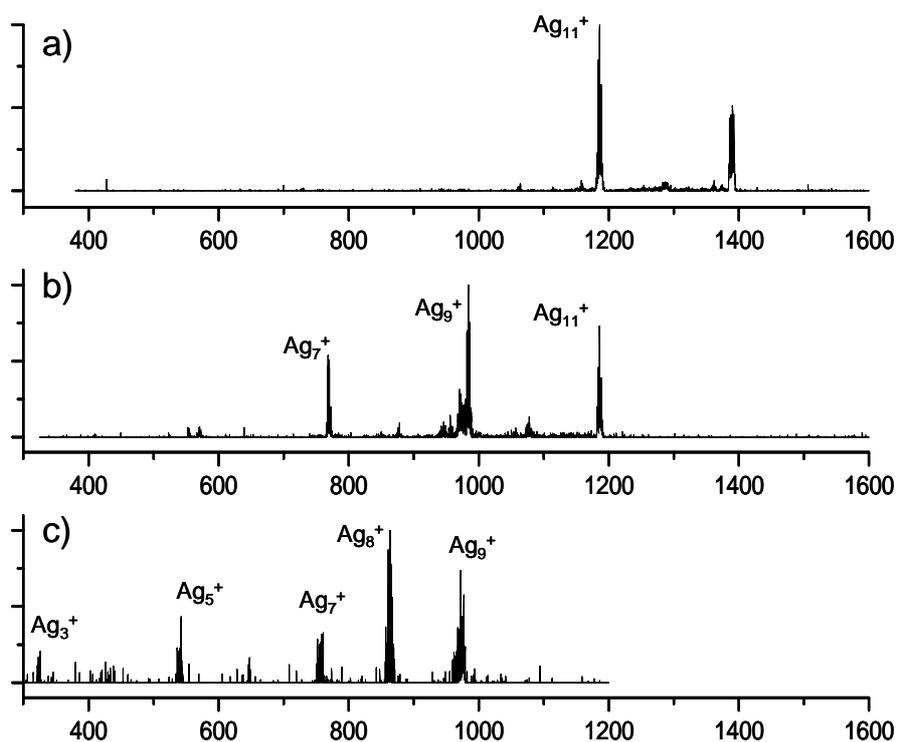


Figure 3.20 - Spectres MS^n . a) MS^2 , CID sur $[Trp-H+Ag_{11}]^+$ avec production de Ag_{11}^+ . b) MS^3 , le Ag_{11}^+ est isolé et fragmenté par CID pour produire le Ag_9^+ . c) MS^4 , UVPD à 300 nm sur le Ag_9^+ ce qui produit une évaporation successive de Ag et de Ag_2 .

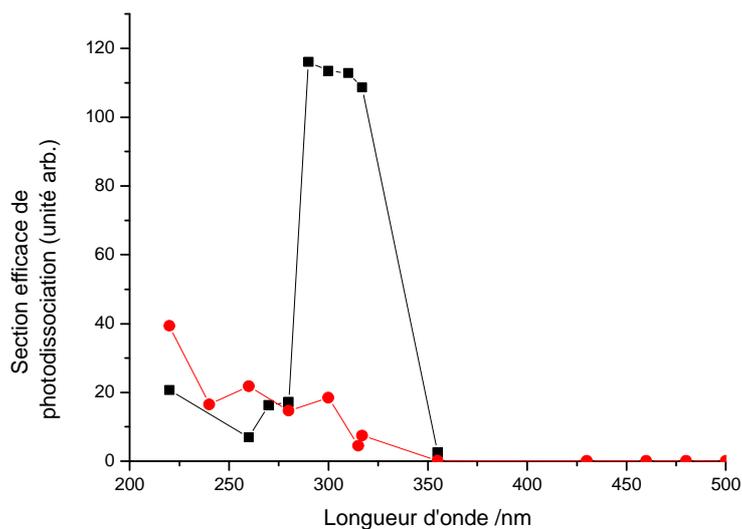


Figure 3.21 - Spectre optique de $Trp \cdot Ag_9^+$ (rond) et de Ag_9^+ (carré). Les deux courbe sont normalisé l'une par rapport à l'autre.

Une première explication peut être liée à la taille du complexe. Lorsque l'agrégat augmente, le nombre de degré de liberté augmente et l'énergie déposée par un photon se répartit sur un plus grand nombre de modes. Cette distribution de l'énergie pourrait expliquer la diminution de la fragmentation. Toutefois, entre $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_3^+$ et $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_5^+$, le nombre de mode de vibrations passe de 90 à 94. Un photon de 4.6 eV correspond donc dans le premier cas à une élévation de T de 300 K à environ 660 K et dans le second de 300 K à 613 K. La différence entre les 2 températures ne nous semble pas pouvoir expliquer la forte perte de fragmentation. D'autant que la différence d'énergie de liaison entre le tryptophane et l'agrégat diminue de 0.5 eV entre la taille 3 et 5.

On peut estimer par un calcul simple de RRRK (Rice, Ramsperger et Kassel^[47, 48]) le taux de dissociation k_n d'un système à une énergie E_n , avec une énergie de dissociation D_n on a la formule suivante :

$$k_n = \nu_0 \left(\frac{E_n - D_n}{E_n} \right)^{3n-7}$$

où ν_0 est la fréquence de vibration caractéristique du système et D_n l'énergie de dissociation correspondante à la voie la plus basse énergétiquement.

Les résultats obtenus pour les systèmes Ag_3 , Ag_5 , Ag_9 , $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_3$, $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_5$ et $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_9$ sont reportés dans le tableau de la figure 3.22. L'énergie E_n du système est la somme de l'énergie thermique initiale répartie sur chaque mode plus l'énergie d'un photon de 300 nm (4.1 eV), $E_n = [(3n-6)/40 + 4.1]$, ($1/40 = k_B T$ en eV, à $T=300\text{k}$, k_B la constante de Boltzman). L'énergie de dissociation D_n est prise à 1 eV. Dû au grand nombre d'atome dans le Trp, les agrégats purs ont des constantes de dissociation bien supérieurs à celle des complexes. Cela explique bien la différence de taux de photodissociation entre le $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_9^+$ et le Ag_9^+ . Cependant, la différence entre $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_3^+$, $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_5^+$ et $\text{Trp}\bullet\text{Ag}_9^+$ est faible, moins d'un ordre de grandeur. Cela confirme bien que la différence de mode entre les différents complexes ne peut expliquer totalement la différence de taux de photofragmentation. Ce modèle est évidemment extrêmement simplifié et n'est utilisé que pour obtenir des ordres grandeur.

Système	Énergie E (eV)	Constant de dissociation (s ⁻¹)	Nombre de degré de liberté
Ag ₃	4.2	5*10 ¹¹	3
Ag ₅	4.3	1.3*10 ¹¹	9
Ag ₉	4.6	7.4*10 ⁹	21
Trp•Ag ₃	6.2	4.6*10 ⁵	84
Trp•Ag ₅	6.35	2.4*10 ⁵	90
Trp•Ag ₉	6.65	7.1*10 ⁴	102

Figure 3.22 - Ordre de grandeur du taux de dissociation sur les systèmes Ag₃, Ag₅, Ag₉, Trp•Ag₃, Trp•Ag₅ et Trp•Ag₉.

Une autre hypothèse serait une forte augmentation de la fluorescence lorsque la taille du complexe augmente. Dans ce cas, il est possible que la relaxation vibrationnelle dans l'état excité devienne plus rapide que la conversion interne. Cette relaxation sur l'état excité serait suivie par une émission de fluorescence comme on l'a représenté sur le schéma de la figure 3.23.

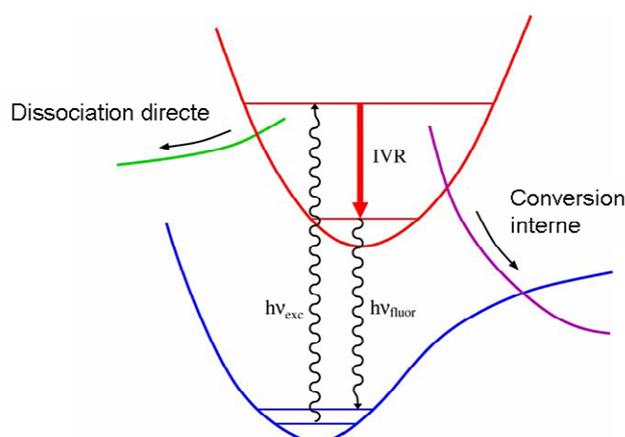


Figure 3.23 - Schéma proposé pour la redistribution d'énergie dans les systèmes complexes tryptophane agrégat de taille > 5.

Cette diminution de la conversion interne peut notamment être due à une variation de l'énergie des états conduisant à la conversion interne. Ces états, qui dans le cadre des calculs du TrpH^+ (^[49,50] et chapitre II) sont des états à transfert de charge, peuvent être particulièrement sensibles à la taille de l'agrégat.

Un argument en faveur de cette interprétation est la forte remontée de la dissociation dans la partie UV du spectre. Il semble que la dissociation diminuerait lorsque l'on excite l'agrégat, mais soit conservée lorsqu'on excite à plus haute énergie les liaisons du tryptophane. Il est également possible que l'augmentation du nombre de degrés de liberté accélère le processus de relaxation.

On pourrait également associer la chute du taux de dissociation au changement de structure. Structure CS vers structure ZW. Nous avons également enregistré le spectre de fragmentation du complexe $[\text{Trp-2H+Ag}_{11}]^+$ pour lequel les calculs indiquent que, dû à la perte des 2 hydrogènes, les structures les plus stables sont des structures de type CS. La liaison avec l'agrégat remplace les hydrogènes manquants. Pour ce complexe, on observe également une faible fragmentation dans la zone de longueur d'onde correspondant à l'absorption de l'agrégat (cf. figure 3.24).

Pour finir, une dernière hypothèse serait qu'il y ait bien évaporation d'atomes ou de dimères d'argent, mais qu'ils restent attachés au tryptophane par l'une des nombreuses interactions ou liaisons possible dû à la taille importante de l'agrégat.

Enfin, la figure 3.19 montre que pour les deux tailles 5 et 9, la comparaison du spectre expérimental avec le spectre calculé ne permet pas de différencier les structures CS et ZW.

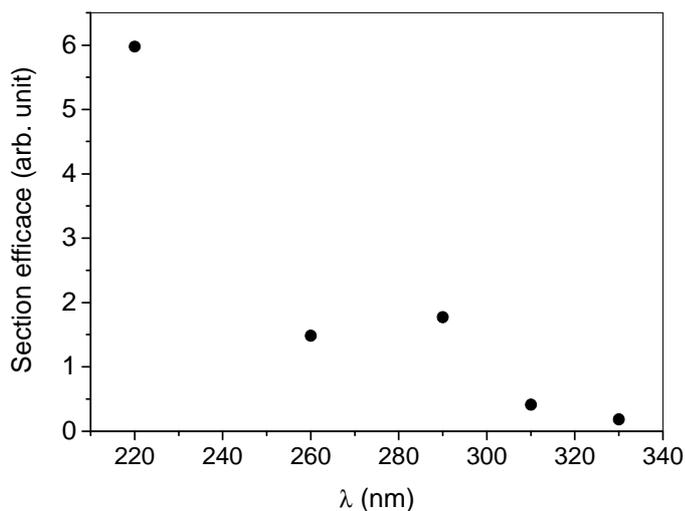


Figure 3.24 - Section efficace de photodissociation du $[Trp-2H+Ag_{11}]^+$.

3.5.3 Canaux de fragmentation spécifique

Nous avons pu observer sur les spectres calculés pour les différentes structures, des excitations impliquant des transferts de charges de différentes natures. Nous allons voir que cela conduit à des voies de fragmentation différentes. En corrélant ces résultats avec les observations expérimentales, un assignement de la structure des complexes est alors possible.

Un spectre de fragmentation enregistré pour le $Trp \bullet Ag_3^+$ à $\lambda = 310$ nm est montré sur la figure 3.25 a). Ces principaux fragments correspondent à la perte de Ag et de Ag_2 . L'évolution des rapports de branchement associés à ces 2 canaux ainsi que celui correspondant à la dissociation du complexe sont montrés sur la figure 3.25 b). Ces rapports de branchements dépendent fortement de la longueur d'onde. En particulier la perte de Ag est observée autour de 310 nm. Ce fragment n'est pas observée suite à une excitation par collision (figure 3.25 a)). Pour Ag_3^+ , l'excitation à 310 nm implique un transfert de charge de l'indole vers une orbitale anti liante de Ag_3^+ (cf. figure 3.15). Ces transferts de charge fragilisent les liaisons de l'agrégat Ag_3^+ et peuvent aboutir à la perte d'un atome d'argent. Les résultats de simulation de dynamique moléculaire sur l'état excité obtenu suite à cette excitation reproduit cette perte de Ag dans un temps de 1 à 2 ps (cf. figure 3.26 b)). Les simulations réalisées dans l'état fondamental reproduisent la dissociation du complexe qui est effectivement observé en CID (cf. figure 3.26 a)). Ce transfert de charge déstabilise l'agrégat métallique et conduit à sa fragmentation. Cette fragmentation est caractéristique d'une structure CS.

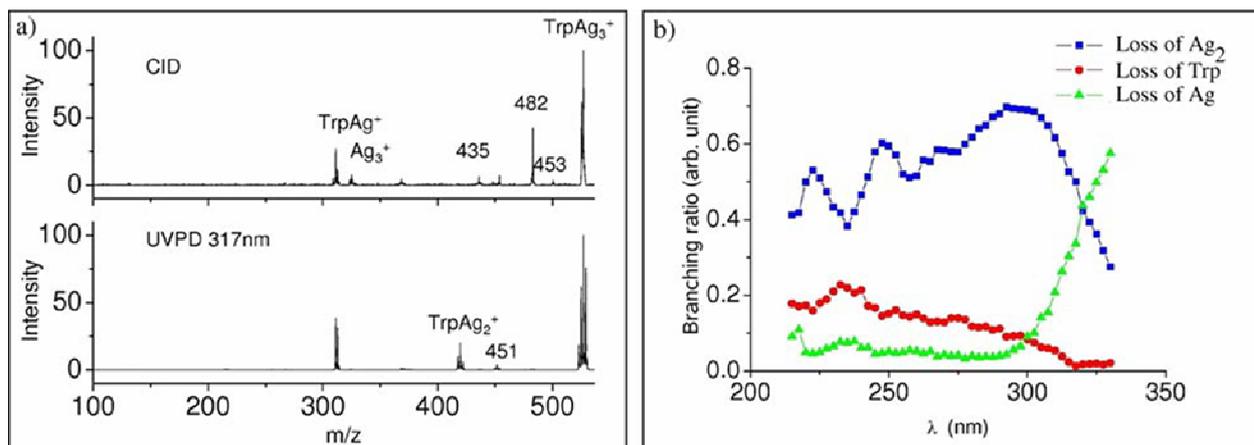


Figure 3.25 - $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_3^+$. a) spectre de masse de CID et d'UVPD à 317 nm. b) rapport de branchement des photofragments.

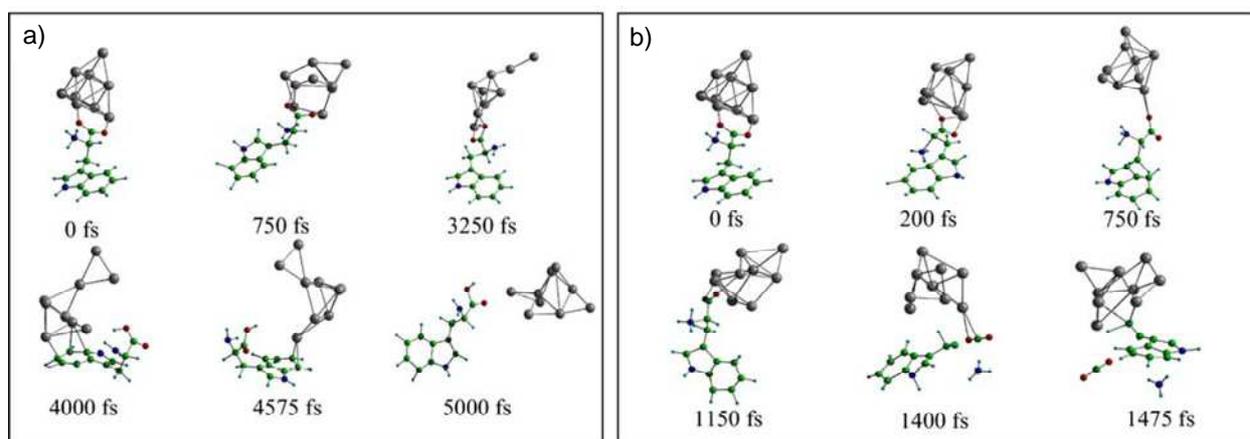


Figure 3.26 - $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_3^+$. a) et b) simulation de dynamique moléculaire (MD) respectivement dans l'état fondamental avec excitation par chauffage et dans l'état électronique excité à 310 nm.

Pour le $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_9^+$, nous avons identifié deux chemins de fragmentation principaux. Le premier correspond à une fragmentation interne du tryptophane et aboutit à une perte de 61 (NH_3 , CO_2). Le second, est la perte d'une partie de l'agrégat avec une molécule d'eau (Ag_2 , H_2O) (cf. figure 3.27). On peut remarquer que la perte de Ag et Ag_2 , observée lors de la CID du Ag_9^+ , n'est pas présente lors de la photodissociation (cf. figure 3.27). Cette observation est en faveur d'une forte redistribution de l'énergie vers le tryptophane lorsqu'il y a excitation de l'agrégat. On note que ces voies de dissociation sont aussi observées en CID. Ces fragments sont sans doute produits à partir de l'état fondamental après conversion interne.

L'évolution des rapports de branchement avec la longueur d'onde est montrée sur la figure 3.27 b). La perte de 61 est favorisée à haute énergie alors que la perte de Ag_2 est

favorisée à faible énergie. Dans le cas d'une structure ZW, l'excitation conduit à un transfert de charge entre l'agrégat et le tryptophane (cf. figure 3.17), correspondant à un transfert de charge d'un électron de Ag_9^+ vers le NH_3^+ . Il y a alors formation d'un NH_3 hypervalent. La perte de 61 peut s'expliquer par une perte de ce NH_3 suivi par une réorganisation du complexe et une perte de COO . La perte de NH_3 seul n'a pas été observée. Cette interprétation est confirmée par la simulation de MD réalisée dans l'état fondamental (cf. figure 3.28). Certaines trajectoires reproduisent la perte de 61 observée expérimentalement. Cette perte n'a pas été observée lors de trajectoires réalisées à partir de la structure CS. En revanche, certaines trajectoires, pour la structure CS, reproduisent également la perte de Trp observé en CID et UVPD. Pour conclure, la perte de NH_3 suivi de celle de COO semble caractéristique de la structure ZW et à pour première étape un transfert d'électron de Ag_9 vers NH_3^+ .

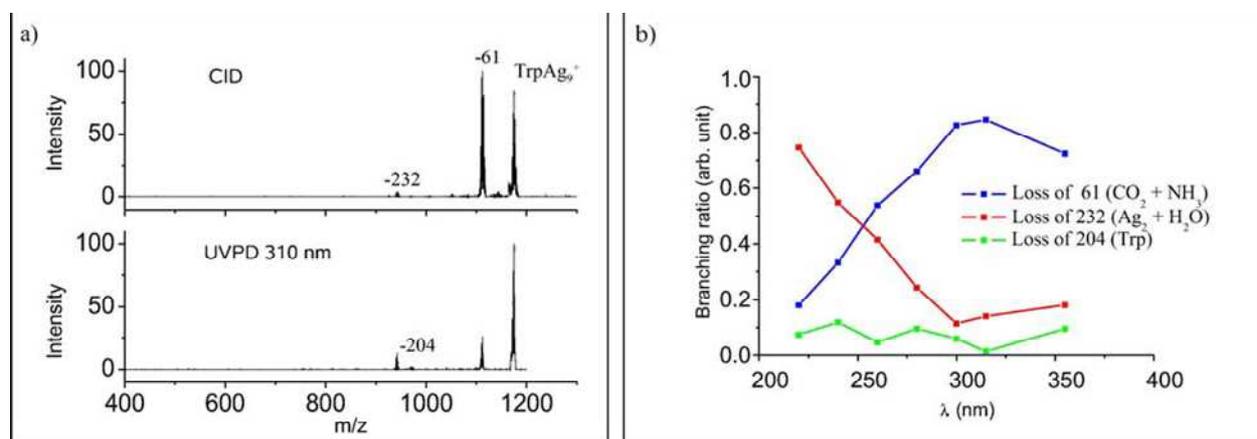


Figure 3.27 - $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_9^+$, a) spectre de masse de CID et d'UVPD à 310 nm. b) rapport de branchement des photofragments.

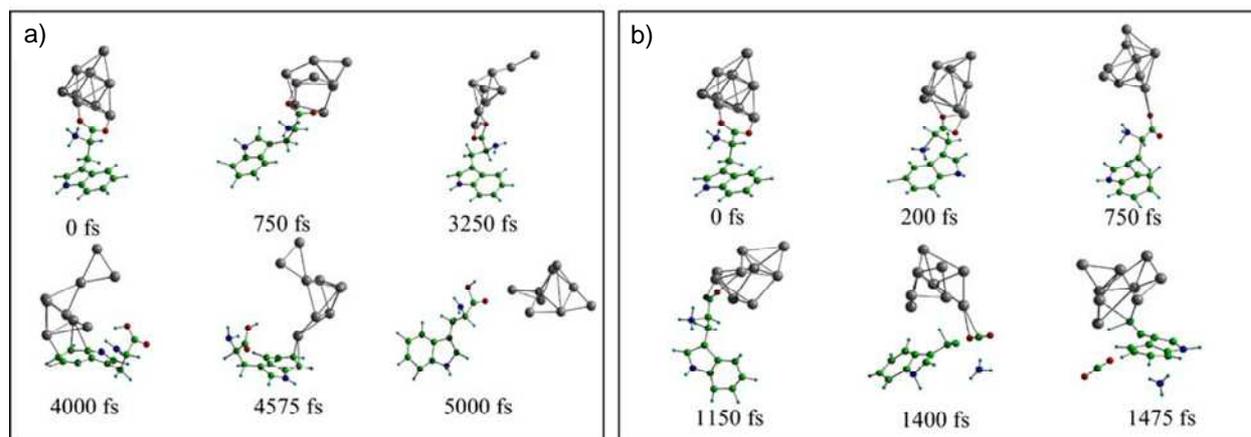


Figure 3.28 - $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_9^+$. Simulation de en dynamique moléculaire dans l'état fondamental. Cliché à différent temps pour la trajectoire qui conduit à la perte de l'agrégat Ag_9 a) et à la perte de COO et de NH_3 b).

Pour finir cette discussion, sur la figure 3.29 sont reportés, les spectres de CID, d'UVPD et les rapport de branchement des différents fragments pour le $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_5^+$. Sur le spectre d'UVPD (cf. figure 3.29 a)), on observe deux types de fragments, d'une part ceux correspondant à la fragmentation de l'agrégat par évaporation d'un atome d'argent (pic noté -107) et d'un dimère (pic noté -214), et d'autre part le pic noté -73 correspondant la fragmentation du tryptophane. Ces deux types de fragments ont été respectivement assignés à la structure CS et la structure ZW. On interprète cette observation simultanée des deux types de fragments pour le $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_5^+$ comme le possible mélange de structures CS et ZW. De plus, on note que la taille 5 est intermédiaire entre la taille 3 qui possède une structure de type CS et la taille 9 qui possède un structure de type ZW et la différence d'énergie entre les deux structures est peu élevée.

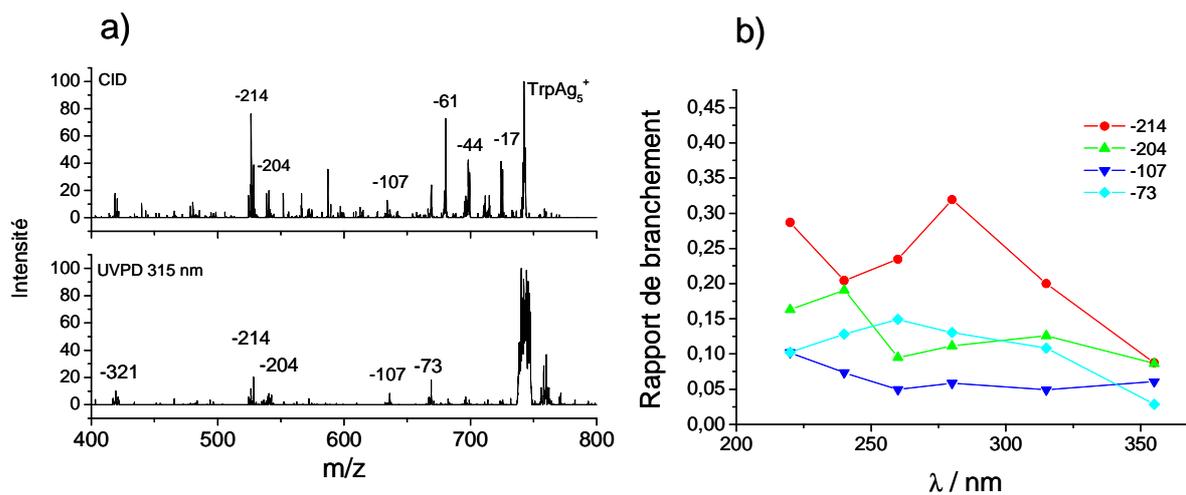


Figure 3.29 - $\text{Trp}\cdot\text{Ag}_5^+$, a) spectre de masse de CID et d'UVPD à 315 nm. b) rapport de branchement des photofragments.

Bibliographie

- [1] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Cluster*, Springer, **1995**.
- [2] T. Gleitsmann, B. Stegemann, T. M. Bernhardt, Femtosecond-laser-activated fluorescence from silver oxide nanoparticles, *Applied Physics Letters* **2004**, *84*, 4050.
- [3] L. Peyser-Capadona, J. Zheng, J. I. Gonzalez, T.-H. Lee, S. A. Patel, R. M. Dickson, Nanoparticle-Free Single Molecule Anti-Stokes Raman Spectroscopy, *Physical Review Letters* **2005**, *94*, 058301.
- [4] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, *Science* **2002**, *298*, 1759.
- [5] H. Yokota, K. Saito, T. Yanagida, Single Molecule Imaging of Fluorescently Labeled Proteins on Metal by Surface Plasmons in Aqueous Solution, *Physical Review Letters* **1998**, *80*, 4606 LP
- [6] D. Nedelkov, R. W. Nelson, Surface plasmon resonance mass spectrometry: recent progress and outlooks, *Trends in Biotechnology* **2003**, *21*, 301.
- [7] C. Kapota, J. Lemaire, P. Maitre, G. Ohanessian, Vibrational Signature of Charge Solvation vs Salt Bridge Isomers of Sodiated Amino Acids in the Gas Phase, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1836.
- [8] E. Katz, I. Willner, Integrated Nanoparticle-Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications, *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 6042.
- [9] Y. Lu, S. M. Berry, T. D. Pfister, Engineering Novel Metalloproteins: Design of Metal-Binding Sites into Native Protein Scaffolds, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3047.
- [10] T. Shoeib, H. El Aribi, K. W. M. Sun, A. C. Hopkinson, A study of silver (I) ion organonitrile complexes: Ion structures, binding energies, and substituent effects (vol 105A, pg 716, 2000), *Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 1383.

- [11] T. Shoeib, A. C. Hopkinson, K. W. M. Siu, Collision-Induced Dissociation of the Ag⁺-Proline Complex: Fragmentation Pathways and Reaction Mechanisms-A Synergy between Experiment and Theory, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 12399.
- [12] T. Shoeib, K. W. M. Siu, A. C. Hopkinson, Silver ion binding energies of amino acids: Use of theory to assess the validity of experimental silver ion basicities obtained from the kinetic method, *Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106*, 6121.
- [13] C. Kapota, J. Lemaire, P. Maitre, G. Ohanessian, Vibrational signature of charge solvation vs salt bridge isomers of sodiated amino acids in the gas phase, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 1836.
- [14] N. C. Polfer, B. Paizs, L. C. Snoek, I. Compagnon, S. Suhai, G. Meijer, G. von Helden, J. Oomens, Infrared fingerprint spectroscopy and theoretical studies of potassium ion tagged amino acids and peptides in the gas phase, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 8571.
- [15] M. F. Bush, J. T. O'Brien, J. S. Prell, R. J. Saykally, E. R. Williams, Infrared spectroscopy of cationized arginine in the gas phase: Direct evidence for the transition from nonzwitterionic to zwitterionic structure, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 1612.
- [16] A. Kamariotis, O. V. Boyarkin, S. R. Mercier, R. D. Beck, M. F. Bush, E. R. Williams, T. R. Rizzo, Infrared spectroscopy of hydrated amino acids in the gas phase: Protonated and lithiated valine, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 905.
- [17] K. F. Willey, P. Y. Cheng, M. B. Bishop, M. A. Duncan, Charge-Transfer Photochemistry in Ion Molecule Cluster Complexes of Silver, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 4721.
- [18] K. F. Willey, P. Y. Cheng, K. D. Pearce, M. A. Duncan, Photoinitiated Charge-Transfer and Dissociation in Mass-Selected Metalloorganic Complexes, *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 4769.
- [19] Y. S. Yang, W. Y. Hsu, H. F. Lee, Y. C. Huang, C. S. Yeh, C. H. Hu, Experimental and theoretical studies of metal cation-pyridine complexes containing Cu and Ag, *Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 11287.
- [20] R. B. Cody, I. J. Amster, F. W. McLafferty, Peptide Mixture Sequencing by Tandem Fourier-Transform Mass Spectrometry, *PNAS* **1985**, *82*, 6367.

- [21] R. Antoine, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd,, Specific photodissociation of peptides with multi-stage mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 2883.
- [22] G. Wang, R. B. Cole, Solvation Energy and Gas-Phase Stability Influences on Alkali Metal Cluster Ion Formation in Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 873.
- [23] D. X. Zhang, R. G. Cooks, Doubly charged cluster ions (NaCl)_m(Na)₂ (2+): magic numbers, dissociation, and structure, *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *196*, 667.
- [24] H. B. Li, K. W. M. Siu, R. Guevremont, J. C. Y. LeBlanc, Complexes of silver(I) with peptides and proteins as produced in electrospray mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 781.
- [25] G. N. Khairallah, R. A. J. O'Hair, Gas-Phase Synthesis of Ag₄H⁽⁺⁾ and its mediation of the C-C coupling of allyl bromide, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 728.
- [26] T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, Facile formation of bare silver clusters in electrospray ionization multi-stage mass spectrometry, *European Physical Journal D* **2006**, *37*, 237.
- [27] A. K. Vrkic, T. Taverner, P. F. James, R. A. J. O'Hair, Gas phase ion chemistry of biomolecules, Part 38. Gas phase ion chemistry of charged silver(I) adenine ions via multistage mass spectrometry experiments and DFT calculations, *Dalton Transactions* **2004**, 197.
- [28] G. N. Khairallah, R. A. J. O'Hair, Gas phase synthesis and reactivity of Ag-n⁽⁺⁾ and Ag_n-1H⁺ cluster cations, *Dalton Transactions* **2005**, 2702.
- [29] S. Kruckeberg, G. Dietrich, K. Lutzenkirchen, L. Schweikhard, C. Walther, J. Ziegler, The dissociation channels of silver clusters Ag-n⁽⁺⁾, 3 ≤ n ≤ 20, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1996**, *155*, 141.
- [30] A. D. Becke, Density-Functional Thermochemistry .3. The Role of Exact Exchange, *Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648.
- [31] C. T. Lee, W. T. Yang, R. G. Parr, Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density, *Physical Review B* **1988**, *37*, 785.
- [32] V. Bonacic-Koutecky, V. Veyret, R. Mitric, Ab initio study of the absorption spectra of Ag-n (n=5-8) clusters, *Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 10450.

- [33] D. Nolting, C. Marian, R. Weinkauff, Protonation effect on the electronic spectrum of tryptophan in the gas phase., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, 6, 2633.
- [34] T. E. Creighton, *Proteins : Structures an Molecular Properties*, Second ed., Freeman, **1993**.
- [35] F. O. Talbot, T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, Photodissociation spectroscopy of trapped protonated tryptophan, *The Journal of Chemical Physics* **2005**, 122, 074310.
- [36] P. R. Callis, Molecular-Orbital Theory of the 11b and 11a States of Indole, *Journal of Chemical Physics* **1991**, 95, 4230.
- [37] D. Creed, The Photophysics and Photochemistry of the near-Uv Absorbing Amino-Acids .1. Tryptophan and Its Simple Derivatives, *Photochemistry and Photobiology* **1984**, 39, 537.
- [38] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive (1)pi sigma* states: A new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, 4, 1093.
- [39] L. SerranoAndres, B. O. Roos, Theoretical study of the absorption and emission spectra of indole in the gas phase and in a solvent, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 185.
- [40] L. C. Snoek, R. T. Kroemer, M. R. Hockridge, J. P. Simons, Conformational landscapes of aromatic amino acids in the gas phase: Infrared and ultraviolet ion dip spectroscopy of tryptophan, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, 3, 1819.
- [41] R. A. Jockusch, A. S. Lemoff, E. R. Williams, Effect of metal ion and water coordination on the structure of a gas-phase amino acid, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 12255.
- [42] T. Wyttenbach, M. Witt, M. T. Bowers, On the stability of amino acid zwitterions in the gas phase: The influence of derivatization, proton affinity, and alkali ion addition, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 3458.
- [43] J. E. Sansonetti, W. C. Martin, Basic atomic spectroscopic data, <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Handbook/Tables/silvertable5.htm>.
- [44] H. ElAribi, G. Orlova, A. C. Hopkinson, K. W. M. Siu, Gas-Phase Fragmentation Reactions of Protonated Aromatic Amino Acids: Concomitant and Consecutive Neutral Eliminations and Radical Cation Formations, *J. Phys. Chem. A* **2004**, 108, 3844.

- [45] H. Yokota, K. Saito, T. Yanagida, Single molecule imaging of fluorescently labeled proteins on metal by surface plasmons in aqueous solution, *Physical Review Letters* **1998**, *80*, 4606.
- [46] J. Tiggesbaumker, L. Koller, H. O. Lutz, K. H. Meiwes-Broer, Giant resonances in silver-cluster photofragmentation, *Chemical Physics Letters* **1992**, *190*, 42.
- [47] O. K. Rice, H. C. Ramsperger, *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, *49*, 1617.
- [48] L. S. Kassel, *J. phys. Chem.* **1928**, *32*, 1065.
- [49] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive $1[\pi]^*[\sigma]^*$ states: A new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*, 1093.
- [50] G. Gregoire, C. Jouvet, C. Dedonder, A. L. Sobolewski, Ab initio Study of the Excited-State Deactivation Pathways of Protonated Tryptophan and Tyrosine, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6223.

CHAPITRE IV

PHOTO-DETACHEMENT D'ELECTRON SUR DES POLYANIONS BIOMOLECULAIRES PIEGES

4.1	ADN	157
4.1.1	Présentation de l'ADN	158
4.1.2	ADN et propriétés physico-chimiques	159
4.2	Photodétachement d'électron d'ADN	160
4.2.1	Photodétachement d'électron dans des simples brins	160
4.2.2	Mécanisme de photodétachement d'électron	166
4.2.3	Photodétachement d'électron de double brin d'ADN	170
4.3	Dissociation par photodétachement d'électron	173
4.3.1	CID des brins ADN radicalaire	173
4.3.2	ADN et ligands non covalents	177
4.3.3	ADN et ligands covalents	183
4.4	EPD sur les peptides	186
4.4.1	Spectre de photodétachement d'électron	186

CHAPITRE IV

PHOTO-DETACHEMENT D'ELECTRON SUR DES POLYANIONS BIOMOLECULAIRE PIEGES

Dans ce chapitre, je vais présenter une étude exploratoire des effets de l'irradiation UV sur des polyanions biomoléculaires piégés. La photo-réactivité de ces polyanions conduit principalement à un détachement d'électrons et à la formation d'une espèce radicalaire oxydée. Ce détachement peut être vu comme une oxydation de la biomolécule et peut notamment permettre de mieux comprendre les mécanismes de photo oxydation de l'ADN.

Dans une première partie, nous étudierons l'ADN sous forme de simple brin et double brin. Nous y observerons l'influence de l'énergie du photon, de la nature des bases et nous discuterons des mécanismes de perte d'électrons. Pour finir cette première partie, je présenterai des expériences de photodétachement d'électrons sur des ligands attachés de manière covalente ou non covalente à des brins d'ADN. Dans une seconde partie, je présenterai les premiers résultats observés sur la perte d'électron de peptides anioniques multichargés. En parallèle, des applications analytiques de photodétachement d'électrons à travers l'utilisation des radicaux formés seront présentées.

Les expériences sur l'ADN ont été réalisées en collaboration avec le groupe d'Edwin de Pauw de l'université de Liège, notamment lors de la venue à Lyon de Valérie Gabelica et Frédéric Rosu. Les expériences sur le peptide ont été réalisées en collaboration avec Jérôme Lemoine de l'unité des Sciences Analytique de l'université de Lyon 1.

4.1 ADN

Dans cette partie nous allons étudier les effets de l'irradiation laser sur des brins d'ADN. Les dommages que peuvent créer les rayons solaires, en particulier les rayons UVC (<290 nm) sont connus pour induire des mutations génétiques.^[1, 2] L'ADN possède cependant des propriétés optiques qui lui permettent d'avoir une importante photostabilité, lui conférant le rôle de porteur de l'information génétique.^[2-4] L'objectif est de réaliser des expériences de spectroscopie optique et d'étudier les mécanismes de photo oxydation sur des simples brins ou des doubles brins d'ADN isolés pour mieux comprendre les propriétés photophysiques de l'ADN.

Les principaux résultats de la littérature concernent l'étude de base d'ADN seules (spectroscopie IR et UV). Des expériences de spectroscopie de photo électrons ont également été réalisées par les groupes de M. Kappes^[5] et L. S. Wang.^[6] Le principal résultat étant la localisation de la HOMO (*High Orbital Molecular Occupied*) sur les bases de l'ADN ou sur le phosphate suivant les séquences étudiées. Récemment J. H. Parks^[7] a publié les premiers résultats d'expériences optiques en phase gazeuse sur des brins d'ADN. Il s'agit d'expériences de fluorescence (FRET, *Förster Resonance Energie Transfert*) dans le visible. Ces mesures, où un donneur et un accepteur sont des chromophores greffés sur l'ADN, ont notamment permis d'observer l'ouverture de la double hélice.

Les calculs de propriétés structurales et électroniques de type *ab initio* sur l'ADN sont encore difficilement applicables, bien que quelques récents travaux théoriques aient été réalisés sur de petits oligomères^[8-10]. De nombreux travaux se sont focalisés soit sur des modélisations semi empiriques^[11] (ou empiriques) soit sur des calculs de chimie quantique^[2] appliqué à des briques de l'ADN (bases, nucléotide monophosphate, désoxyribose nucléotide monophosphate). D'autres techniques de calcul dans le cadre de la théorie excitoniques ont été appliquées à différents brins d'ADN en hélice.^[12, 13]

Une première partie de ce travail a été consacrée à la compréhension des mécanismes de relaxations après l'absorption de photons UV sur des simples brins. Une seconde partie présentera des résultats sur des doubles brins d'ADN sur lesquels on fixera des ligands à propriétés optiques spécifiques et modulables.

4.1.1 Présentation de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique. Il est formé d'une séquence composée par les quatre bases de l'ADN, l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G) qui sont complémentaires deux à deux : A-T, G-C (cf. figure 4.1). Une séquence d'ADN code une protéine, un groupe de trois bases forme un codon qui correspond à un acide aminé. L'ADN native se présente sous forme de deux brins de séquence complémentaire enroulés en double hélice (Watson et Crik) comme on le voit sur la figure 4.2 a). Chaque brin est composé d'une chaîne principale formée par un phosphate et un sucre (désoxyribose) sur lequel est attaché une base (cf. figure 4.2 b)). La double hélice formée par les deux brins est créée et stabilisée par les liaisons hydrogènes privilégiées entre les paires de bases complémentaires des deux brins (cf. figure 4.1) ainsi que par des interactions entre les bases superposées.

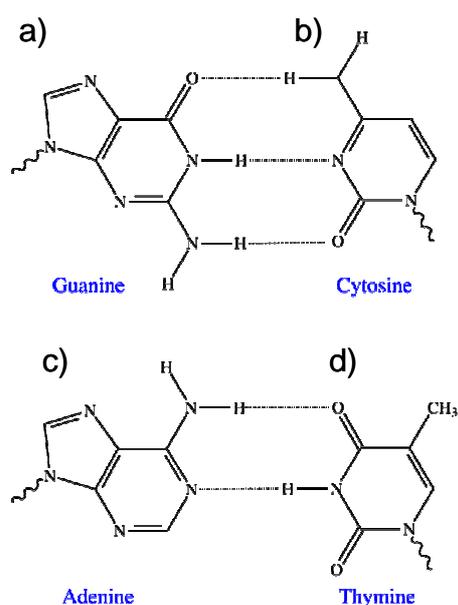


Figure 4.1 - Les quatre bases de l'ADN. a) Guanine, b) Cytosine, c) Adénine, d) Thymine. L'adénine (A) et la guanine (G) sont des pyridines, la thymine (T) et la cytosine (C) sont des pyrimidines. Les bases se couplent par deux à l'aide de liaisons hydrogènes.

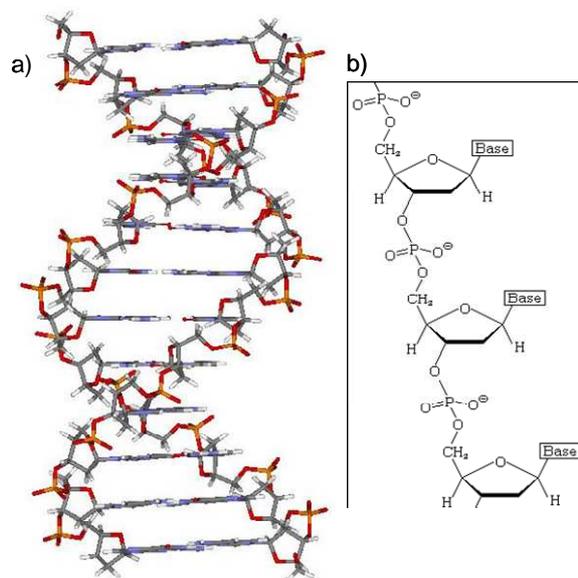


Figure 4.2 - Brin d'ADN. a) double brin organisé en hélice (Watson et Crick).^[14] b) séquence d'un simple brin avec la chaîne phosphate désoxyribose.

4.1.2 ADN et propriétés physico-chimiques

Le but de nos expériences est d'étudier en phase gazeuse les propriétés optiques de brins et de doubles brins d'ADN et de corréler ces propriétés aux problématiques d'endommagement et d'oxydation.

Le caractère fortement acide des phosphates (H_3PO_4) permet de porter facilement de nombreuses charges négatives par déprotonation. L'utilisation de l'électrospray permet de mettre en phase gazeuse des brins à partir d'une solution. Le mode négatif de la source ESI permet d'observer des brins en hélice sous formes anioniques, avec des charges négatives portées par les phosphates.^[15] Etant une méthode d'ionisation douce, la source électrospray permet de conserver les liaisons hydrogène avec l'observation de doubles brins.^[16, 17] Par la suite, nous utiliserons souvent des séquences modèles dites palindromiques. Ces séquences sont auto-complémentaires et peuvent, avec deux brins identiques, former une hélice en double brin comme nous le verrons un peu plus loin (cf. figure 4.11, p171).

Le spectre UV-visible en solution de brin d'ADN présente une forte absorption autour de 260 nm. Cette absorption est due aux quatre bases A, T, G, C, et implique les électrons π du cycle des bases. On observe de la fluorescence pour les bases seules mais aussi pour les brins simples et doubles.^[18, 19]

Solution. Tous les oligonucléotides que nous utilisons, proviennent de la gamme OligoGold® synthétisés par la société Eurogentec (Liège, Belgique). Les oligonucléotides sont solubilisés dans une eau deux fois distillée, puis dilués à une concentration de 100µM dans une solution concentrée à 100mM d'acétate d'ammonium. L'ensemble constitue la solution « stock ». La solution finale injectée dans la source électrospray est à une concentration d'ADN d'environ 20µM dans un mélange eau/méthanol à 50/50 (v/v). La solution est un tampon basique qui permet la création de brin en double hélice et favorise la création d'anions lors du fonctionnement en mode négatif de la source ESI. Pour différencier un simple brin d'un double brin de même m/z (le double brin doublement chargé par rapport au simple brin) on peut utiliser plusieurs techniques. De manière basique, même avec une mauvaise résolution du spectromètre sur un simple brin, on verra une résolution des isotopes alors que pour le double brin on verra un gros massif mal résolu. Si l'on voit des états de charge adjacents (état impair) il n'y a plus d'ambiguïté. Après on peut utiliser la CID en identifiant les pertes de base neutre, (perte de 150/z pour G, 136/z pour A,...).

4.2 Photodétachement d'électron d'ADN

4.2.1 Photodétachement d'électron dans des simples brins

L'étude de simples brins d'ADN de petites tailles est une étape importante pour la compréhension des mécanismes impliqués dans le photodétachement de brin d'ADN. Nous allons utiliser des oligonucléotides formés d'hexamère (6-mère) avec diverses séquences ce qui va permettre de faire varier facilement certains paramètres comme la nature des bases. De nombreuses études ont été réalisées sur des systèmes similaires par spectroscopie de photo-électron.^[5, 6] La comparaison avec ces résultats sera intéressante.

Pour réaliser les spectres de photodissociation de brin d'ADN, nous utilisons le montage couplant le spectromètre au laser OPO.

Le photodétachement. Le système que nous allons utiliser dans un premier temps est le 6-mère G₆ dont on va isoler l'espèce chargée trois fois déprotonée [M-3H]³⁻ notée dG₆³⁻, afin de pouvoir observer plusieurs détachements d'électron tout en conservant une espèce chargée. Lorsque l'on irradie le dG₆³⁻ à la longueur d'onde de 260 nm par un seul pulse laser on observe sur la figure 4.3 a), une intense perte d'électron qui produit l'espèce radicalaire dG₆²⁻. En insert, on voit aussi de manière très faible la perte d'un deuxième électron qui

donne l'espèce doublement radicalaire $dG_6^{••1-}$. Ce processus est très efficace, de l'ordre de 40 % sur un pulse.

Le spectromètre de masse ayant une limitation à $m/z=2000$. Une attention particulière doit être prise de manière à visualiser toutes les espèces produites suite à l'irradiation laser qui auront un m/z élevée. Généralement de faibles temps d'activation seront utilisés, 50-250 ms (1 à 5 pulses).

Afin de caractériser le photodétachement dans un polymère d'ADN, nous allons étudier trois points particuliers.

- i) Le processus est-il mono ou multiphotonique?
- ii) Tracer le spectre optique de photodétachement en phase gazeuse.
- iii) Estimer l'influence de la base sur l'efficacité du photodétachement.

Processus à un ou plusieurs photons. A 260 nm, on fait varier la puissance du laser à l'aide d'un atténuateur composé d'une lame $\lambda/2$ et d'un cube polariseur. On enregistre des spectres de photodétachement pour un pulse et deux pulses laser à différentes puissances laser. Les observables que l'on utilise sont les intensités relatives relevées sur le spectre de masse pour la perte d'un électron et de deux électrons. Ces résultats sont présentés sur la figure 4.3 b). La perte d'un électron est représentée par les cercles, la perte de deux électrons correspond au carré. La perte d'un électron évolue de manière linéaire en fonction de la fluence laser, ce qui indique que le processus de perte d'un électron est monophotonique. Pour la perte de deux électrons, un comportement non-linéaire implique un processus multiphotonique, probablement à deux photons. On constate que les courbes avec le motif plein (un seul pulse) et celles avec les motifs vides (à 2 pulses), suivent les mêmes courbes d'ajustement en traits pleins. Cela suggère que les processus induits par des pulses successifs sont indépendants.

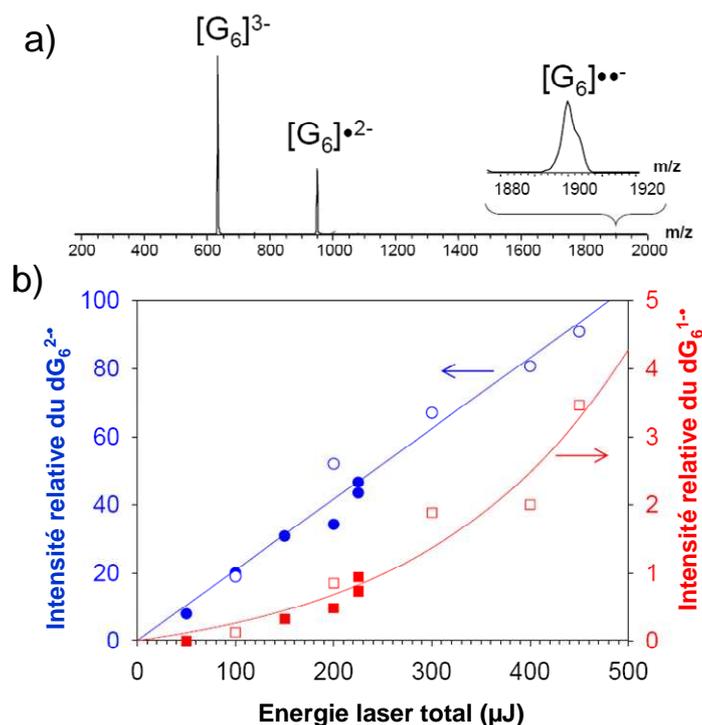


Figure 4.3 - a) spectre de masse de photodétachement du 6-mère G_6^{3-} . b) intensité (des pics) du détachement de G_6^{3-} en fonction de la puissance laser. Les ronds correspondent à la production du G_6^{2-} , les carrés montrent la production du G_6^{1-} . Les points pleins représentent les mesures à 1 pulse et les creux représentent la mesure à 2 pulses. Les courbes continues sont des ajustements linéaires et quadratiques sur les points mesurés.

Spectre optique de photodétachement. Le spectre optique de photodétachement de $[G_6]^{3-}$ est présenté sur la figure 4.4 a). Il est obtenu de la même manière que les spectres optiques de photodissociation présentés précédemment.^[20] Le taux de photodétachement prend en compte les pertes de un et de deux électrons. Le photodétachement dépend de la longueur d'onde et présente un maximum autour de 260 nm. Cette courbe est en accord avec les courbes d'absorption en solution de la guanine (cf. figure 4.4b)). Néanmoins, la différence de profile entre le spectre a) en phase gazeuse de G_6 et b) en solution de G (cf. figure 4.4 b)) observée, pourrait être associée à une structure repliée de l'oligomère en phase gazeuse.^[21] De manière générale, le photodétachement semble corrélér à l'absorption de la base. Aucun photodétachement n'est observé après 300 nm. La chute du taux de photodétachement autour de 220 nm est plus étonnante (cf. annexe IV). Cela semblerait suggérer que les bandes $\pi\pi^*$ et plus internes ($n-\pi^*$) présentent une séparation plus importante en phase gazeuse qu'en solution. Le choix de travailler à 260 nm semble être judicieux.

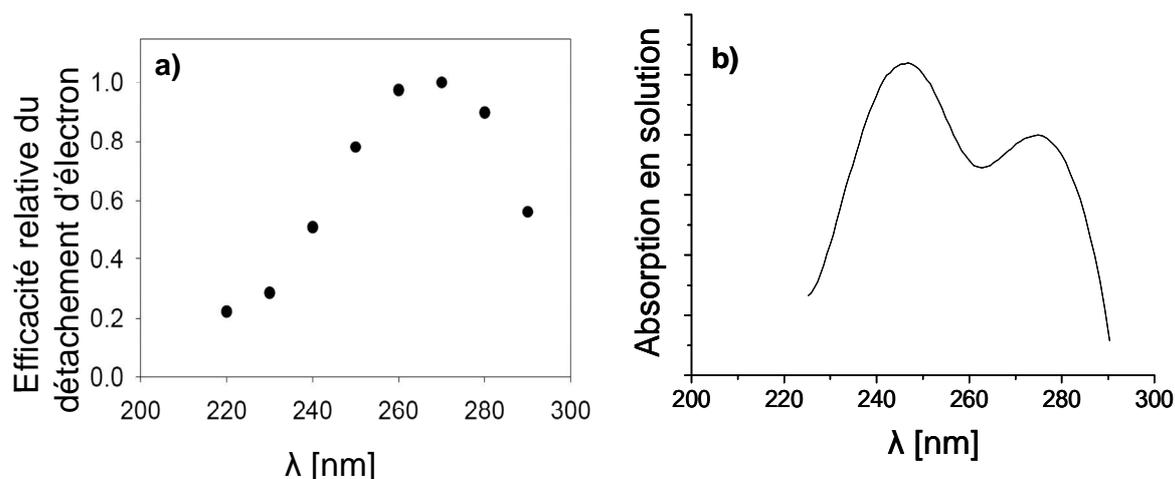


Figure 4.4 – a) *spectre optique de photodétachement d'électron pour le G_6^{3-} avec un pulse laser à 260 nm.* b) *spectre d'absorption de la guanine en solution aqueuse à pH=7.*

Influence de la base. Les quatre bases de l'ADN, G, A, C, T, possèdent des spectres d'absorption en solution similaires^[22] avec une large bande centrée à 260 nm. Pour l'instant, seul le 6-mère $[G_6]^{3-}$ a été présenté et sa forte efficacité de photodétachement nous a permis de travailler avec peu de pulses laser. Par contre, pour avoir un effet significatif sur les trois autres 6-mères $[A_6]^{3-}$, $[C_6]^{3-}$, $[T_6]^{3-}$, il faut passer à une irradiation de 5 pulses. La figure 4.5 présente les spectres obtenus pour les quatre 6-mères dans les mêmes conditions laser, en mode AGC ce qui permet de conserver un nombre constant d'ion dans le piège. Le $[A_6]^{3-}$ et dans une moindre mesure le $[C_6]^{3-}$, présentent un photodétachement. Le $[T_6]^{3-}$ ne photodétache pas mais présente des fragments notés w, a-base en accord avec la nomenclature proposée par Wu et McLuckey^[23] qui correspond à des fragments observés en CID. Le $[A_6]^{3-}$ présente ces fragments de CID de manière intense, de même que $[G_6]^{3-}$ mais beaucoup moins intense. L'hypothèse d'une compétition entre les voies de fragmentation et le photodétachement est à prendre en compte même si dans ces expériences, plusieurs pulses sont impliqués et que l'absorption successive de photons par le même anion peut rendre plus complexe l'interprétation.

La guanine joue un rôle particulier dans le photodétachement d'électron en phase gazeuse et cette voie semble être une voie favorisée de désexcitation pour la guanine. D'autres résultats montrent que sur des chaînes de 12-mères le photodétachement n'est observé que sur

les brins contenant des guanines.^[6, 24] Cependant de récents résultats ont montré un photodétachement d'électron sur des multimères d'adénine (A_{20}) en solution.^[25] L'efficacité de photodétachement des bases peut être classée ainsi, $[G_6]^{3-} < [A_6]^{3-} < [C_6]^{3-} < [T_6]^{3-}$.

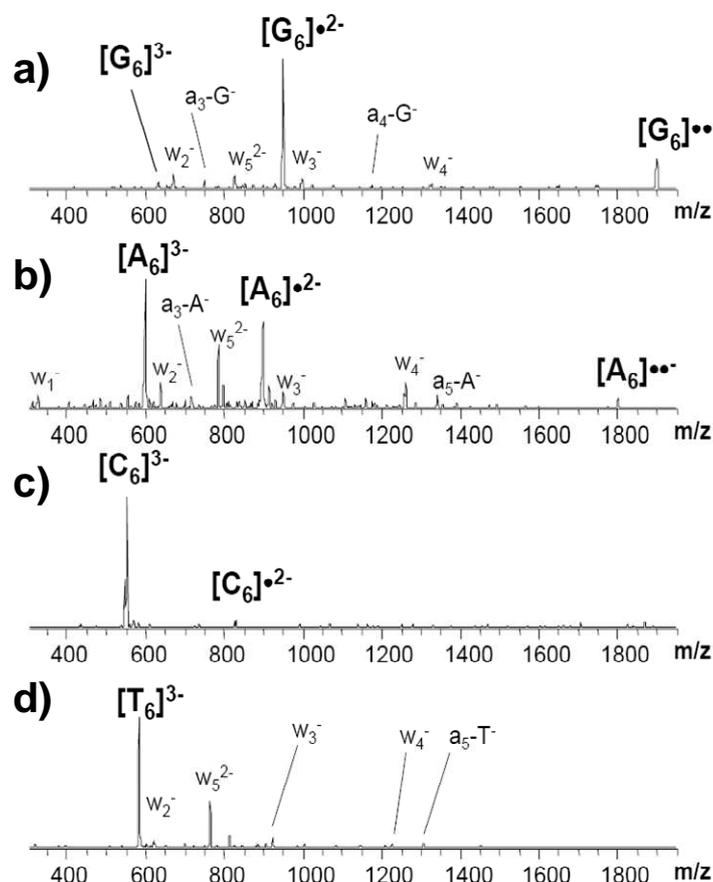


Figure 4.5 - Spectre de photodétachement pour les 6-mères a) G_6 , b) A_6 , c) C_6 , d) T_6 pour l'état de charge 3-. L'irradiation est réalisée par 5 pulses à 260 nm. Spectres réalisés en mode AGC.

L'explication la plus naturelle pour ces différences de détachement serait une différence d'absorption des bandes. On peut relier l'efficacité absorption à l'extinction molaire en solution et les quatre 6-mères étudiées s'ordonne comme $A_6 > G_6 > T_6 > C_6$ (voir annexe IV).^[26] On peut conclure que l'efficacité d'absorption des bases ne peut pas expliquer leur dépendance dans le photodétachement observé.

La figure 4.6 montre l'évolution de l'efficacité de photodétachement (PD) en fonction du nombre de pulses pour six 6-mères dans lesquels le nombre de guanines et la nature des autres bases varient. En comparant $[A_6]^{3-}$ et $[GT_5]^{3-}$ et en supposant que la thymine n'a absolument aucun effet sur le PD, une guanine est plus efficace que six adénines. $[GT_5]^{3-}$,

$[G_2T_4]^{3-}$, $[G_3T_3]^{3-}$ montre que l'efficacité de PD augmente avec le nombre de guanine, cela suggère donc que chaque guanine contribue de manière indépendante au photodétachement.

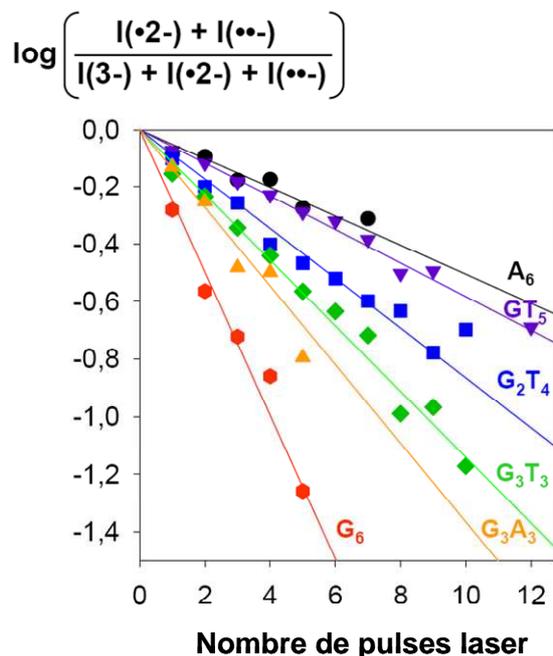


Figure 4.6 - Courbes de dépendance du photodétachement d'électron en fonction du nombre de pulses laser pour différentes séquences de $[6\text{-mère}]^{3-}$. A_6 cercle noir, GT_5 triangle violet, G_2T_4 carré bleu, G_3T_3 losange vert, G_3A_3 triangle orange, G_6 rond rouge.

La guanine tient une place essentielle dans le mécanisme de photodétachement. Yang et *al.* ont présenté des résultats sur le $[dGMP-H]^-$ (désoxyguanosine monophosphate, monomère de guanine) et ont montré qu'il présente la plus faible énergie de liaison de l'électron (4.61 eV) par rapport aux autres monomères (dAMP, dCMP, dTMP). Par spectroscopie de photo électrons^[6], il observe un détachement d'électron de basse énergie dans le cas de $[dGMP-H]^-$. Par des calculs de DFT, il confirme que la HOMO se localise sur la base uniquement pour la guanine et pour les trois autres bases, la HOMO se situe sur les phosphates. Les auteurs suggèrent que le détachement d'électron à basse énergie dans le cas du $[dGMP-H]^-$ est causé par l'ionisation de la guanine qui possède le potentiel d'ionisation (IP) le plus bas des quatre bases et constitue un agent particulier dans l'oxydation de l'ADN. D'autres auteurs soulignent que les pyridines (guanine et adénine) se désexcitent plus rapidement que la cytosine et la thymine.^[19, 27] Pour finir, de récents calculs ont montré que les HOMO sont localisés sur les bases quelle que soit la base nucléotide.^[24] En conclusion, il est clair que l'IP de la guanine semble jouer un rôle particulier dans le photodétachement.

4.2.2 Mécanisme de photodétachement d'électron

La compréhension du mécanisme de photodétachement de l'ADN est complexe. De nombreuses recherches tentent d'éclaircir ce processus. Certaines études montrent que la délocalisation des états excités sur plusieurs bases est nécessaire pour absorber.^[8, 12, 28] De plus, la difficulté à décrire correctement les états électroniques dans l'ADN amène souvent à des résultats contradictoires sur la position des HOMO (base ou phosphate), sur le calcul des énergies verticales de détachement et sur les énergies adiabatiques de détachement.^[6, 29, 30] Les bases d'ADN présentent des transitions de type $\pi\pi^*$ dont les durées de vie sont très courtes.^[27, 31] C'est souvent un argument avancé pour expliquer la forte stabilité de l'ADN face au rayonnement de type UV.^[2, 32]

Le mécanisme d'éjection est complexe et fait sans doute intervenir des propriétés de délocalisations électroniques spécifiques. Comme le montre la figure 4.4 et notamment la similitude entre le spectre d'action de photodétachement d'électron et d'absorption en solution, la première étape dans ce mécanisme est l'excitation électronique de l'ADN. Cette excitation est monophotonique. L'excitation est à priori localisée sur les bases de l'ADN. La question sur cette première étape, largement débattue dans la littérature, est de savoir si l'excitation est localisée sur une base ou localisée sur l'ensemble des bases. La seconde étape est le détachement de l'électron près de l'excitation électronique. Nous en avons proposé un mécanisme en s'appuyant sur nos résultats ainsi que sur certains résultats de la littérature, portant notamment sur l'énergétique. Ces deux étapes sont illustrées sur la figure 4.7.

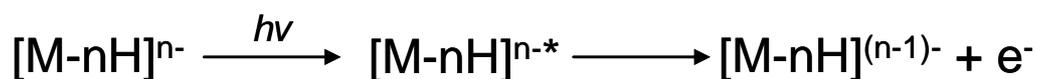


Figure 4.7 - Schéma du photodétachement. Passage par un état intermédiaire excité du système $[M-nH]^{n-*}$ après absorption d'un photon $h\nu$. Puis détachement d'un électron.

a) Corrélation à l'IP.

Le photodétachement semble directement lié à la capacité de la base à perdre un électron, comme supposé par Wang.^[6] Les charges sont portées par le phosphate^[5, 23] et les bases sont neutres donc l'énergétique est déterminée par le potentiel d'ionisation (IP, *ionization potentiel*) de la base, l'électron se détache de la base neutre : $A \rightarrow A^+ + e^-$.

Notons que les IPs des bases sont comprises entre 7.7 eV et 8.6 eV^[11] et sont bien supérieures à l'énergie du photon UV (4.77 eV). Le classement de l'IPs des bases G<A<C<T est en accord avec l'efficacité de photodétachement des 6-mères obtenu (cf. figure 4.5). Notons que cette corrélation a été observée^[25] également en solution. Yang et *al.* ont mesuré les énergies de détachement pour les trimères de G, A, C, T et obtiennent le classement suivant : $G_3^- < A_3^- < C_3^- < T_3^-$.^[6] Cela va encore dans le sens de nos observations. Le processus est fortement corrélé à l'IP.

b) Energétique et mécanisme proposé.

Suite à l'absorption d'un photon, l'oligomère se trouve dans un état excité par recouvrement Franck-Condon (état noté FC).^[18] Plusieurs voies de désexcitation sont alors possibles. (i) désexcitation radiative, (ii) conversion interne vers l'état fondamental, (iii) désexcitation par croisement avec d'autres états électroniques dissociatifs ou auto ionisants. Cette dernière voie est celle qui mène au détachement d'électron, et trois configurations énergétiques possibles sont résumées sur la figure 4.8. Si la somme de l'énergie de liaisons de l'électron (BE, *binding energy*) avec la barrière de répulsion coulombienne (RCB, *repulsive coulomb barrier*) est inférieure à l'énergie de cet état FC ou à un état électronique excité E atteint très rapidement, il peut y avoir un détachement très rapide. Si $BE < h\nu < BE + RCB$, alors le système se désexcite vers un état E auto ionisant et peut traverser la barrière de potentiel par effet tunnel pour perdre l'électron.^[33] La dernière situation est lorsque $h\nu < BE$, dans ce cas le détachement d'électron n'est pas possible.

D'un point de vue énergétique, Wang et *al.* mesurent des énergies de liaisons par PES (*PhotoElectron Spectroscopy*) pour les trimères mono chargés (dBase₃⁻) compris entre à 5.2 eV et 6.04 eV. Ces énergies sont largement supérieures à l'énergie de liaisons d'un électron sur un phosphate H₃PO₄⁻ mesuré par le même groupe à environ 5 eV.^[34]

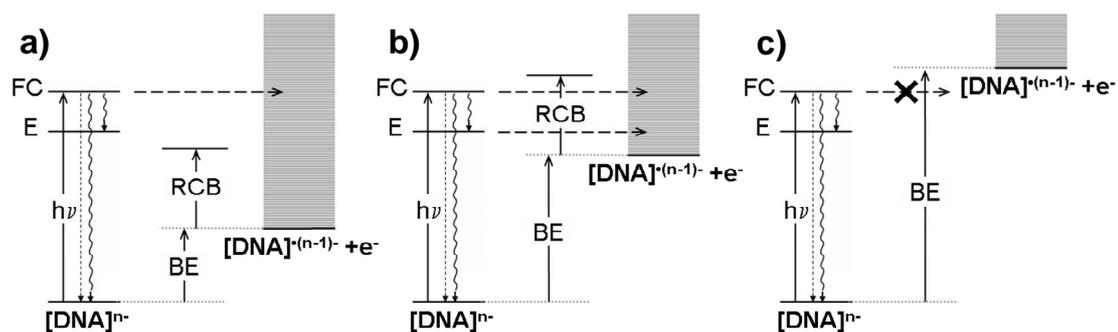


Figure 4.8 - Schéma du mécanisme de photodétachement d'électron dans les oligomères. a) ionisation par passage direct au dessus de la barrière de potentiel (RCB). b) ionisation par effet tunnel à travers la RCB. c) pas d'ionisation possible.

Bien évidemment dans notre étude, les espèces sont multidéprotonées de type dB_n^{n-} , donc le détachement d'électron est associé à une barrière coulombienne $RCB = \sum e^2 / r_{ij}$, et où r_{ij} est la distance entre deux charges.^[33] Cette barrière a pour effet en première approximation d'abaisser l'énergie de liaisons du polyanions $BE = BE_{MonoChargé} - RCB$ comme le présente Kappes et al.^[5] Pour illustrer ce phénomène, on va appliquer le calcul à G_6^{3-} . Des calculs de champ de force sur Amber99 réalisés par Rodolphe Antoine au laboratoire ont permis de déterminer la RCB à environ 1.6 - 1.65 eV. On en déduit la valeur de BE pour le brin G_6^{3-} à 3.4 eV. Ces valeurs sont reportées sur le schéma de la figure 4.9 qui est inspiré de Wang et al.^[34] D'après ces calculs très simplifiés, le mécanisme de la figure 4.8 b) semble donc le plus probable.

Dans notre cas, l'énergie nécessaire au détachement est supposée inférieure à 4.77 eV (260 nm) excepté dans le cas du 6-mères de thymine qui ne présente pas de photodétachement. L'état de charge joue donc un rôle très important. Un état de charge élevé abaisse l'énergie de liaison de l'électron et augmente la RCB. Pour des états de charges très élevées, cette énergie de liaison peut être négative.^[34] L'ion est alors métastable. On peut observer un autodétachement thermique comme pour dA_5^{-4} .^[5]

La présence de fragments a-base et w qui sont caractéristiques de la CID (cf. figure 4.5), nous indique qu'une redistribution de l'énergie intervient également dans le système. Une conversion interne est en compétition avec le détachement.

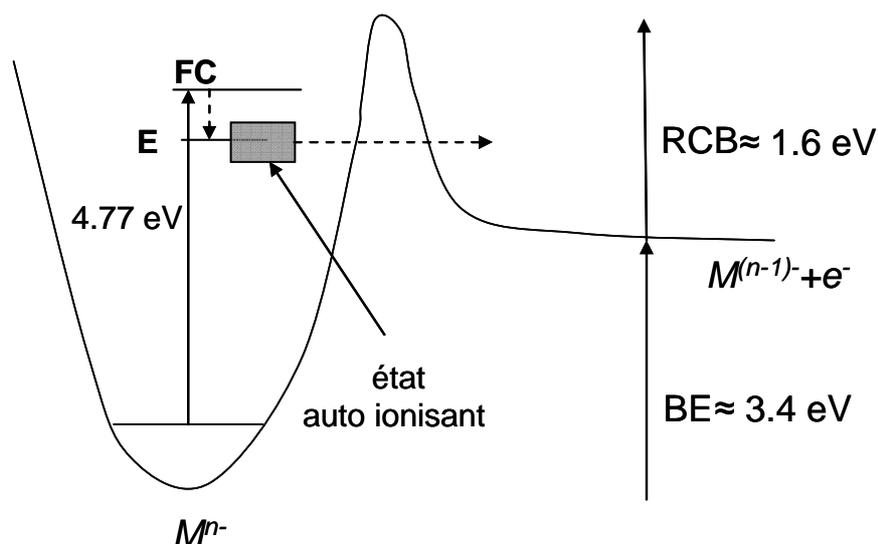


Figure 4.9 - Schéma du mécanisme de photodétachement induit par un photon de 4.77 eV (260 nm) absorbé par la base et l'éjection de l'électron se produit à partir du phosphate.

c) Question Ouvertes

Une des questions ouverte est la nature des états électroniques excités et celle des états auto-ionisants. La guanine est la base la plus apte à créer une paire électron trou (bas IP). On peut proposer une autre explication. Suite au passage dans l'état excité de la base lors de la désexcitation vers un état excité intermédiaire E, similaire à une état correspondant à la création d'une paire électron-trou. Le trou se localise sur la base et l'électron se délocalise sur le brin. Un électron des phosphates à faible énergie de liaison est éjecté. Cette proposition implique une délocalisation rapide des électrons après l'excitation qui permet d'accéder à l'état d'autodétachement du phosphate (cf. figure 4.9). La durée de vie de l'état excité sur la base est estimé à environ 380 fs avant de se désexciter vers un état $E^{[19]}$ où les électrons se délocalise. La dépendance des bases est en accord avec la création de trou puisque la guanine avec son IP faible favorise la création de paires électron trou.^[35] L'adénine possède le deuxième IP le plus faible (8.26 eV) et présente un taux de photodétachement important associé à des fragments de types CID (cf. figure 4.5 b)). Dans le modèle proposé par Philipps *et coll.*^[19], pour un simple brin d'adénine (A_{20}), des voies de désexcitation radiative des états excités délocalisés E1 et E2 sont en compétition avec ne conversion interne. Cette observation est en parfait accord avec nos spectres (voir figure 4.5). La possibilité de croiser l'état dissociatif de $\pi\sigma^*$ sur la coordonnée réactionnelle du phosphate est probable. On arrive alors au schéma proposé sur la figure 4.10 où l'état FC correspond à une excitation $\pi\pi^*$ de la

guanine et l'état E correspond à la formation d'un trou sur la guanine et avec une délocalisation d'un électron sur le brin d'ADN.

Il reste beaucoup de points à éclaircir concernant les mécanismes discutés. Néanmoins, l'influence de la base ne fait plus de doute et la guanine semble être un site d'oxydation bien préférentiel. Lorsque des séquences d'ADN plus longue (12-mères) possèdent des guanines, des photons UV ont peu d'influence. Très peu de fragmentation est observée et le processus de désexcitation aboutit à la forme d'une espèce radicalaire.

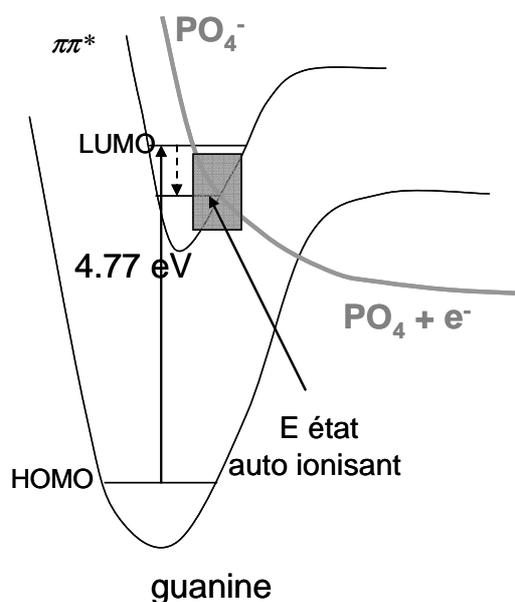


Figure 4.10 - Schéma du mécanisme de photodétachement impliquant un croisement entre l'état $\pi\pi^*$ de la guanine avec un état auto ionisant du phosphate.

4.2.3 Photodétachement d'électron de double brin d'ADN

Pour étudier la photodissociation de double brin d'ADN, nous avons utilisé des séquences dites « palindromiques ». Ce sont des séquences auto réversibles par complémentarité. Elles sont représentées sur la figure 4.11. En un milieu tampon d'acétate d'ammonium, ce type de brin se stabilise en formant une double hélice (cf. figure 4.2, p159). Les brins A, B, C formant des 12-mères adoptent ce type de structure en hélice de double brin (db). Pour le brin E formant un 20-mères, seules les quatre bases extrêmes peuvent s'associer en double brin et la partie centrale forme une boucle, c'est ce que l'on appelle une épingle à cheveux (*hair pin*). Les 12-mères A, B, C possèdent respectivement 33, 66, 100% de couple de base C-G.

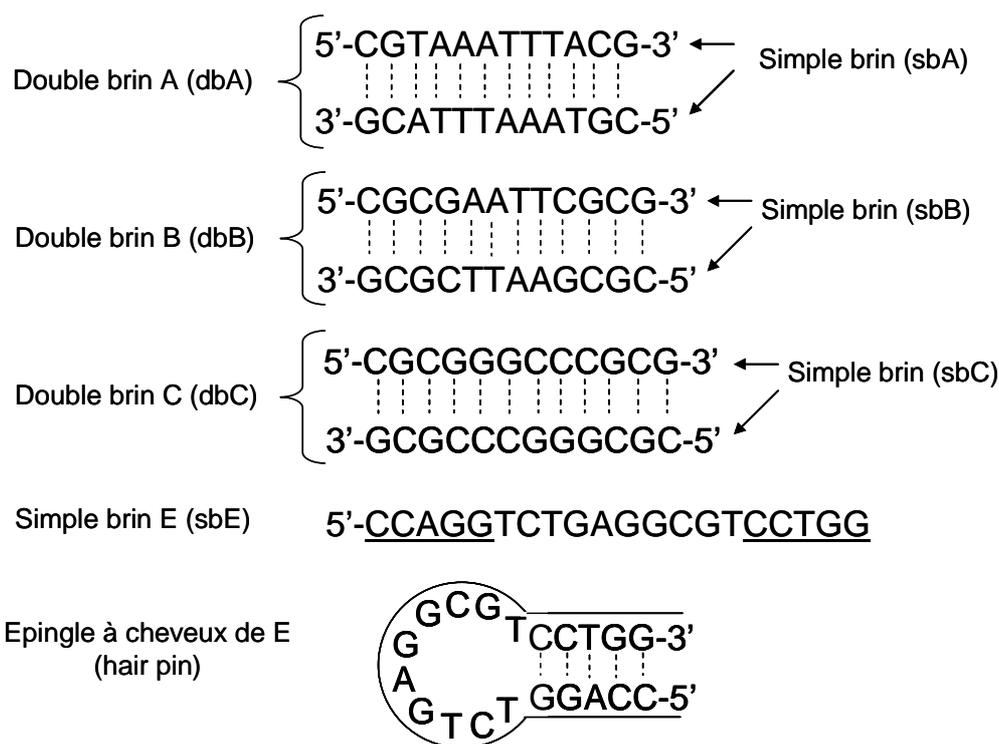


Figure 4.11 - Brin d'ADN palindromique. En milieu tampon d'acétate d'ammonium (basique), formation des doubles brins (db) pour les séquences, dbA, dbB, dbC et d'épingle à cheveux (hair pin) pour le brin E. Les brins A, B, C possèdent respectivement 33, 66, 100 % de couple C-G.

Spectre de photodétachement. Sur la figure 4.12, on a reporté les spectres de photodétachement induit par le laser à 260 nm (2 s d'irradiation) des trois doubles brins dbA, dbB, dbC sur l'état de charge 5-. Dans les trois cas, il y a un fort détachement d'électron et aucune fragmentation. De plus, on remarque que l'intensité du photodétachement est dépendante du nombre de couple G-C contenu dans chaque double brin. Ces observations sont en parfait accord avec nos résultats sur les 6-mères et confirment la forte photostabilité UV que confère le couple C-G dans les doubles hélices.^[2] On peut noter, a contrario des monomères, l'absence de fragments CID après 2 s d'activation pour les duplexes. Ceci peut être lié aux plus grands nombres de modes qui inhibent la fragmentation IVR dans notre fenêtre temporelle d'observation.

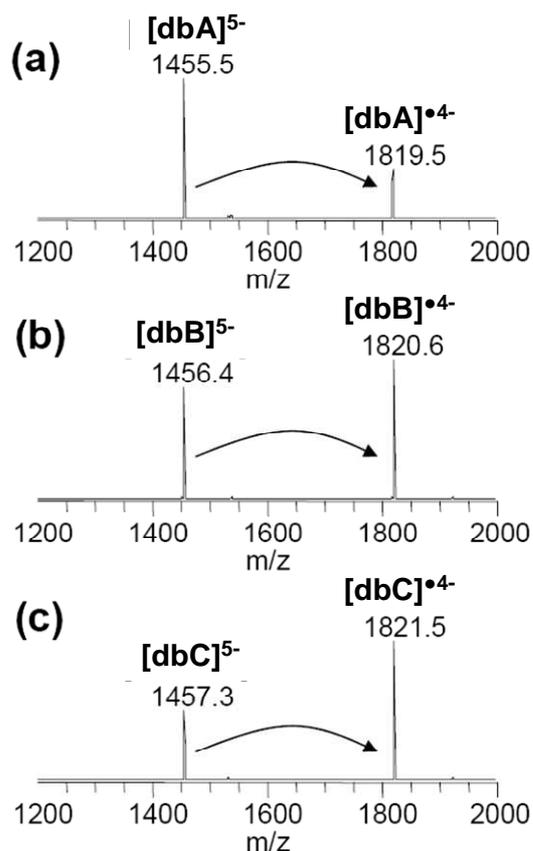


Figure 4.12 - Spectre de photodétachement des doubles brins a) dbA, b) dbB, c) dbC de l'état de charge 5- à 260 nm pendant 2 s d'irradiation.

Sur la figure 4.13, on compare pour le brin C qui a le photodétachement le plus remarquable (100 % de couple G-C), le simple brin et le double brin. On constate que le double brin photodétache au moins trois fois plus efficacement que le simple brin, on pouvait s'attendre à une augmentation par deux. Mais attention, nous n'avons pas le même état de charge. De plus, la présence de multiples liaisons hydrogènes entre les deux brins et les interactions entre les bases superposées semble fortement intervenir dans le processus de désexcitation par photodétachement. Cela peut augmenter le nombre potentiel de couplage entre états électroniques excités et favoriser le photodétachement. Alors que le simple brin de plus grande flexibilité perd sans doute cette structure en hélice en phase gazeuse.^[2]

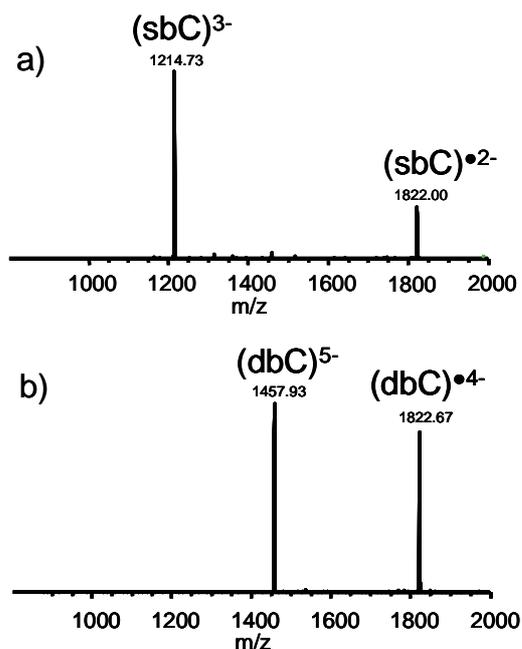
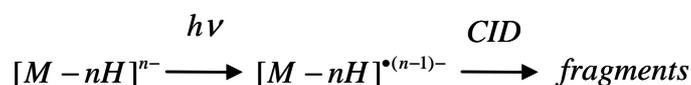


Figure 4.13 - Spectre de photodétachement du brin C, irradié à 260 nm pendant 2 s. Comparaison du double brin chargé 5- a) et du simple brin chargé 3- b).

4.3 Dissociation par photodétachement d'électron

4.3.1 CID des brins ADN radicalaire

La production de radicaux par photodétachement d'électron est très efficace cependant les fragments de séquence sont, soient absents des spectres, soient extrêmement faibles à tel point que cela n'a pas été évoqué. Cette faible efficacité de séquençage des chaînes de l'ADN n'apporte, a priori, aucune perspective pour l'analyse de séquence d'ADN. Cependant, comme cela a déjà été présenté précédemment, nous avons effectué des étapes de MS³ sur le radical produit par le photodétachement que l'on peut présenter par la formule suivante :

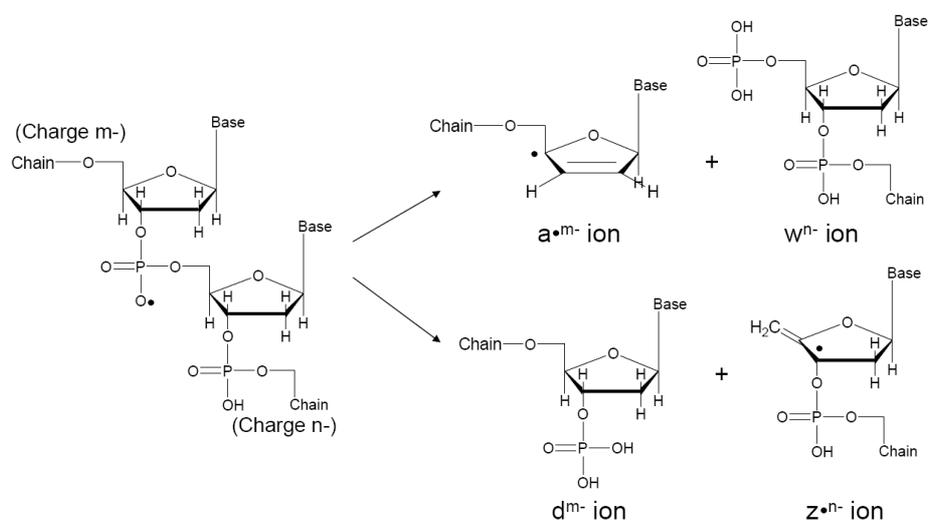


Cette méthode porte le nom de dissociation par photodétachement d'électron (EPD, *Electron Photodetachment Dissociation*).

Simple brins. Sur la figure 4.14, on compare pour le simple brin A, le spectre a) de CID pour la forme anionique de charge (3-) produit par l'électrospray non radicalaire (avec un nombre pair d'électrons) et le spectre b) de CID pour la forme anionique radicalaire de charge (3-) (avec un nombre impair d'électron) produit par le photodétachement de l'anion (4-).

L'énergie de CID utilisée est la même dans les deux cas. On observe une très forte augmentation du nombre de fragments pour le radical. Pour l'espèce non radicalaire à cette énergie, les principaux fragments observés sont des pertes de neutre. Ce sont des pertes de base notées $M-B^{3-}$ et elles ne représentent que 10% du pic parent. Pour l'espèce radicalaire, ces pertes de neutre de même intensité que le pic parent, sont dominées par la perte de la guanine ($M-G^{3-}$) et les pertes de CO et NH_3/H_2O (indifférenciable par manque de résolution). Suivant la nomenclature introduite par McLuckey^[23], qui est présentée sur le schéma suivant, on obtient la série entière des fragments a^\bullet et z^\bullet et leur complémentaires w et d . Ces résultats sont reportés sur la figure 4.14, et on constate que la fragmentation de la séquence est complète. Pour l'espèce non radicalaire, seuls les fragments w et la perte de base sont observés. Des résultats similaires sont obtenus pour les simples brins B, C, et sont résumés en annexe IV.

La fragmentation des oligonucléotides a été récemment reportée par Wu and McLuckey.^[23] Les résultats obtenus par EPD sont très similaires à ceux observés par d'autres méthodes impliquant des radicaux. En utilisant un laser à 193 nm, McLafferty observe un photodétachement associé à des fragments w et a . La production d'ions radicalaires peut être réalisée par différentes méthodes. Par transfert d'électron via des réactions avec des Xe^{+} ^[36], des CCl_3^+ ^[15] ou des O_2^+ ^[37], par collision à haute énergie sur un gaz noble.^[38] Hakanson *et al.* ont étudié la fragmentation de brin d'ADN positif par ECD et négatif par EDD. Pour l'ECD les fragments w , a^\bullet , d , and z^\bullet sont observés, pour l'EDD w/d , a^\bullet/z^\bullet sont observés pour des séquences palindromiques, selon les schémas réactionnels suivants :



La fragmentation des radicaux est spécifique, et elle varie peu en fonction des diverses méthodes de production des radicaux. D'autre part, la grande richesse de fragmentation suggère une grande mobilité du site radicalaire. En particulier dans notre cas, le séquençage complet des brins exclut l'hypothèse de la localisation exclusive du radical, sur une guanine par exemple. Cependant, on observe systématiquement la perte de guanine ce qui suggère qu'un transfert de H• soit facilité par la base guanine et permet son détachement.

Enfin, notons que, contrairement aux résultats obtenus par CID qui présentent beaucoup de fragments internes et rendent l'analyse de séquence délicate^[39], l'EPD ne présente pas de fragments internes. Cette caractéristique pourrait permettre, en comparant les deux méthodes, d'avoir un algorithme plus simple que ceux utilisés pour l'analyse des spectres en CID seul.

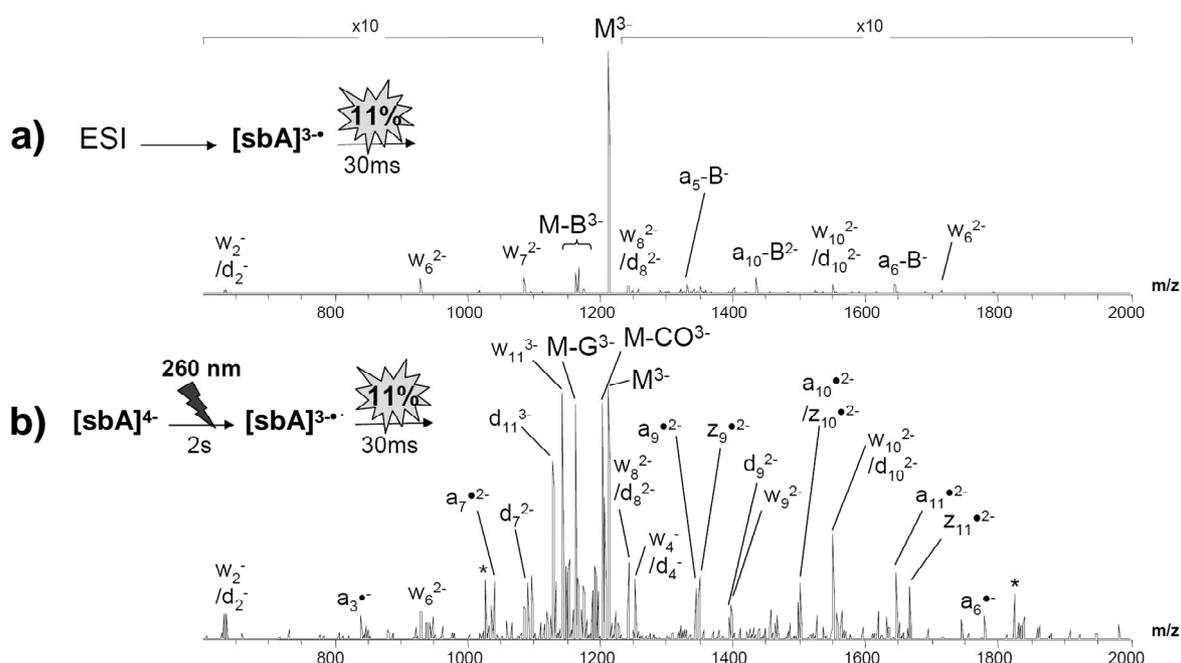


Figure 4.14 - Spectre de CID du simple brin A. a) CID sur le $[sbA]^{3\bullet\bullet}$ produit par une source electrospray ayant un nombre pair d'électrons. b) CID sur le $[sbA]^{3\bullet\bullet}$ produit par EPD à partir du $[sbA]^{4\bullet}$, la CID est réalisée sur le 2^{ème} étage de MS. L'énergie de CID est la même dans les deux cas.

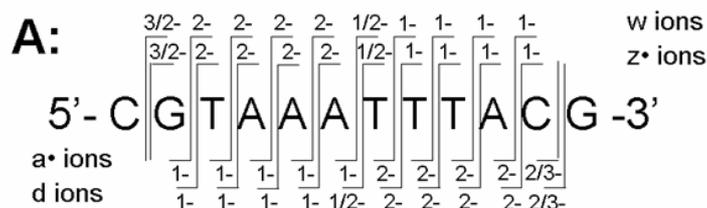


Figure 4.15 - Bilan des fragment obtenus par CID sur le radical $[sbA]^{3\bullet\bullet}$ (cf. figure 4.14 b)).

Doubles brins. Pour étudier la fragmentation par CID de brins en double hélice d'ADN radicalaires photoinduits, nous utilisons les brins en doubles hélices que peuvent former les séquences B et C. Sur la figure 4.16, les spectres de CID des espèces radicalaires et non radicalaires sont comparés pour les brins B et C avec l'état de charge 4-. Seule la zone restreinte des spectres où l'on observe des fragments est présentée. Dans le cas des espèces non radicalaires, pour les doubles brins B et C, on observe uniquement des pertes de base. Pour le brin B il y a perte de guanine et d'adénine et pour le brin C on a aussi une perte de guanine et une perte de cytosine. Cette variation est due à la différence de séquence. Dans le brin C, il n'y a pas de base A. La CID des radicaux fournit, en plus des pertes de base (G/A pour B et G/C pour C), des fragments correspondant à des pertes de z_1^\bullet et a_1^\bullet ainsi que des pertes de neutre, de CO et de H₂O. De plus, lorsque l'on compare la diminution du pic parent dans les deux cas, on constate que le radical fragmente plus efficacement.

En comparant ces résultats à ceux observés pour les simples brins (cf. figure 4.14), on observe une très forte diminution du nombre de fragments, on passe de quelques fragments pour le double brin à un séquençage complet pour le simple brin. En addition le double brin perd des fragments de simple brins (perte de z_1^\bullet et a_1^\bullet). Ces observations suggèrent que dans le double brin, des fragmentations se produisent mais que les fragments restent attachés par des liaisons hydrogènes.

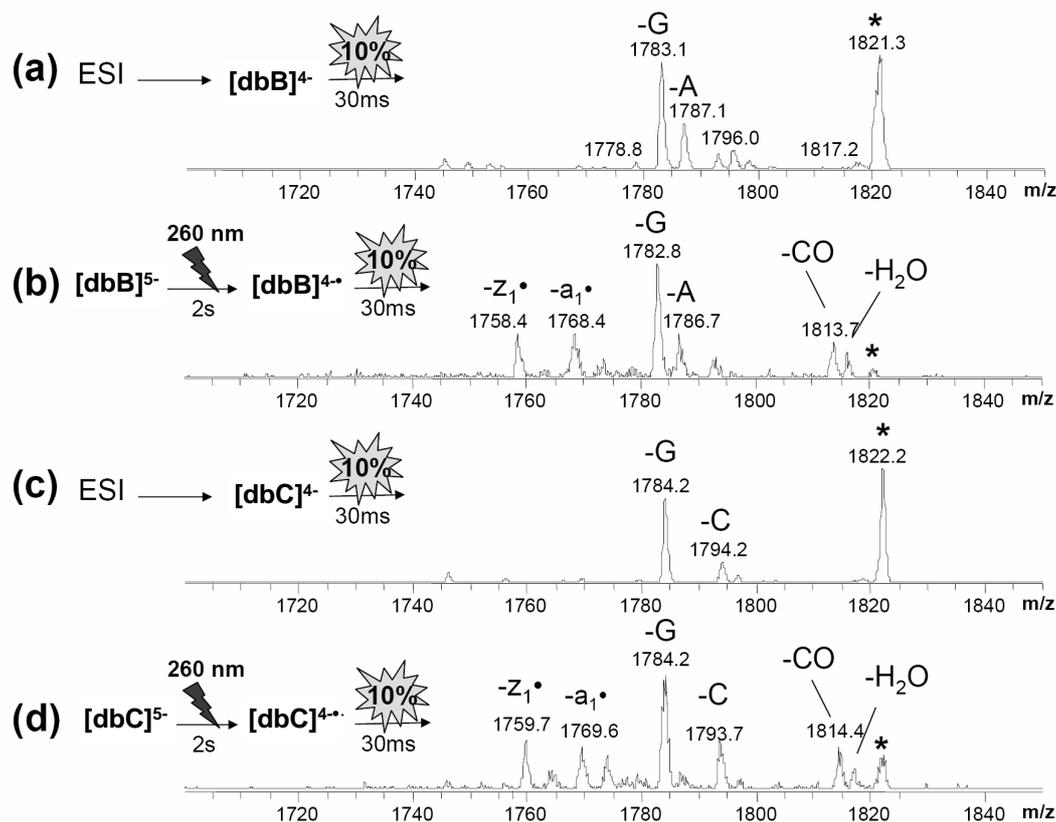


Figure 4.16 - Spectre CID de doubles brins d'ADN. a) CID sur le double brin $[dbB]^{4-}$ produit par électrospray, b) CID sur le double brin $[dbB]^{4-•}$ radicalaire produit par EPD à 260 nm. c) CID sur le double brin $[dbC]^{4-}$ produit par électrospray, d) CID sur le double brin $[dbC]^{4-•}$ radicalaire produit par EPD à 260 nm. Seule la partie représentative de la fragmentation est montrée. *, pic parent.

4.3.2 ADN et ligands non covalents

Les ligands présentés dans notre cas, sont des molécules qui se fixent de diverses manières sur l'ADN par des liaisons non covalentes. Certaines de ces molécules sont utilisées en médecine comme traitement chimiothérapeutique, en se fixant à l'ADN ou bien en biochimie comme marqueur de séquence spécifique sur des brins d'ADN.

Il existe divers types de ligands qui se fixent sur l'ADN. Les ligands du sillon qui viennent se fixer entre deux brins d'une double hélice (cf. figure 4.17 a)), et les ligands intercalants qui se glissent entre deux couches de base d'une hélice (cf. figure 4.17 b)). Les systèmes ADN-ligand se forment naturellement en solution et par ionisation électrospray, ces complexes sont conservés en phase gazeuse.^[40]



Figure 4.17 - Deux types de ligands avec un positionnement spécifique à chacun. a) ligand du sillon, b) intercalent.

Les ligands que nous avons utilisés, présentent des spectres d'absorption et de fluorescence dans le visible ou le proche UV (cf. figure 4.19). Ces ligands sont présentés sur la figure 4.18, avec les spécifications de leurs propriétés optiques sur la table 4.19. Les longueurs d'onde d'absorption des ligands sont proches du visible, elles sont supérieures à 300 nm. Les brins d'ADN ont une absorption nulle dans le domaine d'absorption de ces ligands. Il est à noter que les ligands du sillon sont chargés positivement et que les liaisons entre le brin d'ADN et les ligands sont de type interaction ionique ou liaison hydrogène. Ces complexes formés d'un double brin avec un ou plusieurs ligands vont présenter des propriétés optiques autour de 260 nm (absorption de l'ADN) et dans la bande d'absorption du ligand (proche visible et visible, 350-550 nm).

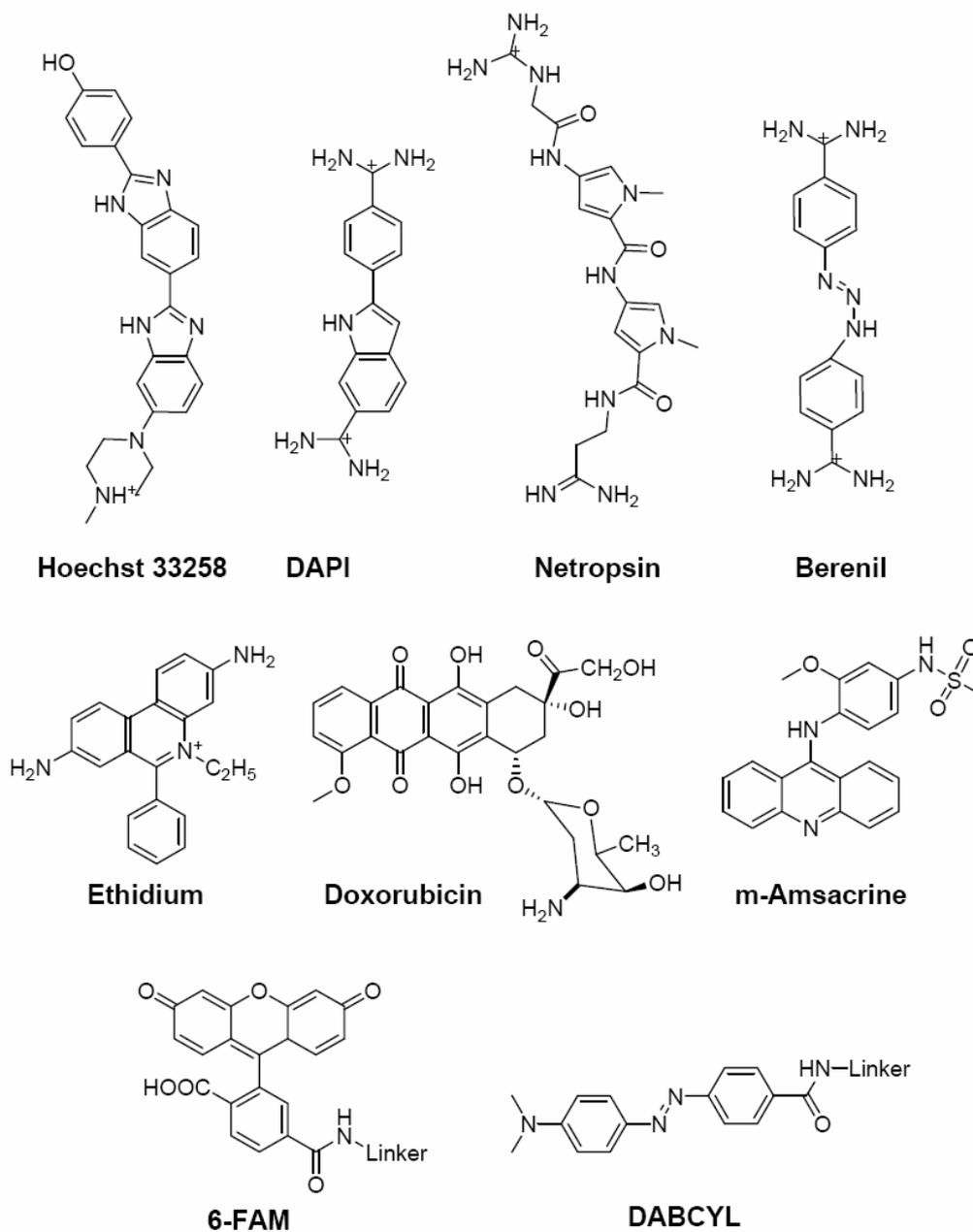


Figure 4.18 - Schéma de molécule. Les différents ligands utilisés, covalents et non covalents, ligands du sillon et intercalants.

Chromophore	mode de liaison	Absorption λ_{\max} (nm)		Propriétés de Fluorescence	
		Ligand seul	Ligand + ADN	Ligand seul	Ligand + ADN
Hoechst 33258	Non-covalent, ligand du sillon	337 nm (pH = 7) ^[41, 42]	349 nm ^[41] 360 nm ^[42] 355 nm ^[43]	508 nm, $\Phi = .015$ ^[41] 475 nm, $\Phi = .02$ (pH = 7; $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm) ^[42]	458 nm, $\Phi = .42$ ^[41] 485 nm, $\Phi = .3$ ($\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm) ^[42]
DAPI	Non-covalent, ligand du sillon	341 nm ^[41]	356 nm ^[41]	496 nm, $\Phi = .019$ ^[41]	455 nm, $\Phi = .34$ ^[41]
Netropsin	Non-covalent, ligand du sillon	296 nm [25]	320 nm [26]	non fluorescent	
Berenil	Non-covalent, ligand du sillon	370 nm ^[44]		non fluorescent	
Ethidium	Non-covalent, Intercalant	479 nm ^[41]	520 nm ^[41, 45]	632 nm, $\Phi = .039$ ^[41]	608 nm, $\Phi = .35$ ^[41]
Doxorubicin	Noncovalent, Intercalant	473 et 494 nm ^[46]		555 nm $\Phi=.05$ ^[46]	
m-Amsacrine	Noncovalent, Intercalation	434 nm in MeOH		not fluorescent	
DABCYL	Liaison covalente (3' terminal)	453 nm MeOH ^[47]	475 nm ^[48]	not fluorescent	
FAM	Liaison covalente (5' terminal)	490 nm ^[49]	494 nm ^[48]	517 nm ^[49] , ($\Phi = .9$)	

Figure 4.19 - Les ligands. Mode liaison et propriétés optiques.

La figure 4.20 montre le photodétachement pour le double brin B seul et avec différents ligands pour des états de charge 5-. Les longueurs d'onde qui ont été utilisées, sont choisies en fonction de la longueur d'onde au maximum d'absorption des ligands utilisés (cf. figure 4.19). Les spectres a) et c) présentent le dbB sans ligand aux longueurs d'onde 310 et 355 nm. On remarque qu'il n'y a presque pas de photodétachement comme attendu puisque les bases n'absorbent pas à ces longueurs d'ondes. On peut maintenant classer les propriétés de photodétachement des complexes en deux familles selon que le ligand soit fluorescent ou non.

Fluorescent. Sur les spectres d), e) et h) on observe le photodétachement pour les systèmes formés du dbB avec respectivement les ligands Hoechst 33258 à 355 nm, le DAPI à 355 nm, et le bromure d'éthidium à 550 nm, ces trois ligands fluorescents. Le photodétachement est efficace dans les trois cas et en comparant avec le spectre à 355 nm du double brin dbB seul, on montre que le photodétachement est induit par le ligand chromophore. Lorsque l'on attache deux ligands sur le même brin, comme le montrent les spectres f) pour $[\text{dbB}+2*\text{DAPI}]^{5-}$ et i) pour $[\text{dbB}+2*\text{Ethidium}]^{5-}$, on constate que l'efficacité de photodétachement augmente par rapport à un seul ligand (cf. spectres e), h), figure 4.17).

Non fluorescent. Les spectres b) et g) montrant le double brin B lié aux ligands berenil à 310 nm et netropsin 355 nm qui sont non fluorescents. On n'observe ni photodétachement, ni fragmentation dans les deux cas. Pourtant les longueurs d'onde utilisées correspondent au maximum d'absorption.

En résumé, lorsqu'un brin d'ADN en double hélice attaché à un ligand fluorescent est excité à la longueur d'onde du ligand, il y a photodétachement. Lorsque le ligand n'est pas fluorescent il n'y a pas de photodétachement. On peut donc penser que l'efficacité de photodétachement est reliée à la durée de vie dans l'état excité du ligand.

Compte tenu de la faible énergie des photons à 355 nm (3.49 eV) et 550 nm (2.25 eV) impliqués dans ces processus, comparativement au processus à 260 nm (4.77 eV), il est important de savoir si le processus est mono ou multi photonique. Sur la figure 4.21, est reportée l'efficacité de photodétachement en fonction de la puissance laser, à différents nombres de pulses laser, pour le système $[\text{dbB}+\text{Ethidium}]^{5-}$ (cf. figure 4.20 h)). Dans ce cas, le photodétachement est réalisé à 500 nm car un peu plus efficace. On observe une dépendance non linéaire notamment, un seuil de photodétachement autour de 10 mJ. On peut

alors conclure que le processus de photodétachement implique plusieurs photons contrairement au processus à 260 nm observé précédemment.

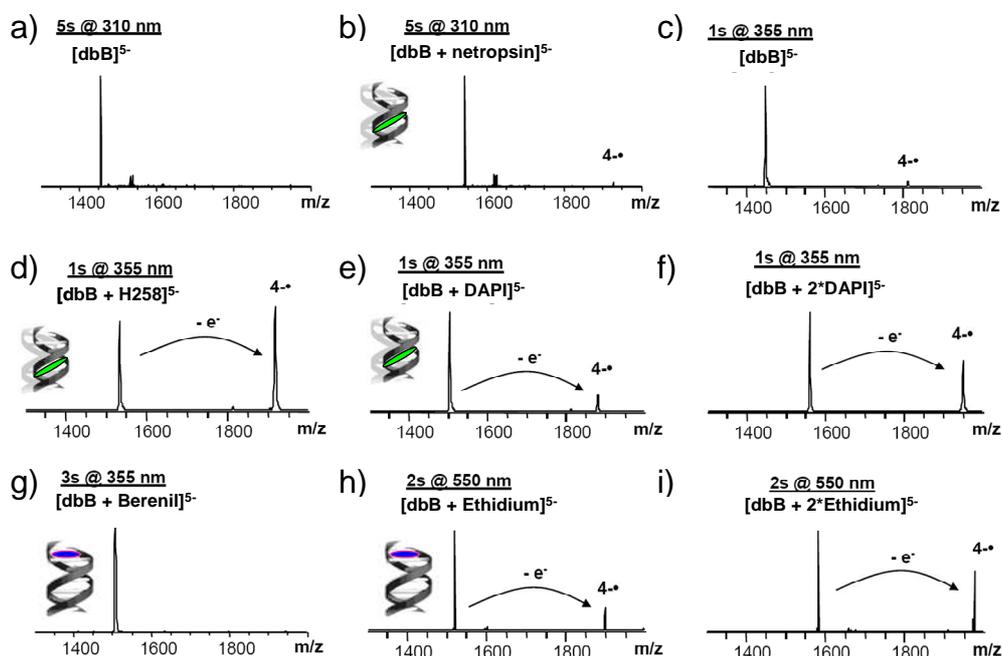


Figure 4.20 - Spectres de doubles brins d'ADN avec un ligand.

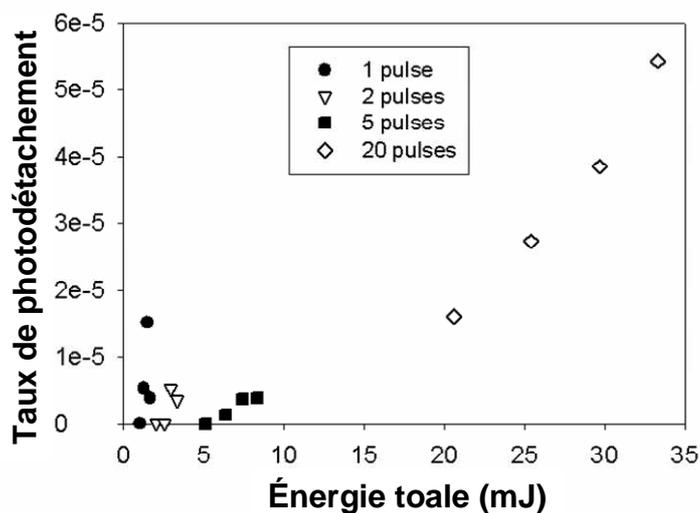


Figure 4.21 - Taux de photodétachement du [dbB+Ethidium]⁵⁻ à 500 nm en fonction de l'énergie laser totale.

On propose des mécanismes sur la figure 4.22 prenant en compte deux photons. Suite au premier photon, le ligand absorbe et passe dans un état excité. Dans le cas de l'éthidium qui est fluorescent, la durée de vie de l'état excité (noté F^*) est suffisamment longue (plusieurs nanosecondes) pour absorber un deuxième photon. Ce deuxième photon permet d'atteindre un état qui couple un état électronique auto ionisant de l'ADN et conduit au photodétachement. Ce mécanisme est représenté sur la figure 4.22. Pour le cas d'un ligand non fluorescent comme la netropsine, la durée de vie de l'état (noté NF^*) n'est pas suffisamment longue, il y a inhibition d'une seconde absorption via une conversion interne et d'IVR (cf. figure 4.22 b). Dans ce cas, le parent accumule l'énergie vibrationnelle.

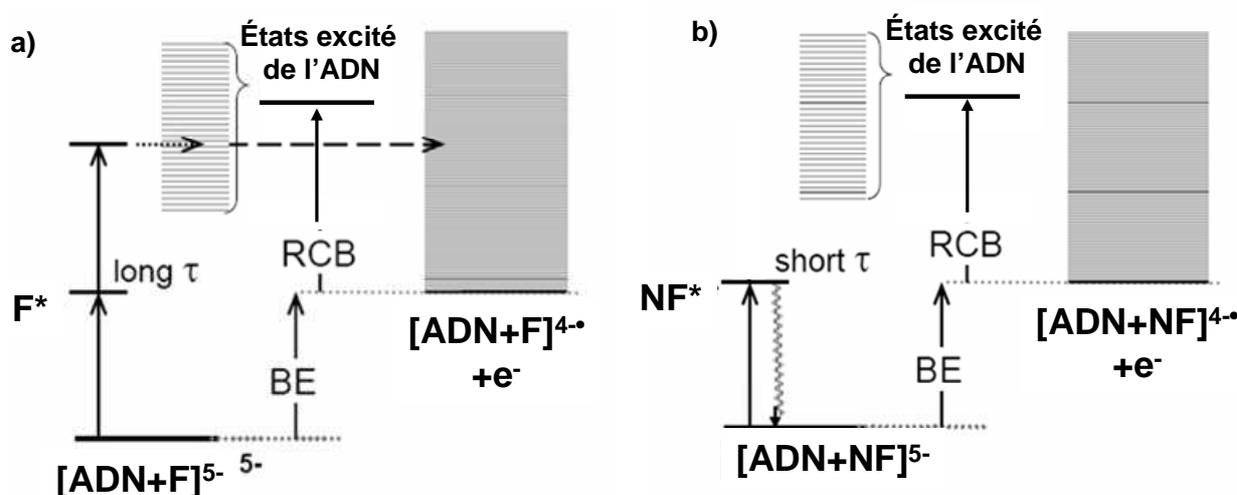


Figure 4.22 - Mécanisme de photodétachement à deux photons pour les complexes ADN-ligand. a) cas du ligand fluorescent, F^* correspond à l'état excité du ligand. b) cas du ligand non fluorescent, NF^* correspondant à l'état excité du ligand.

4.3.3 ADN et ligands covalents

Dans cette dernière partie sur l'ADN, il va être question de ligand covalent qui se fixe sur l'extrémité du brin d'ADN.

Les propriétés de fluorescence de certains chromophores sont utilisées en phase liquide pour la déterminer le positionnement de brins d'ADN entre eux, c'est le FRET (*Föster Resonance Energy Transfert*). Cette technique est de plus en plus utilisée en phase gazeuse (voir Park et al^[71]). Le principe est de disposer un chromophore fluorescent au bout d'un brin. Du même côté de la double hélice, sur l'autre brin, on dispose un chromophore qui absorbe à la longueur d'onde du chromophore fluorescent mais qui ne fluoresce pas (quencher). Lorsque

le chromophore quencher est proche du chromophore fluorescent, on n'observe aucune fluorescence. Un transfert d'énergie de la molécule fluorescente vers le quencher bloque la fluorescence. Lorsque qu'ils sont suffisamment éloignés on observe de la fluorescence. On peut ainsi observer le détachement partiel des deux brins (cf. figure 4.23).

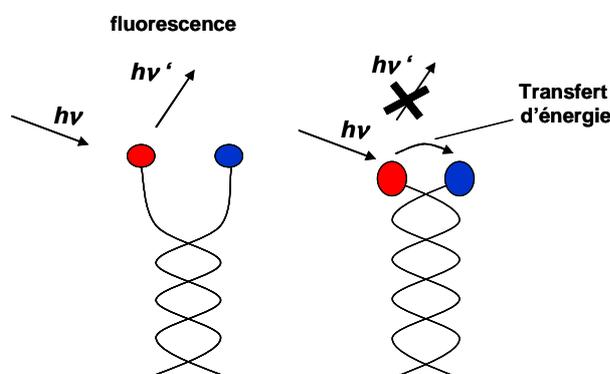


Figure 4.23 - Schéma du mécanisme du FRET sur un brin d'ADN.

Dans notre cas, nous avons réalisé une expérience similaire mais avec une autre observable, car nous n'avons pas accès à la fluorescence. Sur la figure 4.24, on observe deux séries d'expériences similaires. On prend un simple brin qui se replie en *hair pin*. Spectre a), le brin replié ne photodétache pas à 490 nm, puis spectre b), on fixe un chromophore fluorescent FAM qui se fixe au bout du brin et absorbe à 490 nm. On observe alors un très faible photodétachement. Spectre c), on fixe sur le brin le ligand intercalant m-amsacrine qui n'a aucun effet sur le photodétachement à 490 nm. Lorsque l'on attache le ligand et le chromophore fluorescent en même temps il n'y a aucun effet, un léger photodétachement, spectre d).

Sur les spectres e), f) g) h), on refait la même chose avec le même brin *hair pin*, le même ligand et un autre chromophore non fluorescent qui est efficace à 450 nm. Lorsque le ligand et le chromophore sont sur le double brin, on observe un peu de photodétachement et surtout la perte du ligand.

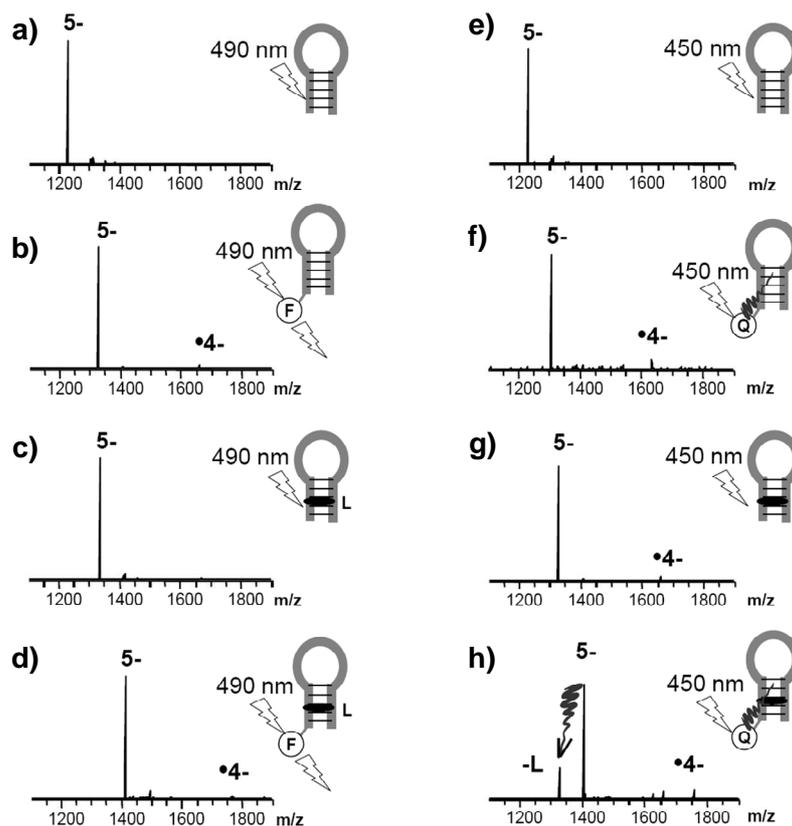


Figure 4.24 - Spectres de photodétachement pour le brin E avec une irradiation de 4 s. le brin E se replie en « hair pin ». Les spectres de a) à d) sont irradié à 490 nm. a) brin hair pin seul, b) hair pin avec le chromophore FAM, c) hair pin avec l'intécalent m-amsacrine et d) hair pin avec FAM et m-amsacrine. Les spectres de e) à h) sont irradié à 450 nm. e) brin hair pin seul, f) hair pin avec le chromophore DABCYL, g) hair pin avec m-amsacrine et h) hair pin avec DABCYL et m-amsacrine.

L'interprétation est la suivante : dans le cas fluorescent (FAM, spectre d)), l'énergie reste localisée sur le chromophore et est réémise directement, on observe ni photodétachement ni fragmentation. Dans le cas non fluorescent (DABCYL), l'énergie est convertie sous forme vibrationnelle et peut se coupler au brin d'ADN, permettant le détachement du ligand. Ce modèle très simplifié ne prend pas en compte une éventuelle hybridation des états électroniques des bases avec l'éthidium.

L'étape suivante est de lier 2 chromophores à l'ADN : d'un coté, un donneur ; de l'autre, un accepteur. Le but est de réaliser des expériences de FRET en observant le détachement d'un messenger comme l'amsacrine. Ce type d'expérience a déjà été réalisé en infrarouge.^[50, 51]

4.4 EPD sur les peptides

Le positionnement et les transferts des charges dans les peptides jouent un rôle fondamental dans les processus biologiques. L'étude dans les anions des transferts de charge et de leurs fragmentations peut aussi permettre une étude structurale de ces molécules.^[52-54] Dans cette partie, nous allons aborder le photodétachement de dianions induis par laser appliqué à des peptides.

Jusqu'à maintenant, nous nous sommes focalisés sur les peptides chargés positivement, car la protonation par electrospray est particulièrement adaptée au caractère basique de nombreux peptides et la fragmentation de cations par CID et ECD est très efficace. Cependant, la présence de sites acides sur les peptides, comme par exemple le COOH terminal ou encore les acides aminés possédant un groupe fonctionnel acide carboxylique permettent de créer des anions par electrospray. La fragmentation par CID des anions est peu efficace et génère de nombreuses pertes de neutres difficiles à interpréter, mais de nouvelles techniques, comme EDD^[55, 56] ou ETD^[57], ont permis de simplifier la fragmentation des anions.

4.4.1 Spectre de photodétachement

Les solutions utilisées sont réalisées de la même manière que précédemment. Les peptides sous forme de poudre provenant de Sigma Aldrich sont dissoutes à une concentration d'environ 100 μM dans un mélange eau/méthanol à 50/50, v/v. Par contre, nous n'avons pas ajouté d'acide car pour le fonctionnement en mode négatif, la solution doit être neutre voire basique pour favoriser la déprotonation. Les sites de déprotonation privilégiés sur un peptide sont la fonction carboxylique terminal (COOH du C-terminal), ou bien, les acides aminés, comme l'acide aspartique (D, Asp) et l'acide glutamique (E, Glu) qui possèdent une fonction COOH sur leur chaîne latérale.

Spectre de photodétachement. La figure 4.25 montre le spectre de photodissociation à 260 nm pendant 2s d'irradiation de l'angiotensine I de séquence (DRVYIHPFHL) en mode négatif. L'espèce parent est l'angiotensine I deux fois déprotonées $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$. Tous les fragments observés sont mono chargés, le fragment le plus intense est la perte de COO^- (-44), le moins intense est le fragment $[\text{M}-2\text{H}]^{\bullet-}$ correspondant au photodétachement avec production d'un anion radicalaire. On observe aussi une série de fragments de x_n , y_n et $a_n^{\bullet-}$ qui

correspondent à la rupture de la chaîne principale et plus particulièrement, à la rupture de la liaison C $_{\alpha}$ -C.

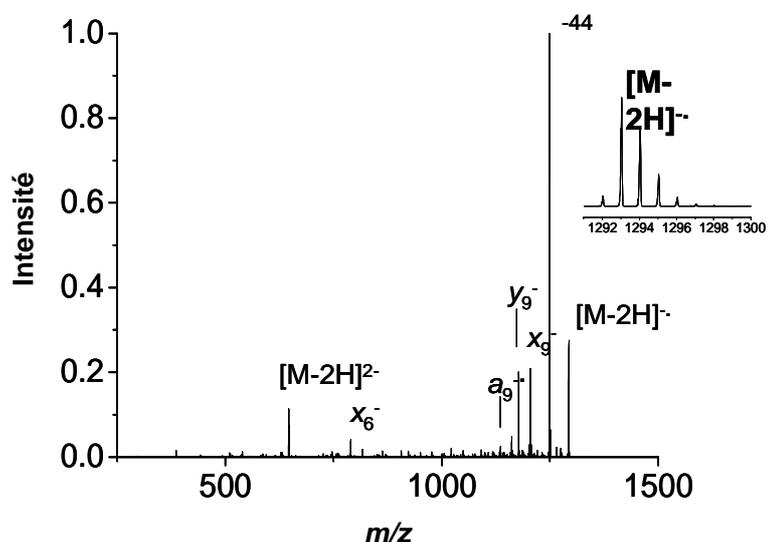
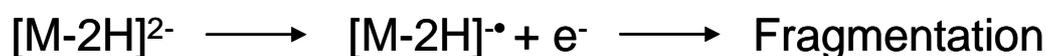


Figure 4.25 - Spectre de photodissociation de l'angiotensine I (DRVYIHPFHL) dans l'état de charge 2- $[M-2H]^{2-}$ à 260 nm pendant 2 s.

Pour déterminer si le processus de fragmentation ou de photodétachement est multiphotonique ou non, on mesure le taux de fragmentation et le taux de photodétachement à différentes puissances laser comme nous l'avons déjà réalisé pour les simples brins d'ADN. On peut trouver ces résultats sur la figure 4.26. On conclut que le processus de photodétachement est mono photonique (dépendance linéaire du photodétachement en fonction de la puissance) alors que la fragmentation des liaisons C $_{\alpha}$ -C et la perte de COO semble multi photonique. On interprète ce résultat par le schéma suivant :



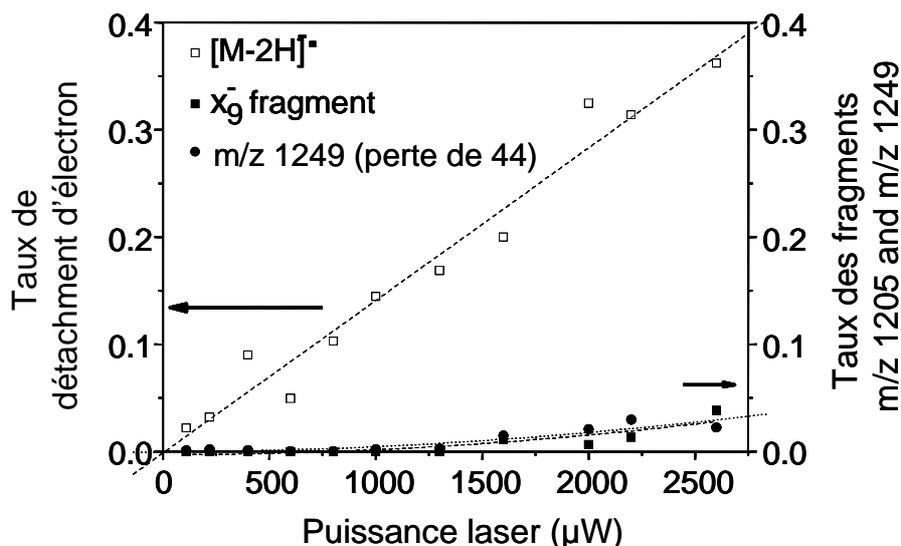


Figure 4.26 - Taux de détachement d'électron et taux des fragments (-44) et x_9^- , en fonction de la puissance laser, pour l'angiotensine à 260 nm pendant 2s d'irradiation. Courbe d'ajustement linéaire et quadratique.

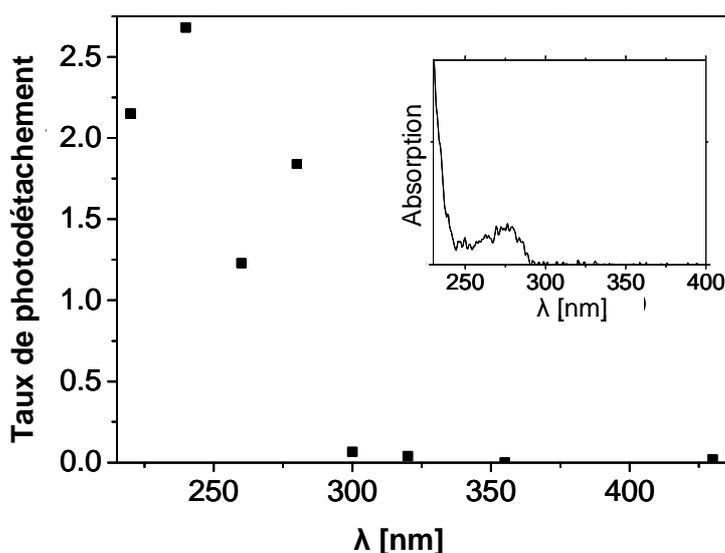


Figure 4.27 - Spectre optique de photodétachement pour l'angiotensine I chargé 2-. En encart, le spectre en solution de la solution utilisée dans l'electrospray.

Le spectre de photodétachement en fonction de la longueur d'onde est présenté sur la figure 4.27. On peut noter une forte corrélation entre l'absorption en solution et l'efficacité de détachement. En particulier aucun photodétachement n'est observé au-dessus de 300 nm. La bande d'absorption en solution du peptide (cf. encart de figure 4.27) correspond à la transition $\pi\pi^*$ des cycles aromatiques des acides aminés.

Ces résultats nous suggèrent que le photodétachement est un processus à deux étapes similaire à celui proposé pour l'ADN. (i) Excitation électronique des cycles aromatiques. (ii) croisement d'un état auto ionisant qui conduit à la perte de l'électron.

L'absorption du photon est assurée par les cycles aromatiques des acides aminés tryptophane, tyrosine et phénylalanine par absorption d'un photon de 4.77 eV (à 260 nm) conduisant à une transition $\pi\pi^*$. Dans notre cas, seule la tyrosine est impliquée, les calculs effectués sur ce modèle ont été réalisés pour l'angiotensine II. Les résultats expérimentaux pour l'angiotensine II sont similaires à ceux obtenus pour l'angiotensine I. Les charges négatives sont portées par les carboxylates, dont l'énergie de photodétachement pour le groupe carboxylates est d'environ 3.47 eV en s'appuyant sur les observations de Wang en PES.^[33] Dans le cas d'un dianion, on peut utiliser la formule (1.2) $BE_{\text{peptide}} = BE_{\text{COO}^-} - e^2/R$ où R est la distance entre les deux charges. On obtient une barrière de potentiel coulombien (e^2/R) d'environ 0.95 eV, on estime alors que l'énergie de détachement pour le peptide considéré est de l'ordre de 2.52 eV. Ces résultats sont reportés sur la figure 4.28. Le mécanisme proposé est le suivant : l'excitation photonique permet d'atteindre un état excité supérieur à la barrière de potentiel coulombien. Il y a ensuite croisement avec un état auto ionisant sur la coordonnée réactionnelle du carboxylate en passant au dessus de la barrière coulombienne. Le détachement d'électron dans le cas d'un peptide sera plus direct (pas de passage à travers la RCB) que dans le cas de l'ADN.

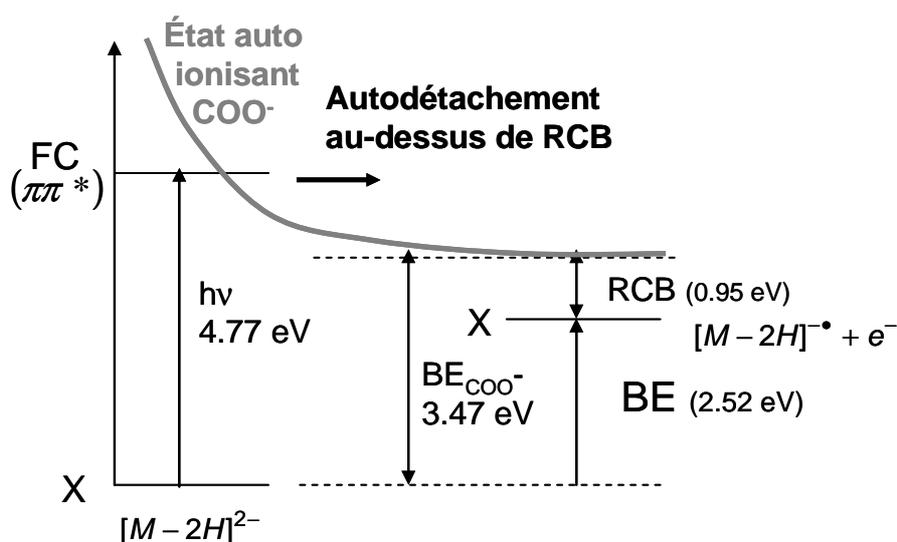


Figure 4.28 - Mécanisme de photodétachement dans le cas d'un peptide dianion. X représente l'état fondamental pour $[M-2H]^{2-}$ et $[M-2H]^{\bullet-}$. FC correspond à l'état électronique atteint par un recouvrement de type Franck Codon, cette transition est la transition $\pi\pi^*$.

Notons que ces mécanismes sont ici plus simples à interpréter que dans le cas de l'ADN. On connaît la nature exacte de l'état électronique atteint par le photon, les excitations électroniques restent localisés sur le chromophore, et on sait d'où part l'électron. De plus, le détachement ne nécessite pas le passage à travers une barrière.

Fragmentation du radical. La figure 4.29 présente la fragmentation par CID du radical anion obtenu par photodétachement d'un électron et de l'anion non radicalaire obtenu directement en sortie de source electrospray. Sur le spectre a) de CID du radical, les pertes de neutre -18 et -44 sont dominantes. On observe aussi de nombreuses ruptures de la liaison C α -C dans la chaîne principale, a $_n^{\bullet}$, x $_n$. Plusieurs de ces fragments sont observés en photodissociation directe (cf. figure 4.25). Les fragments observés pour le radical (rupture de la chaîne principale, x $^-$ et a $^{\bullet}$) sont similaires à ceux que l'on retrouve lors de la fragmentation en EDD ou en ETD.^[56-58] Comme nous l'avons déjà constaté dans l'ADN, la dissociation de radicaux est similaire quelque soit la méthode de production utilisée pour leur création.

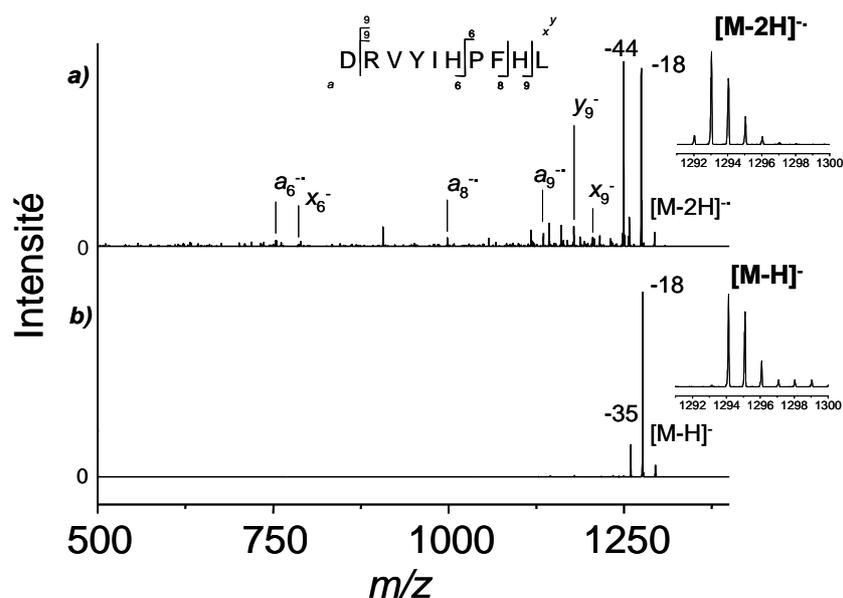


Figure 4.29 - Spectre de CID de l'angiotensine I. a) CID sur $[M-2H]^{\bullet}$, radical anion de charge (1-) produit par EPD. b) CID sur $[M-H]^-$, anion produit directement à partir de l'electrospray.

Des résultats similaires obtenus sur peptide phosphorylé (peptide similaire à celui présenté dans le chapitre II) montre que l'utilisation du radical permet d'augmenter la fragmentation par CID, et stabilise le phosphate.^[57] De plus, la multiplicité des fragments obtenus est en faveur de l'hypothèse apportée en ECD qui suppose que le radical est mobile.^[59, 60]

Des expériences en ETD^[57] et EDD^[56] ont montré des schémas de fragmentation très similaires à ceux observés dans nos cas, directement après irradiation laser, ou après CID sur le radical. En EDD, le radical est produit par un faisceau d'électron à des énergies > 10 eV. En ETD, le radical est créé par réaction entre l'anion à étudier et un cation Xe⁺. Dans les deux cas, les auteurs observent la formation d'un radical par détachement d'électron, des pertes de neutre dominées par la perte 44 à partir du radical et des ruptures de la chaîne principale sur les liaisons C_α-C. Les deux auteurs s'accordent sur un mécanisme similaire présenté sur la figure 4.30. Selon Hunt *et al.*, le radical serait porté par le COO[•]. Le mécanisme implique l'attaque du radical sur un N de la chaîne principale. Ensuite, par transfert de charge, la rupture de la liaison C_α-C se produit (cf. figure 4.30). De plus, la position du radical sur le COO[•] permet d'expliquer la perte de COO (cf. figure 4.30). Ces observations nous suggèrent fortement que le radical soit porté par le COO[•], et que le détachement d'électron s'effectue sur le COO⁻.

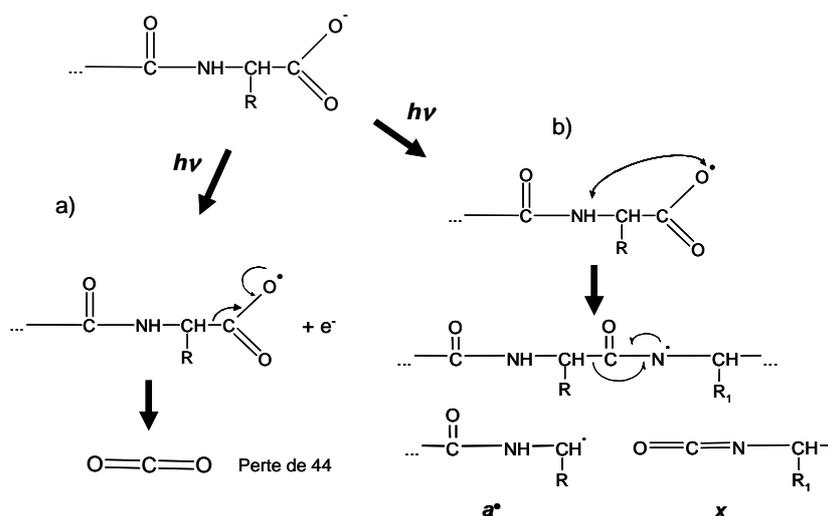


Figure 4.30 - Schéma du mécanisme de formation du radical par photodétachement. a) perte de COO. b) rupture de la chaîne principale sur la liaison C_α-C.

De récents résultats obtenus dans notre groupe par Laure Joly (dans le cadre d'un travail de thèse) montre que le spectre optique de photodétachement est une nouvelle sonde optique pour les peptides et les protéines. Des résultats prometteurs présente le spectre optique comme une éventuelle signature de la localisation de la charge.^[61]

Bibliographie

- [1] N. Dumaz, H. J. vanKranen, A. deVries, R. J. W. Berg, P. W. Wester, C. F. vanKreijl, A. Sarasin, L. DayaGrosjean, F. R. deGruijl, The role of UV-B light in skin carcinogenesis through the analysis of p53 mutations in squamous cell carcinomas of hairless mice, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 897.
- [2] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Hattig, Tautomeric selectivity of the excited-state lifetime of guanine/cytosine base pairs: The role of electron-driven proton-transfer processes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 17903.
- [3] T. Schultz, E. Samoylova, W. Radloff, I. V. Hertel, A. L. Sobolewski, W. Domcke, Efficient deactivation of a model base pair via excited-state hydrogen transfer, *Science* **2004**, *306*, 1765.
- [4] H. Satzger, D. Townsend, M. Z. Zgierski, S. Patchkovskii, S. Ullrich, A. Stolow, Primary processes underlying the photostability of isolated DNA bases: Adenine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 10196.
- [5] J. M. Weber, I. N. Ioffe, K. M. Berndt, D. Loffler, J. Friedrich, O. T. Ehrler, A. S. Danell, J. H. Parks, M. M. Kappes, Photoelectron spectroscopy of isolated multiply negatively charged oligonucleotides, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8585.
- [6] X. Yang, X. B. Wang, E. R. Vorpagel, L. S. Wang, Direct experimental observation of the low ionization potentials of guanine in free oligonucleotides by using photoelectron spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 17588.
- [7] A. S. Danell, J. H. Parks, Fraying and electron autodetachment dynamics of trapped gas phase oligonucleotides, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *14*, 1330.

- [8] E. Emanuele, D. Markovitsi, P. Millie, K. Zakrzewska, UV spectra and excitation delocalization in DNA: Influence of the spectral width, *Chemphyschem* **2005**, *6*, 1387.
- [9] F. Santoro, V. Barone, R. Improta, Influence of base stacking on excited-state behavior of polyadenine in water, based on time-dependent density functional calculations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 9931.
- [10] B. Bouvier, T. Gustavsson, D. Markovitsi, P. Millie, Dipolar coupling between electronic transitions of the DNA bases and its relevance to exciton states in double helices, *Chemical Physics* **2002**, *275*, 75.
- [11] S. D. Wetmore, R. J. Boyd, L. A. Eriksson, Electron affinities and ionization potentials of nucleotide bases, *Chemical Physics Letters* **2000**, *322*, 129.
- [12] E. Emanuele, K. Zakrzewska, D. Markovitsi, R. Lavery, P. Millie, Exciton states of dynamic DNA double helices: Alternating dCdG sequences, *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 16109.
- [13] B. Bouvier, J. P. Dognon, R. Lavery, D. Markovitsi, P. Millie, D. Onidas, K. Zakrzewska, Influence of conformational dynamics on the exciton states of DNA oligomers, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 13512.
- [14] J. D. Watson, F. H. C. Crick, Molecular structure of nucleic acids - A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [15] S. A. McLuckey, J. L. Stephenson, Ion ion chemistry of high-mass multiply charged ions, *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17*, 369.
- [16] P. D. Schnier, J. S. Klassen, E. F. Strittmatter, E. R. Williams, Activation Energies for Dissociation of Double Strand Oligonucleotide Anions: Evidence for Watson-Crick Base Pairing in Vacuo, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9605.
- [17] V. Gabelica, E. De Pauw, Collision-induced dissociation of 16-mer DNA duplexes with various sequences: evidence for conservation of the double helix conformation in the gas phase, *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *219*, 151.
- [18] D. Markovitsi, D. Onidas, T. Gustavsson, F. Talbot, E. Lazzarotto, Collective behavior of Franck-Condon excited states and energy transfer in DNA double helices, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 17130.
- [19] W. M. Kwok, C. S. Ma, D. L. Phillips, Femtosecond time- and wavelength-resolved fluorescence and absorption spectroscopic study of the excited states of adenosine and an adenine oligomer, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 11894.

- [20] F. O. Talbot, T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, Photodissociation spectroscopy of trapped protonated tryptophan, *Journal of Chemical Physics* **2005**, *122*.
- [21] D. Markovitsi, T. Gustavsson, A. Sharonov, Cooperative effects in the photophysical properties of self-associated triguanosine diphosphates, *Photochemistry and Photobiology* **2004**, *79*, 526.
- [22] NIST, ref(<http://webbook.nist.gov/chemistry/>).
- [23] J. Wu, S. A. McLuckey, Gas-phase fragmentation of oligonucleotide ions, *International Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *237*, 197.
- [24] V. Gabelica, F. Rosu, T. Tabarin, C. Kinet, R. Antoine, M. Broyer, E. De Pauw, P. Dugourd, Base-dependent electron photodetachment from negatively charged DNA strands upon 260-nm laser irradiation, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 4706.
- [25] S. Marguet, D. Markovitsi, F. Talbot, One- and two-photon ionization of DNA single and double helices studied by laser flash photolysis at 266 nm, *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 11037.
- [26] G. D. Fasman, H. A. Sober, *Handbook of biochemistry data, miscellaneous*, CRC press, Cleveland, **1976**.
- [27] J. M. L. Pecourt, J. Peon, B. Kohler, DNA excited-state dynamics: Ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 10370.
- [28] D. Markovitsi, T. Gustavsson, F. Talbot, Excited states and energy transfer among DNA bases in double helices, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2007**, *6*, 717.
- [29] J. P. Lewis, T. E. Cheatham, E. B. Starikov, H. Wang, O. F. Sankey, Dynamically amorphous character of electronic states in poly(dA)-poly(dT) DNA, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 2581.
- [30] M. Rubio, D. Roca-Sanjuan, M. Merchan, L. Serrano-Andres, Determination of the lowest-energy oxidation site in nucleotides: 2'-Deoxythymidine 5'-monophosphate anion, *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 10234.
- [31] D. Onidas, D. Markovitsi, S. Marguet, A. Sharonov, T. Gustavsson, Fluorescence properties of DNA nucleosides and nucleotides: A refined steady-state and femtosecond investigation, *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 11367.

- [32] A. Abo-Riziq, L. Grace, E. Nir, M. Kabelac, P. Hobza, M. S. de Vries, Photochemical selectivity in guanine-cytosine base-pair structures, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 20.
- [33] X. B. Wang, C. F. Ding, L. S. Wang, Electron tunneling through the repulsive Coulomb barrier in photodetachment of multiply charged anions, *Chemical Physics Letters* **1999**, *307*, 391.
- [34] X. B. Wang, E. R. Vorpagel, X. Yang, L. S. Wang, Experimental and theoretical investigations of the stability, energetics, and structures, of H₂PO₄⁻, H₂P₂O₇²⁻, and H₃P₃O₁₀³⁻ in the gas phase, *Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 10468.
- [35] B. Giese, Electron transfer in DNA, *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 612.
- [36] W. J. Herron, D. E. Goeringer, S. A. McLuckey, Gas-Phase Electron-Transfer Reactions from Multiply-Charged Anions to Rare-Gas Cations, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 11555.
- [37] J. Wu, S. A. McLuckey, Ion/ion reactions of multiply charged nucleic acid anions: electron transfer, proton transfer, and ion attachment, *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *228*, 577.
- [38] B. Liu, P. Hvelplund, S. B. Nielsen, S. Tomita, Electron loss and dissociation in high energy collisions between multiply charged oligonucleotide anions and noble gases, *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *230*, 19.
- [39] J. Rozenski, J. A. McCloskey, SOS: A simple interactive program for ab initio oligonucleotide sequencing by mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13*, 200.
- [40] V. Gabelica, E. De Pauw, Comparison of the collision-induced dissociation of duplex DNA at different collision regimes: Evidence for a multistep dissociation mechanism, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13*, 91.
- [41] G. Cosa, K. S. Focsaneanu, J. R. N. McLean, J. P. McNamee, J. C. Scaiano, Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution, *Photochemistry and Photobiology* **2001**, *73*, 585.
- [42] H. Gorner, Direct and sensitized photoprocesses of bis-benzimidazole dyes and the effects of surfactants and DNA, *Photochemistry and Photobiology* **2001**, *73*, 339.

- [43] A. Adhikary, V. Buschmann, C. Muller, M. Sauer, Ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopic study of the binding modes of the bis-benzimidazole derivative Hoechst 33258 with DNA, *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*, 2178.
- [44] D. S. Pilch, M. A. Kirolos, X. Y. Liu, G. E. Plum, K. J. Breslauer, Berenil 1,3-Bis(4'-Amidinophenyl)Triazene Binding to DNA Duplexes and to a Rna Duplex - Evidence for Both Intercalative and Minor-Groove Binding-Properties, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9962.
- [45] S. Doglia, A. Graslund, A. Ehrenberg, Binding of Ethidium-Bromide to Self-Complementary Deoxydinucleotides, *European Journal of Biochemistry* **1983**, *133*, 179.
- [46] T. Htun, A negative deviation from Stern-Volmer equation in fluorescence quenching, *Journal of Fluorescence* **2004**, *14*, 217.
- [47] <http://probes.invitrogen.com/handbook/>, The handbook - A guide to fluorescent probes and labelling technologies, **2006**.
- [48] S. A. E. Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*.
- [49] R. A. Velapoldi, H. H. Tonnesen, Corrected emission spectra and quantum yields for a series of fluorescent compounds in the visible spectral region, *Journal of Fluorescence* **2004**, *14*, 465.
- [50] M. Okumura, L. I. Yeh, J. D. Myers, Y. T. Lee, Infrared-Spectra of the Cluster Ions $H_7O_3^+ \cdot H_2$ and $H_9O_4^+ \cdot H_2$, *Journal of Chemical Physics* **1986**, *85*, 2328.
- [51] J. Oomens, N. Polfer, D. T. Moore, L. van der Meer, A. G. Marshall, J. R. Eyler, G. Meijer, G. von Helden, Charge-state resolved mid-infrared spectroscopy of a gas-phase protein, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7*, 1345.
- [52] R. B. Cody, B. S. Freiser, Electron-Impact Excitation of Ions from Organics - Alternative to Collision-Induced Dissociation, *Analytical Chemistry* **1979**, *51*, 547.
- [53] E. W. Schlag, R. D. Levine, Ionization, Charge Separation, Charge Recombination, and Electron-Transfer in Large Systems, *Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 10608.
- [54] F. Remacle, R. D. Levine, E. W. Schlag, R. Weinkauff, Electronic control of site selective reactivity: A model combining charge migration and dissociation, *Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 10149.

- [55] B. A. Budnik, K. F. Haselmann, R. A. Zubarev, Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon, *Chemical Physics Letters* **2001**, *342*, 299.
- [56] F. Kjeldsen, O. A. Silivra, I. A. Ivonin, K. F. Haselmann, M. Gorshkov, R. A. Zubarev, C-alpha-C backbone fragmentation dominates in electron detachment dissociation of gas-phase polypeptide polyanions, *Chemistry-a European Journal* **2005**, *11*, 1803.
- [57] J. J. Coon, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, J. E. P. Syka, Electron transfer dissociation of peptide anions, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 880.
- [58] I. Anusiewicz, M. Jasionowski, P. Skurski, J. Simons, Backbone and Side-Chain Cleavages in Electron Detachment Dissociation (EDD), *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 11332.
- [59] P. B. O'Connor, C. Lin, J. J. Cournoyer, J. L. Pittman, M. Belyayev, B. A. Budnik, Long-lived electron capture dissociation product ions experience radical migration via hydrogen abstraction, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 576.
- [60] N. Leymarie, C. E. Costello, P. B. O'Connor, Electron capture dissociation initiates a free radical reaction cascade, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8949.
- [61] L. Joly, R. Antoine, A.-R. Allouche, M. Broyer, J. Lemoine, P. Dugourd, Ultraviolet Spectroscopy of Peptide and Protein Polyanions in Vacuo: Signature of the Ionization State of Tyrosine, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**.

CONCLUSION

Le travail de cette thèse a eu pour but dans un premier temps de mettre au point un nouveau montage expérimental couplant un spectromètre de masse et un laser accordable en longueur d'onde. Dans un second temps nous avons réalisé des expériences de spectroscopie UV de photodissociation. L'enjeu étant d'obtenir des informations sur la structure et la conformation de molécules d'intérêt biologique à travers l'excitation électronique d'un chromophore. Les systèmes étudiés sont des peptides, des complexes tryptophane agrégat d'argent et des brins d'ADN.

De manière général cette thèse a montré l'efficacité de la plateforme expérimentale pour réaliser des expériences de photodissociation et l'intérêt que peuvent présenter les résultats obtenus autant sur le plan fondamental que analytique. Ces expériences ouvrent de larges perspectives dans l'étude des biomolécules en phase gazeuse.

L'absorption d'un photon UV par le chromophore d'une biomolécule peut être suivie par une redistribution vibrationnelle de l'énergie (IVR), par une émission de lumière ou par une dissociation directe dans l'état électronique excité. Une photodissociation spécifique peut alors apparaître, en particulier, nous avons observé la formation d'espèces radicalaires suite à la perte de H ou à la perte d'un chromophore. Cette fragmentation peut être contrôlée par la longueur d'onde de l'excitation. L'absorption, et la fragmentation qui fait intervenir des mécanismes de transfert de charge, sont sensibles à l'environnement du chromophore. L'un des enjeux de cette expérience pour les années avenir sera d'utiliser cette sensibilité pour caractériser la structure et la dynamique de protéines en phase gazeuse. Une autre perspective importante de ces résultats est l'utilisation des radicaux pour améliorer l'identification et le séquençage de protéines.

Lors de l'étude de systèmes complexes métal acide aminé, nous avons mis en évidence de forts couplages électroniques entre la partie métallique et la biomolécules expliquant

l'exaltation de l'absorption d'une biomolécule au voisinage d'un film ou d'une nanoparticule d'argent. L'excitation laser d'un complexe est suivie d'un transfert de charge amenant à une fragmentation dépendant de l'état électronique excité et de la structure du complexe. Une étude approfondie apporte des informations sur la structure. L'évolution de ce type d'expérience vers des systèmes protéines métal permettra d'utiliser l'agrégat d'argent comme chromophore pour exciter efficacement ce système de grande taille. La distance entre l'agrégat et les acides aminés aromatique et donc l'absorption et les transferts de charges pourront être contrôlées par la conformation de la protéine.

La réponse à l'excitation optique de brins d'ADN multi chargé négativement conduit principalement à un détachement d'électron. Ces investigations ont, en outre, révélé la place particulière que joue la guanine dans ce mécanisme de détachement. Le rôle exact de la barrière de répulsion coulombienne reste à étudier. Lors de l'excitation d'un ligand fixé sur un brin on observe également un détachement d'électron provenant à priori du brin d'ADN. Malgré la mauvaise compréhension de ce mécanisme, l'utilisation de ligands comme sonde optique est prometteuse en particulier pour réaliser des expériences similaires au FRET.

Dans l'ensemble, cette expérience a apporté de nouvelles méthodes d'analyse pour l'étude de système biologique. Pour devenir plus complet, le montage devra aller vers une détection de la fluorescence qui est une voie de désexcitation possible et pourrait se révéler très informative comme elle peut l'être en solution. Cet apport permettra une meilleure compréhension des mécanismes de désexcitation électroniques des biomolécules. D'autre part les nombreuses et diverses collaborations et publications réalisées au cours de cette thèse témoignent de la polyvalence et du réel potentiel de cette expérience.

Un article en cours de publication, ajouté en fin de manuscrit concernant une collaboration avec l'équipe PUBLI du LASIM présente une expérience de pompe sonde avec un laser femto sur une biomolécule. Peut être arrivera-t-on un jour à contrôler la conformation d'une protéine par du contrôle cohérent?

ANNEXE I

1.1 Electrospray

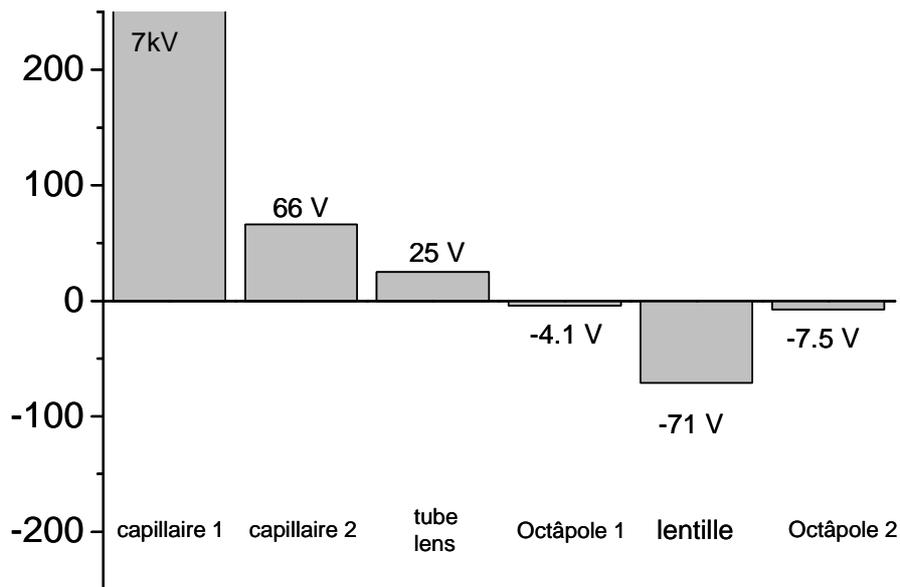


Figure 1.1 - Diagramme des tensions appliquées sur la ligne electrospray optique ionique. Solution de tryptophane argent eau/méthanol 50/50 avec 3% d'acide acétique.

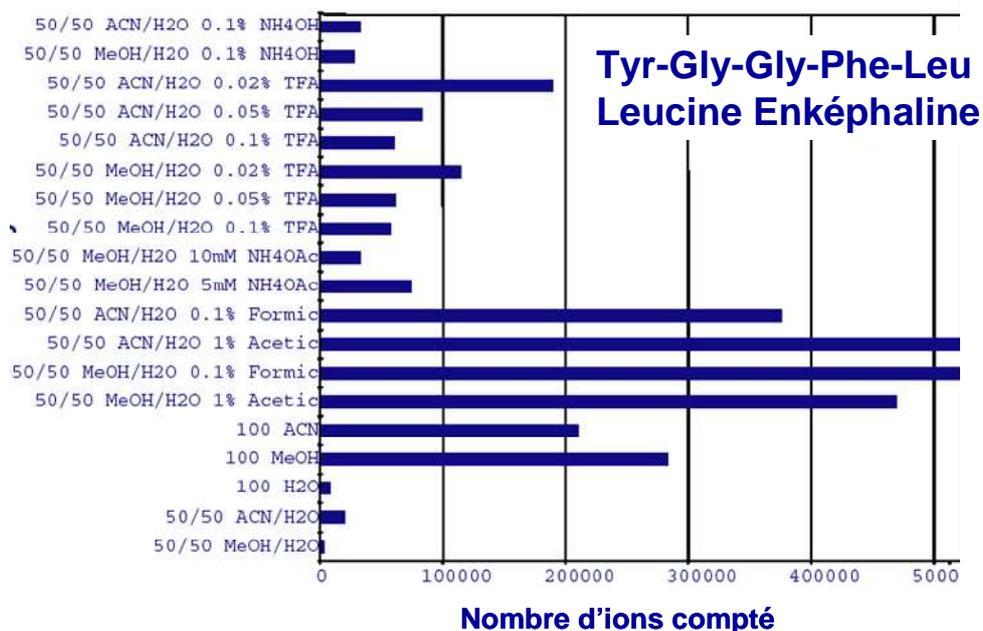
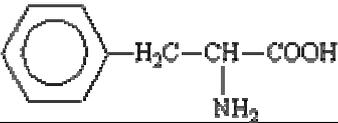
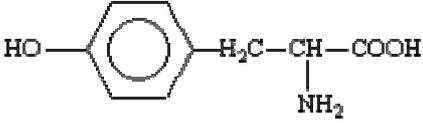
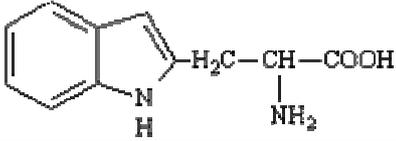
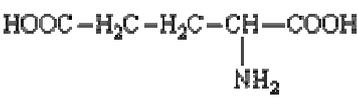
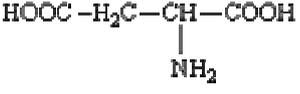


Figure 1.2 - Tableau de donnée sur l'influence des solvants. Fournit par thermo finnigan.

AAs aromatiques

Phenylalanine (Phe, F) 2.6 / 9.2*	
Tyrosine (Tyr, Y) 2.2 / 9.1*	
Tryptophane (Trp, W) 2.4 / 9.4*	

AAs acide

Acide Glutamique (Glu, E) 2.2 / 9.7 / 4.3*	
Acide Aspartique (Asn, D) 2.2 / 9.8 / 3.9	

*Les valeurs données sont :
Pka du COOH / Pka du NH2
/ Pka de la fonction lorsqu'il
existe

Figure 2.1 - Les 20 acides aminés. Sigle à trois lettre et à une lettre et valeurs de pKa des différents site acido-basique.

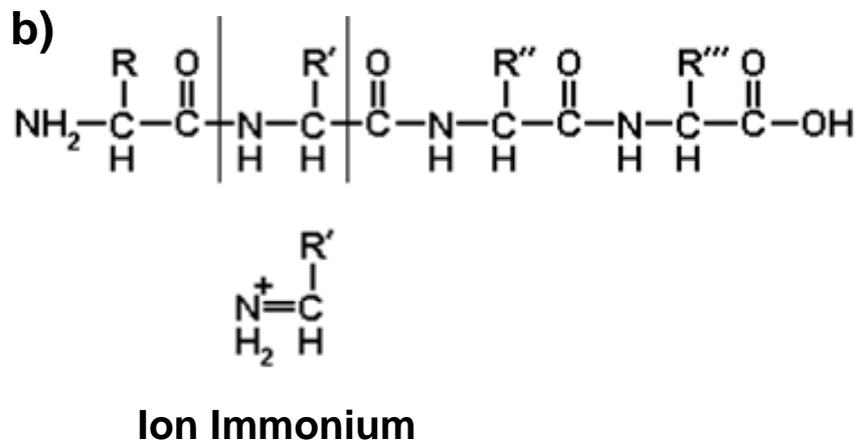
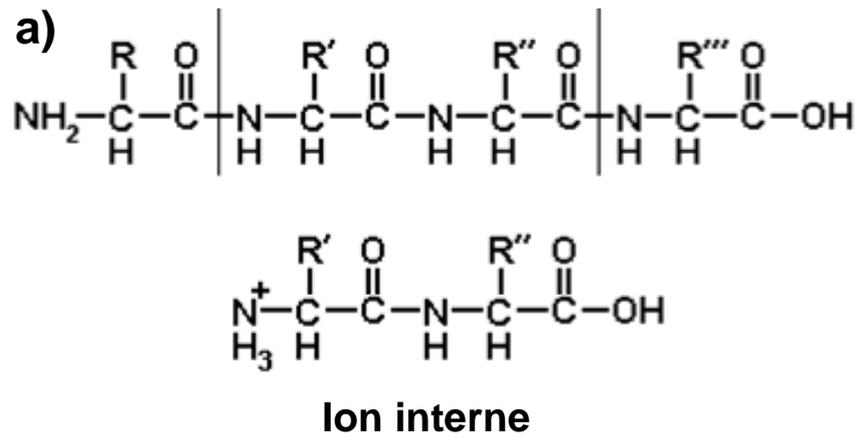


Figure 2.3 - Fragments issue d'une double rupture de la chaîne peptidique.

ANNEXE IV

4.1 Photodétachement d'ADN et de peptide

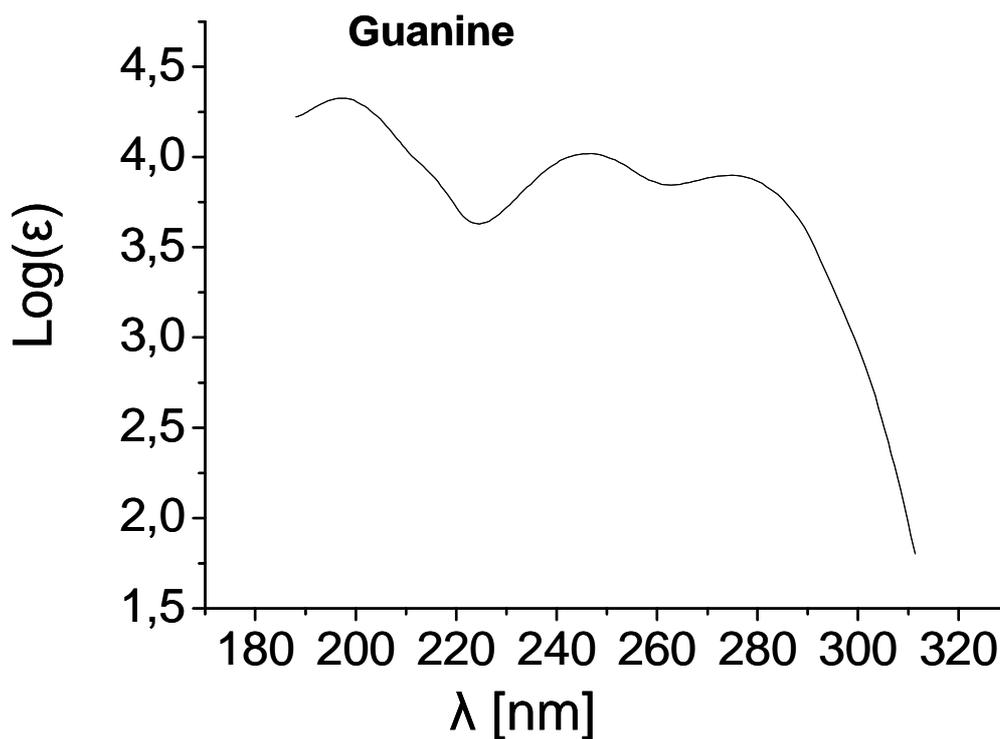


Figure 4.1 - *Spectre d'absorption en solution, eau à pH 7. Source NIST[ref(<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)]*.

	E (L mol ⁻¹ cm ⁻¹) @ 260 nm
dT ₆ ³⁻	49200
dC ₆ ³⁻	43400
dA ₆ ³⁻	75400
dGT ₅ ³⁻	52400
dG ₂ T ₄ ³⁻	54400
dG ₃ T ₃ ³⁻	56400
dG ₃ A ₃ ³⁻	69400
dG ₆ ³⁻	62400

Figure 4.2 - Extinction molaire à 260 nm pour différents simple brin d'ADN. *Hand Book de biochimie*^[1]

- [1] G. D. Fasman, H. A. Sober, *Handbook of biochemistry data, miscellaneous*, CRC press, Cleveland, 1976.

Femtosecond pump-probe experiments on trapped flavin: optical control of dissociation

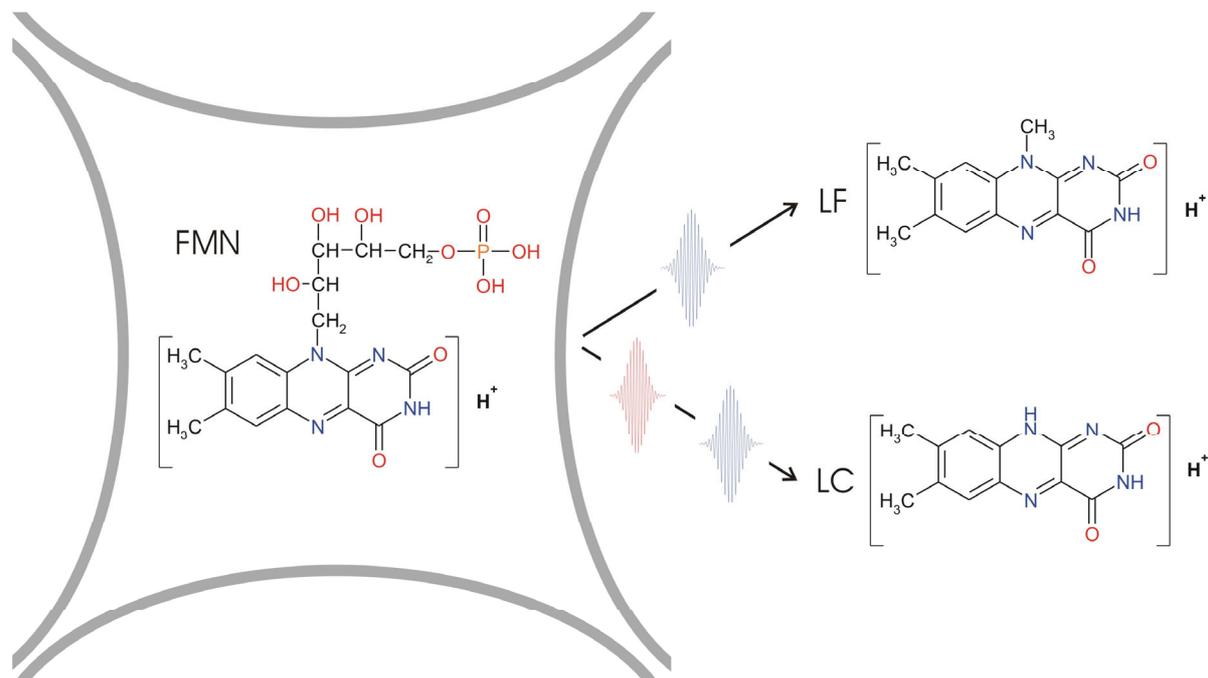
Laurent Guyon,^a Thibault Tabarin,^a Benoît Thuillier,^a Rodolphe Antoine,^a Michel Broyer,^a Véronique Boutou,^a Jean-Pierre Wolf^{a,b} and Philippe Dugourd^a

^a *Université de Lyon ; Université Lyon 1 ; CNRS, LASIM, 43 bd du 11 Novembre 1918, F69622 Villeurbanne Cedex, France. Fax: 33 4 72 43 15 07; Tel: 33 4 72 43 11 32; E-mail: dugourd@lasim.univ-lyon1.fr*

^b *GAP, Université de Genève, 20 rue de l'École de médecine, CH 1211 Genève, Switzerland. Fax: 41 22 379 3980; Tel: 41 22 379 6594; E-mail: wolf@physics.unige.ch*

Abstract: Femtosecond pump-probe experiments are performed on flavin biomolecules isolated in an ion trap. Mass spectra of the photoinduced fragments show that the fragmentation pathways can be modified using 2-color 2-photon excitation. In particular, when an infrared probe pulse (810 nm) is added subsequent to the first excitation step (excitation of the S₁ state of flavin mononucleotide, FMN, at 405 nm), branching ratios between lumichrome (LC) and lumiflavin (LF) production are inverted relative to the single excitation case.

Graphical abstract: Femtosecond pump-probe experiments are performed on flavin biomolecules isolated in an ion trap. Mass spectra of the photoinduced fragments show that the fragmentation pathways can be modified using 2-color 2-photon excitation. In particular, when an infrared probe pulse (810 nm) is added subsequent to the first excitation step (excitation of the S_1 state of flavin mononucleotide, FMN, at 405 nm), branching ratios between lumichrome (LC) and lumiflavin (LF) production are inverted relative to the single excitation case.



Flavins are redox-active chromophores which are found in enzymes and photoreceptors. Flavoenzymes are known to play a crucial role in light-mediated signal transduction. For example, in the blue-light photoreceptor phototropin, the photoexcitation of flavin is the initial step in the subsequent long reaction cascade.^{1,2} Among flavins, flavin mononucleotide (FMN) is a coenzyme of many electron transferring enzymes.³ Because of the biological relevance of flavins, their photophysics has been studied extensively,⁴ especially in aqueous solution,^{5,6} with particular reference to the photodegradation of riboflavin (RF) into lumichrome (LC) and lumiflavin (LF), two of the main photofragments. Furthermore, the photodissociation of LC and LF has been shown to depend strongly on the pH of the solution, LC being the major fragment in acidic solutions.⁷ The relevance of the photo-chemical properties of these molecules with the fact that experiments on flavins in the gas phase are relatively easy to perform, together, indicates that flavins are ideal systems for gas-phase dynamics studies. A recent experiment reports studying the photodegradation of flavins through mass spectrometry of photofragments produced, using flash photolysis of flavins in aqueous solution.⁵ The present paper presents femtosecond pump-probe experiments on trapped FMN ions. The viability of partially controlling dissociation pathways using a pump-probe excitation scheme is shown. In particular, we demonstrate that adding the probe pulse increases the LC production to the detriment of LF. This behaviour might be linked to previous results in liquids where the amount of LC is enhanced by low pH environments.⁷

Experimental Setup

Femtosecond pump-probe experiments were performed using a modified commercial ion-trap mass spectrometer (LCQ DUO with the MSn option; Thermo Electron, San Jose, CA, USA) equipped with an off-axis electrospray ionisation (ESI) source. The ring electrode of the quadrupole ion trap (QIT) was pierced to allow the introduction of laser beams (see Talbot et al.⁸ for details). For photodissociation experiments, precursor ions are first isolated in the trap. After isolation, they are irradiated for 50 ms (i.e. one laser shot), but results do not change significantly by increasing the interaction time up to 500 ms. The ions are finally ejected from the trap and the resulting mass spectrum is recorded, with an average subsequently taken over about 200 spectra. For all experiments, a constant number of FMN ions was maintained inside the trap (~ 600).

The excitation laser is a chirped pulse amplified Ti:Sa laser (typically 150 fs around 810 nm) operated at a repetition rate of 22.5 Hz. The laser is frequency doubled through a 1 mm thick BBO crystal. The 810 nm (probe) and 405 nm (pump) beams are split by a dichroic mirror in a pump-probe delay line. Both pump and probe beams are spatially recombined with an adjustable delay before entering the trap. The precise temporal overlap of the pump and the probe pulses (zero delay) is calibrated by observing sum frequency mixing (SFM) in a thin BBO crystal. Both laser beams pass a mechanical shutter that is electronically synchronized with the mass spectrometer. A lens ($f = 500$ mm) located around 600 mm from the centre of the trap is used to focus the laser beams on the ion packet. MS²- and MS³-CID (Collision Induced Dissociation) experiments were performed for comparison using the same experimental set-up.

Results

FMN (Sigma-Aldrich, scheme 1) is dissolved, with 1% acetic acid in H₂O/CH₃OH 1:1 (v/v), to a concentration of 200 μ M. Electrospraying the FMN solution reveals protonated and sodiated FMN in the mass spectrum. Protonated FMN (m/z 457) is then isolated and collision induced dissociation (CID) or ultraviolet photodissociation (UVPD) MS² spectra are recorded.

The pump pulse wavelength (405 nm) for UVPD is chosen to occur in one of the main absorption bands of FMN as shown in figure 1. CID and UVPD (typical pump intensity = 5×10^{10} W/cm²) spectra are compared in figure 2. CID mainly causes the loss of a water molecule (m/z 439) with a small amount of m/z 359 also produced. The latter fragment corresponds to the loss of the phosphate group H₃PO₄, in other words, to riboflavin minus H₂O (RF⁰). Photon-induced dissociation yields very different effects (figure 2b), the most striking feature in UVPD spectra being the major increase in the m/z 359 peak and the appearance of lumichrome (LC, m/z 243), lumiflavin (LF, m/z 257) and formylflavin plus hydrogen(s) (FLF^H, m/z 286 and 287). In contrast, the channel corresponding to the loss of H₂O (m/z 439) is almost suppressed.

The increase in m/z 359 (loss of the phosphate group) observed in figure 2b may result from a photo-induced proton transfer from the isoalloxazine to the phosphate group in the excited state following the excitation. This is similar to what was observed by Sobolewski et al. on smaller molecules,⁹ and by Tabarin et al. for peptides.¹⁰ This hypothesis is strengthened by mass spectra obtained for deprotonated molecules, for which this photo-induced proton transfer is not possible (figure 3). The figure reveals no significant difference between the CID and UVPD mass spectra; in particular, phosphate loss is observed in both excitation modes. This implies that the protonation state of the molecule plays a role in the loss of phosphate following a UV excitation.

When a probe pulse, at 810 nm, with a typical intensity of 2.8×10^{11} W/cm², and superimposed spatially with the pump beam, follows the pump, branching ratios ($I_{\text{fragment}}/\Sigma I_{\text{fragments}}$) corresponding to the different fragmentation pathways are changed, as plotted in figure 4. The addition of the IR pulse decreases the production of LF and RF⁰ to the benefit, in particular, of LC. Furthermore, the radical form of FLF^H (m/z 286) increases, whereas the other form (m/z 287) surprisingly decreases. Note that in the pump-probe delay range from 0 to 100 ps, no specific changes in the dynamics have so far been observed. In particular, no short time scale dynamics, such as vibronic wave-packet motions, are observed at the time resolution provided by the experiment (150 fs). As a control, it is observed that the probe pulse alone induces negligible dissociation.

In a second set of experiments, we recorded, the dependence of LC, LF and RF⁰ branching ratios as a function of the probe pulse intensity, with a fixed delay $\Delta t=0$. Figure 5 compares the behaviour of these fragments with increasing probe pulse intensity (I_{probe}). While the amount of LC rises with I_{probe} , the percentage of LF decreases from 48% to 36%, which corroborates the previous observations (figure 4). At low I_{probe} , the increase in LC (respectively, decrease in LF) appears linear. The decrease in the phosphate-loss fragment as the probe laser intensity increases may reflect a diminution of the proton transfer rate.

Discussion and Conclusion

The main result arising from these experiments is that it is possible to change the branching ratios in the photodissociation of FMN using a pump-probe excitation scheme. As shown in the absorption spectrum (figure 1), the pump pulse energy (405 nm, i.e. 24700 cm⁻¹) lies in the first absorption band of FMN, corresponding to the transition S₀-S₁ (π - π^*). The probe pulse at 810 nm promotes the excited molecules to a higher excited state S_n in the second absorption band (around 270 nm). New dissociation pathways are thus available resulting particularly in an increase in the amount of LC, and corresponding decrease in LF. It is important to note that neither the collision-induced nor the photo-induced dissociation of LF (MS³ spectra not shown) shows formation of LC. Moreover, the photofragments arising from

the photodissociation of LC and LF differ. Both observations are against a two-step photodissociation from FMN to LF and then from LF to LC.

In the following, we will mainly focus on the photo-degradation of FMN into LC and LF because they are the main products studied in liquids, and into FLF^H because of its striking behaviour (see figure 4). The photodissociation mechanism is rather complex but an attempt can be made to explain the observed behaviour. It is interesting to compare this laser-induced preferential dissociation to the photodegradation of flavins in liquids studied in several previous works. In liquids, if the pH of the solution is acidic or neutral, FMN and RF tend to photodissociate into LC rather than into LF, whereas if the pH rises above 8, LF is also produced.⁷ In our experiment, the decrease in LF (and in the phosphate-loss fragment) in favour of LC might be connected to a change in the proton transfer rate which would reflect different dynamics in the S₁ and S_n excited states. Here, proton transfer leads to a deprotonation of the isoalloxazine group. In the first excited state (corresponding to the absorption band around 400 nm), the proton transfer may be faster than in higher excited states; this would be in favour of LF production as observed in basic solutions, for which the isoalloxazine moiety is not protonated. Thus, in the higher excited states, proton transfer may be slower, which would lead to an increase in the LC channel, as observed in acidic solutions for which the isoalloxazine moiety is protonated.

Another possibility would imply different relaxation pathways between singlet and triplet states, as described in the liquid phase by Heelis.¹¹ In our experiment, changing in the branching ratio of LC and LF might reflect different coupling mechanisms between singlet and triplet states after the absorption of one or two laser pulses (figure 6). Besides, in the liquid phase, FLF^H is known to be formed via combined photoreduction and dealkylation,^{11, 12} which involve distinct states (singlet/triplet). This could explain, in our case, the opposite behaviour of the two forms of the ions when adding the second pulse.

In conclusion, CID and UVPD lead to different fragmentation pathways of protonated FMN. Moreover, it is possible to use a pump-probe excitation scheme to modify branching ratios in the photodissociation of gas-phase protonated FMN. A tentative explanation relating these results to solution pH was proposed; proton transfer is thought to be reduced by adding the probe pulse, leading to an increase in the LC photofragment, which is the main product in acidic solutions. This experiment is a preliminary step towards the control of reactivity in gas-phase biological compounds and opens interesting perspectives for optimal control experiments.

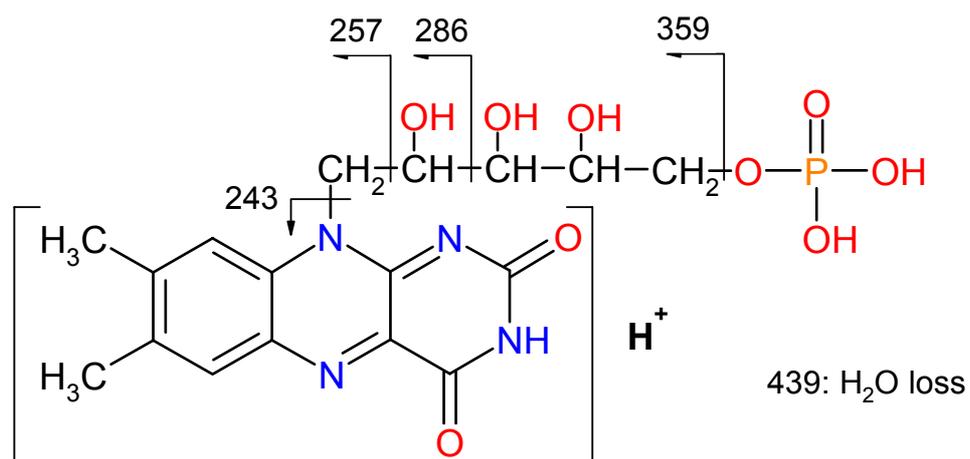
Acknowledgements

The authors gratefully thank Kim Hajek for relevant rereading and help in English.

References:

- ¹ S. Crosson and K. Moffat, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98**, 2995 (2001).
- ² C. Neiss and P. Saalfrank, Photochemistry and Photobiology **77**, 101 (2003).
- ³ B. A. Palfey and V. Massey, *Comprehensive Biological Catalysis. A Mechanistic Reference. Radical Reactions and Oxidation/Reduction, vol III* (Academic Press, San Diego, CA, 1997).
- ⁴ Y.-L. Pan, R.G. Pinnick, S.C. Hill, et al., Appl. Phys. B **72**, 449 (2001).
- ⁵ W. Holzer, J. Shirdel, P. Zirak, et al., Chem. Phys. **308**, 69 (2005).

- 6 I. Ahmad, Q. Fasihullah, and F. H. M. Vaid, *J. Photochem. Photobiol.*, B **75**, 13
(2004).
- 7 R. Huang, H. J. Kim, and D. B. Min, *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2359 (2006).
- 8 F. O. Talbot, T. Tabarin, R. Antoine, et al., *J. Chem. Phys.* **122** (2005).
- 9 A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux, et al., *Phys. Chem. Chem.*
Phys. **4**, 1093 (2002).
- 10 T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 2883
(2005).
- 11 P. F. Heelis, *Chem. Soc. Rev.* **11**, 15 (1982).
- 12 W. L. Cairns and D. E. Metzler, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2772 (1971).
- 13 S. D. M. Islam, A. Penzkofer, and P. Hegemann, *Chem. Phys.* **291**, 97 (2003).



Scheme 1: The protonated FMN molecule showing branching points for major photofragments and their m/z value.

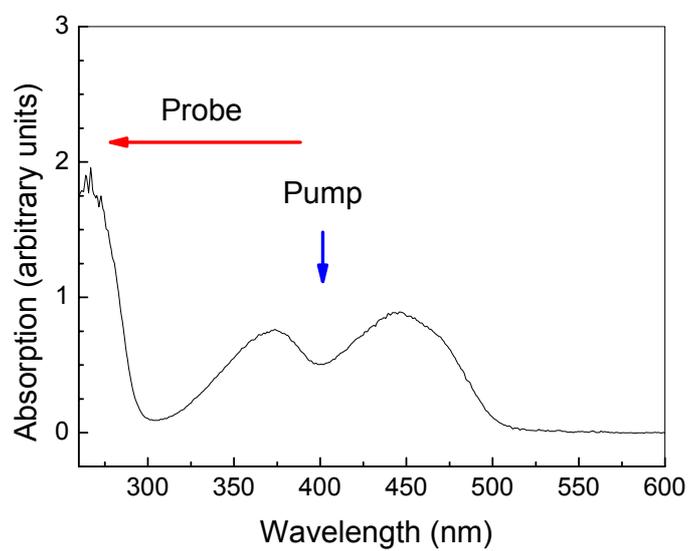


Fig. 1 Absorption spectrum of FMN in water.

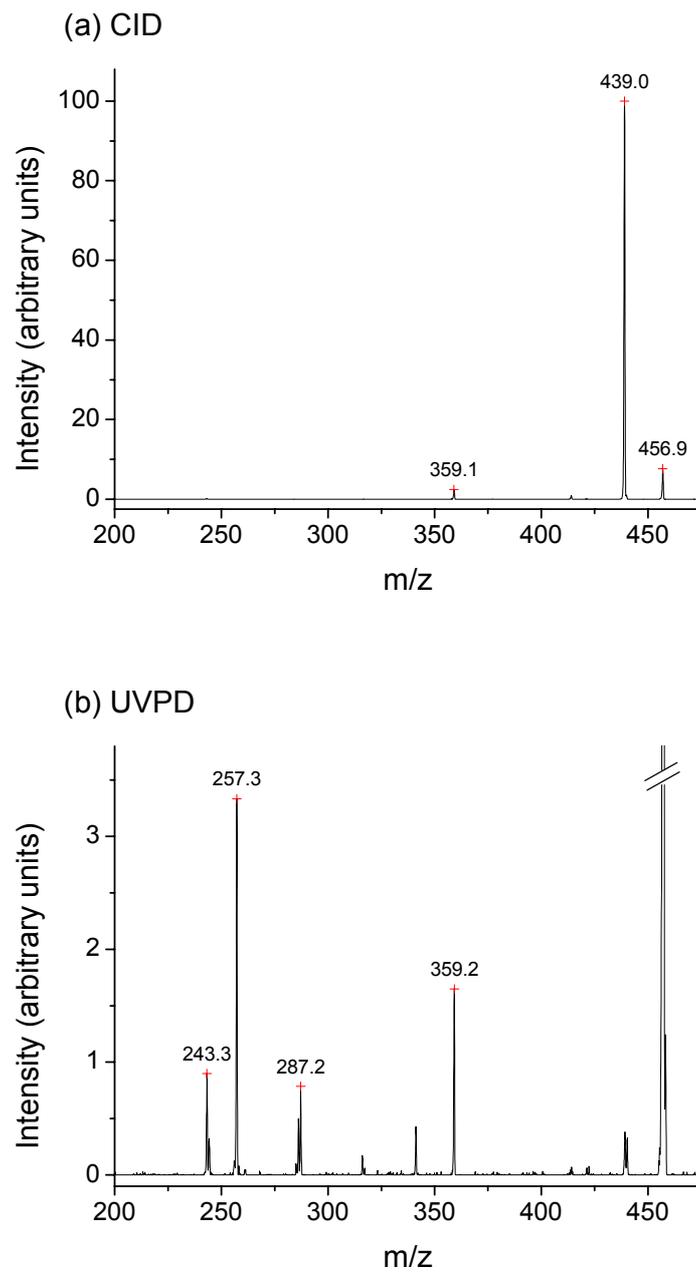


Fig. 2 Mass spectra of trapped protonated FMN (m/z 457). (a) Collision-induced dissociation (CID). (b) Ultraviolet photodissociation (UVPD) for a pump at $\lambda=405$ nm.

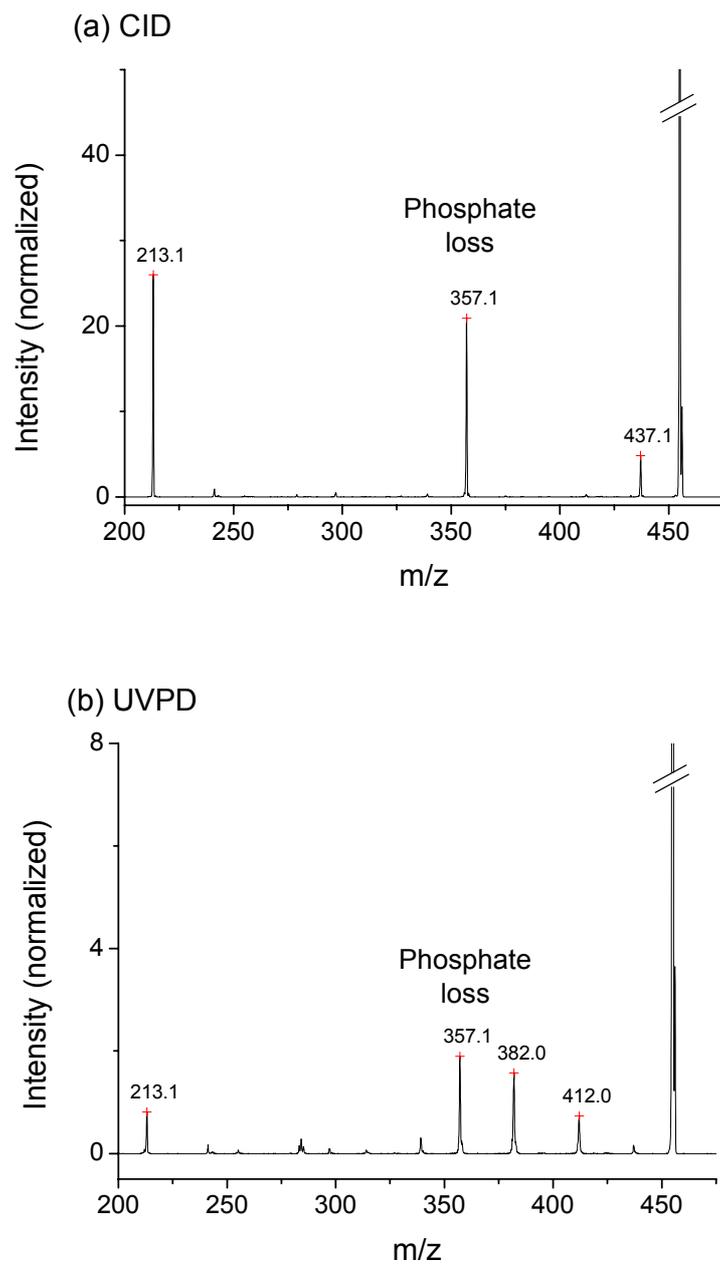


Fig. 3 Mass spectra of trapped deprotonated FMN (m/z 455). (a) Collision-induced dissociation (CID). (b) Ultraviolet photodissociation (UVPD) for a pump at $\lambda=405$ nm.

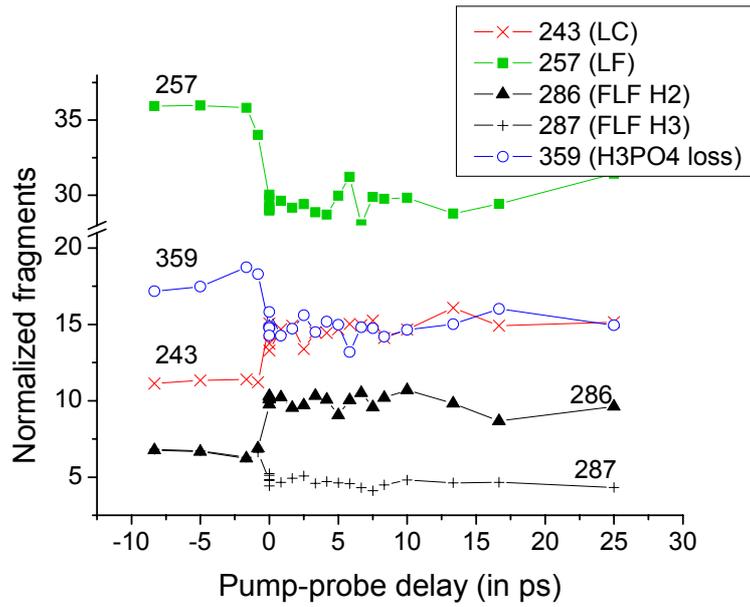


Fig. 4 Branching ratio measured for the main fragments of FMN as a function of the pump-probe delay.

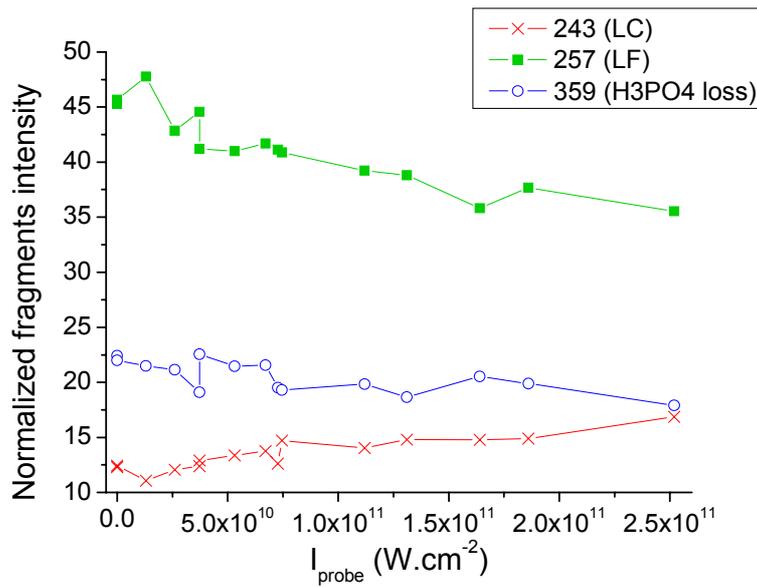


Fig. 5 Power dependence on the probe pulse intensity of the fragments LF, LC and phosphate loss.

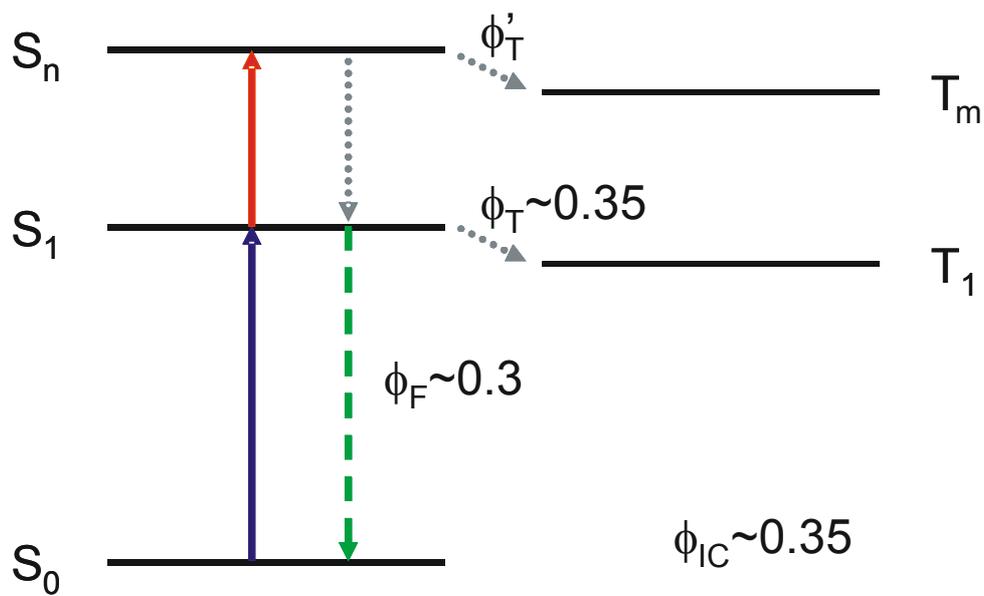


Fig. 6 Simplified Jablonski diagram of FMN. Quantum yields are for neutral aqueous riboflavin and are taken from Islam et al.¹³ The pump pulse (around 405 nm) will promote FMN from S_0 to its first excited state S_1 whereas the probe pulse (around 810 nm) will address the higher excited state (in the 270 nm band).