



HAL
open science

Spectroscopie IR et spectrométrie de mobilité ionique appliquées aux structures de systèmes chargés isolés d'intérêt pharmaceutique

Jean Christophe Pouilly

► **To cite this version:**

Jean Christophe Pouilly. Spectroscopie IR et spectrométrie de mobilité ionique appliquées aux structures de systèmes chargés isolés d'intérêt pharmaceutique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2009. Français. NNT : . tel-00465057

HAL Id: tel-00465057

<https://theses.hal.science/tel-00465057v1>

Submitted on 18 Mar 2010

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.

UNIVERSITE PARIS XIII - INSTITUT GALILEE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XIII

Discipline : Physique

présentée et soutenue publiquement

par

Jean-Christophe POULLY

**Spectroscopie IR et spectrométrie de mobilité ionique
appliquées aux structures de systèmes chargés isolés
d'intérêt pharmaceutique**

Soutenue le 4 décembre 2009 devant le jury composé de :

Marc LAMY DE LA CHAPELLE

Président

Jean-Yves SALPIN

Rapporteur

Jean-Yves LE QUESTEL

Rapporteur

Guillaume VAN DER REST

Lamri ADOUI

Charles DESFRANCOIS

Directeur de thèse

Remerciements

On pourrait penser que les remerciements sont faciles à écrire car c'est la seule partie non-scientifique d'une thèse, mais c'est faux, si j'oublie quelqu'un (ce qui est inévitable) il va le prendre mal, c'est donc parfait pour se faire des ennemis !! Toutefois, c'est la tradition et ce serait pour le moins discourtois de prétendre avoir achevé ce travail tout seul... Je me lance donc, en respectant un ordre inversement chronologique de ma soutenance à ma naissance, ou presque.

Tout d'abord, je remercie vivement les membres de mon jury, et notamment le professeur Marc Lamy de la Chapelle d'avoir accepté de le présider. Merci tout particulièrement à MM Le Questel et Salpin, qui ont accompli leur travail de rapporteurs avec rigueur et application. Ils ont émis des remarques le plus souvent pertinentes et intéressantes à la lecture de ce manuscrit, et il s'en est trouvé de ce fait grandement amélioré. Même si elle fut éprouvante, la journée de ma soutenance a été pour moi très agréable, et cela en grande partie grâce à tous ceux qui m'ont accompagné, notamment mes parents, ma soeurette, ma chère et tendre, et mes amis... Un grand merci du fond du cœur de vous être déplacés, parfois de loin, pour supporter trois heures de blabla imbitable en luttant contre le sommeil !!

Ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour sans le soutien sans faille de mes collègues de l'équipe AMIBES du Laboratoire de Physique des Lasers, Bruno Manil, Yves Bouteiller, Nicolas Nieuwjaer, mais surtout Gilles Grégoire, Charles Desfrançois, Frédéric Lecomte et Jean-Pierre Schermann, qui ont patiemment lu, corrigé et commenté chacun des chapitres et annexes. De manière plus générale, j'ai passé dans l'équipe trois années formidables, dans une ambiance sérieuse mais pas trop, grâce à la compétence, aux connaissances scientifiques et à la bonne humeur de tous... Les contrepèteries de Jean-Pierre et les blagues de Fred (que je comprends vite quand on m'explique longtemps) y ont grandement contribué. Ce dernier mériterait en outre la médaille de la patience pour ses explications sur le fonctionnement des OPO à un béotien comme moi ! La rigueur et la profonde compréhension des phénomènes physiques de Gilles ont également largement contribué à me faire évoluer au niveau scientifique. Je serais un fieffé goujat si j'oubliais de mentionner Jean-Christophe « JC1 » Gillet (la perfection au masculin) et Mahamadou Seydou, notre Nord-Malien (copyright J.P.), avec qui j'ai partagé la vie de doctorant et qui m'ont aidé à comprendre les subtilités du monde académique ! Une spéciale dédicace à JC1, grâce à (ou plutôt à cause de) qui j'ai occupé la fonction ô combien enviable de président de l'Association des Doctorants de Galilée... Je tiens enfin à exprimer ma gratitude à Charles Desfrançois, qui, malgré son emploi du temps quelque peu surchargé en tant que directeur du LPL et vice-président du Conseil Scientifique de l'université, a su me consacrer du temps et me soutenir dans toutes mes démarches.

Le nouveau montage expérimental que j'ai contribué à monter a été en grande partie réalisé par les équipes de mécanique, d'optique et d'électronique, un grand merci pour leur excellent travail et leurs conseils avisés. J'ai notamment été impressionné par le calme de Michel Fosse lorsqu'il s'est rendu compte qu'il devait refaire entièrement une pièce qui lui avait pris des dizaines d'heures de travail... Les efforts des secrétaires du LPL pour passer au plus vite les commandes de matériel méritent également que je leur tire mon chapeau. Je suis grandement redevable envers Jacques Baudon, l'homme qui sait tout, qui a toujours pris le temps de répondre à mes questions, malgré son aversion prononcée pour les cm^{-1} !! La plupart des autres membres du laboratoire ont contribué à faire de ma thèse une très bonne expérience, et je leur en suis donc sincèrement reconnaissant. Une émotion certaine m'étreint lorsque je revois Laurent Philippet les mains dans les pis de sa vache expérimentale...

L'épisode de la banderole « CNRS, Université, tous ensemb' » lors des mouvements contre la réforme du statut des enseignants-chercheurs restera également dans les annales du LPL !

Nous avons eu des collaborations scientifiques fructueuses avec l'équipe de Philippe Dugourd, à l'Université de Lyon, je tiens donc à remercier chaleureusement Renaud Ballivian et Fabien Chirot pour leur aide et toute l'équipe pour son excellent accueil. L'annexe 3 est un travail qui a été effectué en étroite collaboration avec Majdi Hochlaf et Lionel Poisson, qui m'ont beaucoup appris sur la photo-ionisation et qui méritent donc ma sincère gratitude. Merci également à Gustavo Garcia et Laurent Nahon, du synchrotron Soleil, pour leur précieuse aide. Au niveau des collaborations non-scientifiques, j'ai passé une très bonne semaine à Fréjus, en septembre 2008, à organiser l'école d'été « Biomimetic systems » avec Isabelle Kleiner et Martin Schwell, auxquels j'exprime ma sincère reconnaissance.

Je n'aurais certainement pas fourni le travail qui est contenu dans ce manuscrit si J. P. Schermann ne m'avait pas « réveillé » à une certaine conférence fin 2007 en me demandant pourquoi je ne m'occupais pas de ma thèse... Un très grand merci, d'autant plus qu'il a eu l'idée d'utiliser la méthode ONIOM, je lui dois donc beaucoup.

Le fait que j'ai atterri au LPL pour ma thèse est en partie le fruit du hasard, puisque j'avais contacté François Piuzzi du CEA Saclay, et c'est lui qui a parlé de moi à Charles. Je remercie donc beaucoup François, sans qui je n'en serais pas là... De la même façon, Steen Brønsted Nielsen, mon maître de stage en Master 1 et 2, qui m'a accueilli à l'université d'Århus et formé à la physico-chimie moléculaire en phase gazeuse, un domaine qui m'était à l'époque complètement inconnu, avec une patience et un talent de pédagogue sans égaux, a gagné toute ma reconnaissance. Je suis également redevable envers les professeurs de Master 2 de l'université de Rennes 1 qui m'ont soutenu, en particulier Ian Sims, Jeanine Emile et Brian Mitchell. Enfin, un grand merci à Philippe Rabiller de l'université de Rennes 1, qui m'a fait découvrir le magistère matériaux de Rennes...

Pour terminer ces remerciements, je ne peux omettre de mentionner mes parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé, même lorsque je passais par des périodes mouvementées... Toutes mes pensées vont par conséquent vers eux.

Sommaire

Chapitre I: Introduction générale	9
Chapitre II: Méthodes expérimentales pour l'étude structurale de molécules en phase gazeuse	20
Chapitre III: Méthodes utilisées pour la modélisation	39
Chapitre IV: Le peptide AGWLK	77
Chapitre V: La vancomycine et ses complexes	90
Chapitre VI: Brins de la protéine Amyloïde β en phase gazeuse	129
Chapitre VII: Mise en phase gazeuse de systèmes d'intérêt biologique et pharmaceutique	151
Chapitre VIII: Conclusions et perspectives	192
<i>Annexe 1: Liste des conformères utilisés pour le calcul des facteurs d'échelle spécifiques avec la méthode ONIOM</i>	198
<i>Annexe 2: Le brin 16-22 de la protéine Amyloïde β</i>	200
<i>Annexe 3: Photo-ionisation de la 2-pyridone</i>	210

Table des matières

Chapitre I: Introduction générale	
<i>1.1 Les molécules d'intérêt biologique et pharmaceutique</i>	9
<i>1.2 Intérêt des études en phase gazeuse</i>	15
Références du chapitre I	18
Chapitre II: Méthodes expérimentales pour l'étude structurale de molécules en phase gazeuse	
<i>II.1 La spectroscopie InfraRouge</i>	
1.1 Introduction	20
1.2 La spectroscopie IRMPD	21
a) Principe	21
b) Description des dispositifs expérimentaux	25
1.3 La spectroscopie de détachement d'électrons	29
1.4 La spectroscopie UV/IR	30
<i>II.2 La spectrométrie de mobilité ionique</i>	
2.1 Introduction	31
2.2 Description du montage expérimental	33
<i>II.3 Conclusion du chapitre</i>	36
Références du chapitre II	38

Chapitre III: Méthodes utilisées pour la modélisation	
<i>III.1 Introduction</i>	39
<i>III.2 La recherche de conformations</i>	39
2.1 Les champs de forces	40
a) Introduction	40
b) Etude des énergies relatives de différents conformères d'un ion moléculaire selon la méthode de calcul	41
2.2 Les méthodes implémentées dans MacroModel	44
<i>III.3 Les méthodes de dynamique moléculaire</i>	48
<i>III.4 Les méthodes quantiques de calculs de structures et de fréquences</i>	
4.1 Introduction	49
4.2 Les méthodes DFT	50
4.3 Evaluation de la méthode ONIOM	51
a) Introduction	51
b) Description de la méthode	52
c) Utilisation de la méthode ONIOM pour la spectroscopie IR	54
d) Détermination des facteurs d'échelle pour la méthode ONIOM	55
e) Un test de l'approche ONIOM: interprétation du spectre IR de la séquence [RGD+H⁺]	65
4.4 Prédiction des fréquences de vibration des modes incluant un groupement chargé	69
4.5 Détermination des facteurs d'échelle pour la méthode ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1	70
<i>III.5 Simulations de sections efficaces de collision</i>	72
<i>III.6 Conclusion du chapitre</i>	74
Références du chapitre III	75

Chapitre IV: Le peptide AGWLK

<i>IV.1 Introduction</i>	77
<i>IV.2 Résultats</i>	
2.1 Commentaire sur la précision des calculs d'énergie et de fréquences effectués	79
2.2 Le monocation	79
2.3 Le dication	83
<i>IV.3 Discussion</i>	86
Références du chapitre IV	89

Chapitre V: La vancomycine et ses complexes

<i>V.1 Introduction</i>	90
<i>V.2 Mode positif</i>	93
2.1 Vancomycine seule	93
a) Résultats expérimentaux	93
b) Apport des simulations	97
2.2 Vancomycine complexée	103
a) Résultats expérimentaux	103
b) Apport des simulations	105
<i>V.3 Mode négatif</i>	109
3.1 Discussion des résultats expérimentaux	109
a) Recherche des sites de déprotonation	109
b) Influence du récepteur sur la structure de la vancomycine déprotonée	109

c) La vancomycine complexée peut-elle avoir une structure zwitterionique?	112
d) Influence de l'état de charge du complexe	112
3.2 Apports des simulations de chimie quantique	115
a) Etude du récepteur $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}$ déprotoné	115
b) La vancomycine déprotonée isolée garde-t-elle sa forme native?	119
c) La complexation « fige » la structure de la vancomycine isolée	121
V.4 Conclusion du chapitre	127
Références du chapitre V	128
Chapitre VI: Brins de la protéine Amyloïde β en phase gazeuse	
VI.1 Introduction	129
VI.2 Les spectres IRMPD des grosses molécules sont-ils exploitables?	132
VI.3 Le TFE favorise la conservation de l'hélice α dans les brins d'amyloïde beta en phase gazeuse	134
3.1 Le cas du brin 12-28	134
a) Influence de l'état de charge	134
b) L'hélice α est favorisée en phase gazeuse	136
3.2 Influence de la longueur du brin	141
VI.4 Un environnement polaire favorise les structures globulaires	142
4.1 Résultats issus de la mobilité ionique	142
4.2 Résultats issus de la spectroscopie IRMPD	148
a) Influence de l'état de charge	
VI.5 Conclusion du chapitre	149
Références du chapitre VI	150

Chapitre VII: Mise en phase gazeuse de systèmes d'intérêt biologique et pharmaceutique

<i>VII.1 Introduction</i>	151
<i>VII.2 Les principales méthodes de mise en phase gazeuse de systèmes moléculaires</i>	151
2.1 Le four	151
2.2 L'impact électronique	152
2.3 L'ionisation chimique à pression atmosphérique	152
2.4 La désorption par plasma	154
2.5 La désorption par impact d'ions de basse énergie	154
2.6 L'électrospray	155
2.7 La technique MALDI	168
2.8 La désorption sur jet liquide	160
2.9 La désorption sur micro-gouttelettes	163
<i>VII.3 Développement expérimental: source d'espèces biomoléculaires refroidies ro-vibrationnellement</i>	165
3.1 Intérêt du refroidissement ro-vibrationnel	165
a) Origine de la largeur des bandes en spectroscopie IR	165
b) Solutions possibles pour l'amélioration de la résolution	166
3.2 Réalisation du montage expérimental	169
a) Principe général de l'expérience	169
b) Génération de micro-gouttelettes	170
c) Couplage des gouttelettes à l'enceinte à vide	173
d) Explosion des gouttelettes	176
e) Interaction entre gouttelettes et jet supersonique	183
f) Montage des détecteurs et du spectromètre de masse	185

g) Sélection en masse et spectroscopie IR	188
Références du chapitre VII	190
Chapitre VIII: Conclusions et perspectives	
VIII.1 Résultats obtenus	192
VIII.2 Perspectives	194
Références du chapitre VIII	197
Annexe 1: Liste des conformères utilisés pour le calcul des facteurs d'échelle spécifiques avec la méthode ONIOM	
Références de l'annexe 1	199
Annexe 2: Le brin 16-22 de la protéine amyloïde β	
2.1 Introduction	200
2.2 Etude du monomère	201
2.1 Résultats expérimentaux	201
2.2 Simulations	202
a) Le peptide protoné	202
b) Le peptide déprotoné	206
2.3 Etude du dimère	208
Références de l'annexe 2	209
Annexe 3: Photo-ionisation de la 2-pyridone	
3.1 Introduction	210
3.2 But du projet	213
3.3 Description du montage expérimental	216
3.4 Résultats et discussion	220
4.1 Spectres de photoélectrons 2D	220
4.2 Spectre de rendement d'ions	222
4.3 Spectre de photoélectrons 1D	223
Références de l'annexe 3	227

- Abréviations et conventions

Ac: groupement acétyle

Bande amide I: bande formée des transitions dues à l'absorption des modes d'élongation des liaisons C=O des liaisons amide d'un peptide

Bande amide II: bande formée des transitions dues à l'absorption des modes de pliage des liaisons N-H des liaisons amide d'un peptide

Bande amide III: bande formée des transitions dues à l'absorption des modes d'élongation des liaisons C-N des liaisons amide d'un peptide

CB: couche basse d'un calcul ONIOM

CH: couche haute d'un calcul ONIOM

DFT: Density Functional Theory

IRMPD: Infra-Red Multi-Photon Dissociation

IVR: Intramolecular Vibrational energy Redistribution

MB: méthode basse d'un calcul ONIOM

MH: méthode haute d'un calcul ONIOM

OPO: Optical Parametric Oscillator

PDB: Protein Data Bank

PES: Potential Energy Surface

QM/MM: Quantum Mechanics/Molecular Mechanics

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD: Root Mean Square Deviation

[X + nH⁺]: molécule X à laquelle on a ajouté n protons, et donc chargée n fois

[X - nH⁺]: molécule X à laquelle on a enlevé n protons, et donc chargée -n fois

Chapitre I: Introduction générale

1.1 Les molécules d'intérêt biologique et pharmaceutique

Dans les cellules des organismes procaryotes et eucaryotes, il existe une multitude de molécules qui ont chacune des rôles bien définis dans les processus physico-chimiques sans lesquels la vie ne pourrait avoir lieu. Ces molécules ont des tailles et des structures très variées, mais elles sont composées en très vaste majorité d'atomes de carbone (C), d'azote (N), d'oxygène (O) et d'hydrogène (H). Dans ce travail, je vais surtout étudier des acides aminés et des peptides. Les acides aminés sont des molécules relativement petites, de 10 à 20 atomes (leur structure générale est représentée sur la Figure 1) qui, lorsqu'elles sont assemblées sous la forme d'une chaîne, forment un peptide. Les protéines sont des peptides de grande taille pouvant comporter jusqu'à plusieurs milliers d'acides aminés. La structure de Lewis d'un peptide est illustrée par un exemple dans la Figure 4. Dans le Tableau 1, je présente la nomenclature des 20 acides aminés les plus courants. J'utiliserai celle-ci de manière récurrente dans ce manuscrit. La réaction chimique qui permet de fabriquer un peptide à partir de plusieurs acides aminés est une synthèse peptidique, elle est illustrée par un exemple dans la Figure 2. Elle se déroule dans le ribosome, une entité de la cellule dont la fonction est de décoder l'information contenue dans l'ARN messager et de synthétiser les protéines. On peut distinguer quatre niveaux de structure dans une protéine: la simple séquence des acides aminés est la structure primaire. La disposition dans l'espace d'acides aminés voisins forme la structure secondaire. L'organisation spatiale relative de ces « blocs » secondaires est appelée structure tertiaire. Enfin l'assemblage non-covalent des blocs tertiaires constitue la structure quaternaire. Dans ce travail, je m'intéresserai uniquement aux structures primaires et secondaires des peptides étudiés. Il existe huit sortes de structures secondaires, mais je n'en présenterai que deux : l'hélice α et le feuillet β (voir Figure 3). Elles diffèrent par le réseau de liaisons H formé par les liaisons amides. Les différents types de liaisons H rencontrés dans les peptides sont appelés « C_n » avec n le nombre minimum d'atomes d'un cycle incluant la liaison H (voir la Figure 4). Une protéine sans structure régulière est appelée « globulaire ».

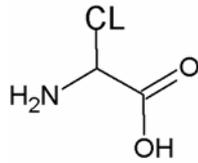


Figure 1 : structure de Lewis d'un acide aminé (CL désigne la chaîne latérale, spécifique à chaque acide aminé)

Tableau 1 : nomenclature usuelle par lettre des 20 acides aminés courants.

Alanine	Glycine	Lysine	Arginine	Tryptophane	Asparagine	Valine	Thréonine	Glutamine	Proline
A	G	K	R	W	N	V	T	Q	P
Cystéine	Acide glutamique	Leucine	Histidine	Phénylalanine	Méthionine	Acide aspartique	Isoleucine	Tyrosine	Sérine
C	E	L	H	F	M	D	I	Y	S

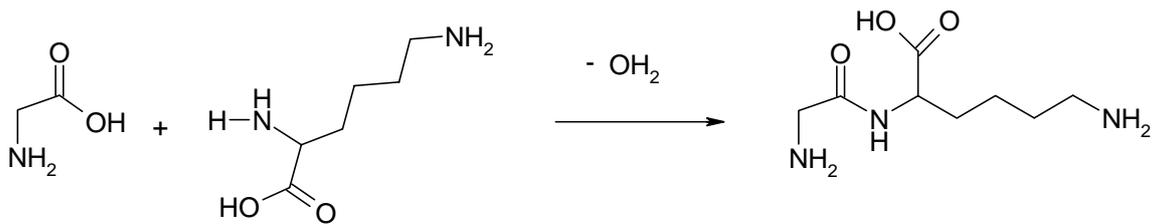


Figure 2 : synthèse du dipeptide GK à partir des acides aminés glycine et lysine.

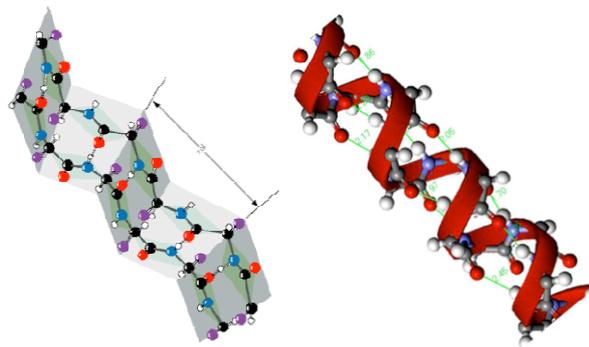


Figure 3 : structures secondaires en feuillet β (à gauche) et hélice α (à droite).

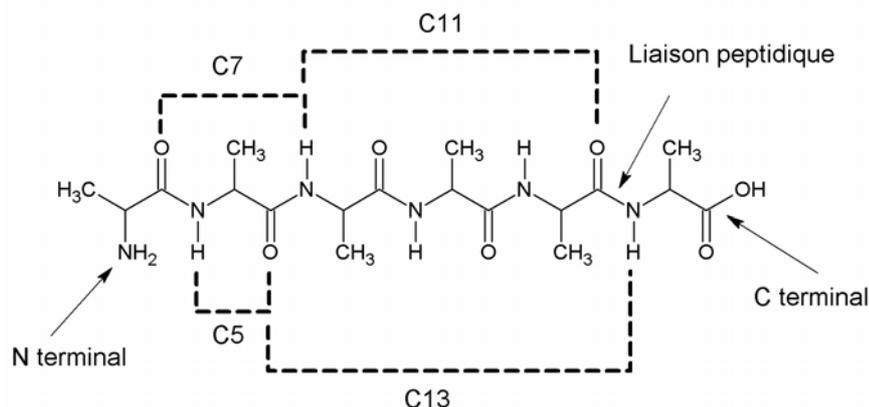


Figure 4 : structure de Lewis d'un peptide composé de six alanines. Les différents types de liaison H communément rencontrés dans les peptides sont notés par des tirets.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux molécules d'intérêt pharmaceutique. L'effet d'un médicament sur l'état de santé d'un patient peut être expliqué par son influence sur une ou plusieurs réactions biochimiques provoquées par la reconnaissance spécifique de ce médicament par un récepteur situé à la surface ou dans le cytoplasme de cellules. Comprendre le mécanisme et les causes physico-chimiques responsables de cette fixation est très utile d'un point de vue fondamental, mais a aussi dans l'optique de prédire de façon plus ou moins quantitative (relation QSAR Quantitative Structure-Activity Relationship) quelle molécule sera la plus active pour traiter une maladie donnée. Dans ces processus de reconnaissance de molécules entre elles, les structures 3D sont des données essentielles: elles conditionnent toutes les interactions non-covalentes qui peuvent exister entre les molécules car elles sont toutes dépendantes de la distance entre atomes r . Par exemple, la force électrostatique varie en $\frac{1}{r^2}$, celle entre une charge et un dipôle en $\frac{1}{r^3}$, alors que les forces de Van der Waals sont habituellement représentées par un potentiel de Lennard-Jones proportionnel à $\frac{1}{r^6} - \frac{1}{r^{12}}$. Les liaisons hydrogène (H) sont très probablement les plus indispensables à la description des complexes non-covalents de molécules organiques de par leur haute spécificité.

Afin d'illustrer ces concepts, je vais prendre l'exemple d'une petite molécule, le glutathion, qui est présent dans nos cellules et qui remplit de nombreux rôles. Le glutathion est un tripeptide (ECG) qui contient une liaison peptidique atypique entre la chaîne latérale de l'acide glutamique et le N terminal de la cystéine. Sa fonction principale est de nettoyer la

cellule des agents oxydants, mais il est également indispensable au bon fonctionnement du système immunitaire, de la réparation de l'ADN, de la synthèse des protéines... La fonction chimique responsable de son action biologique est le groupe thiol (S-H), situé sur la chaîne latérale de la cystéine. Ce groupe est donneur de proton, et donc fortement antioxydant, et il peut de ce fait rendre inoffensif les radicaux libres et autres espèces réactives contenant de l'oxygène. Son action est catalysée par une famille d'enzymes appelée S-transferase. Pour ce faire, il faut que le glutathion se fixe sur un site spécifique de ces enzymes, autrement dit qu'il forme un complexe non-covalent avec elles. Plusieurs complexes de ce type ont été cristallisés et leur structure déterminée par diffraction des rayons X. Celle de l'un d'entre eux est présentée sur la Figure 5. On peut voir sur cette même figure que le groupe thiol est sous forme anionique (déprotoné) et qu'il est en interaction avec la chaîne latérale d'une tyrosine de la S-transferase. La structure du glutathion complexé avec d'autres enzymes est similaire: la chaîne peptidique est ici dépliée afin d'optimiser les interactions intermoléculaires avec les acides aminés du récepteur les plus proches.

Nous avons montré récemment, en collaboration avec l'équipe de K. Bowen à Baltimore (USA), et par une étude de spectroscopie de détachement d'électrons couplée à des calculs de chimie quantique et de dynamique moléculaire, que la structure du glutathion neutre isolé en phase gazeuse, où le groupe thiol est cette fois protoné, est repliée afin d'optimiser ses propres interactions intramoléculaires (voir Figure 6), contrairement à ce qui se passe en phase aqueuse et dans des complexes avec différentes enzymes où les interactions intermoléculaires entrent alors en compétition ¹.

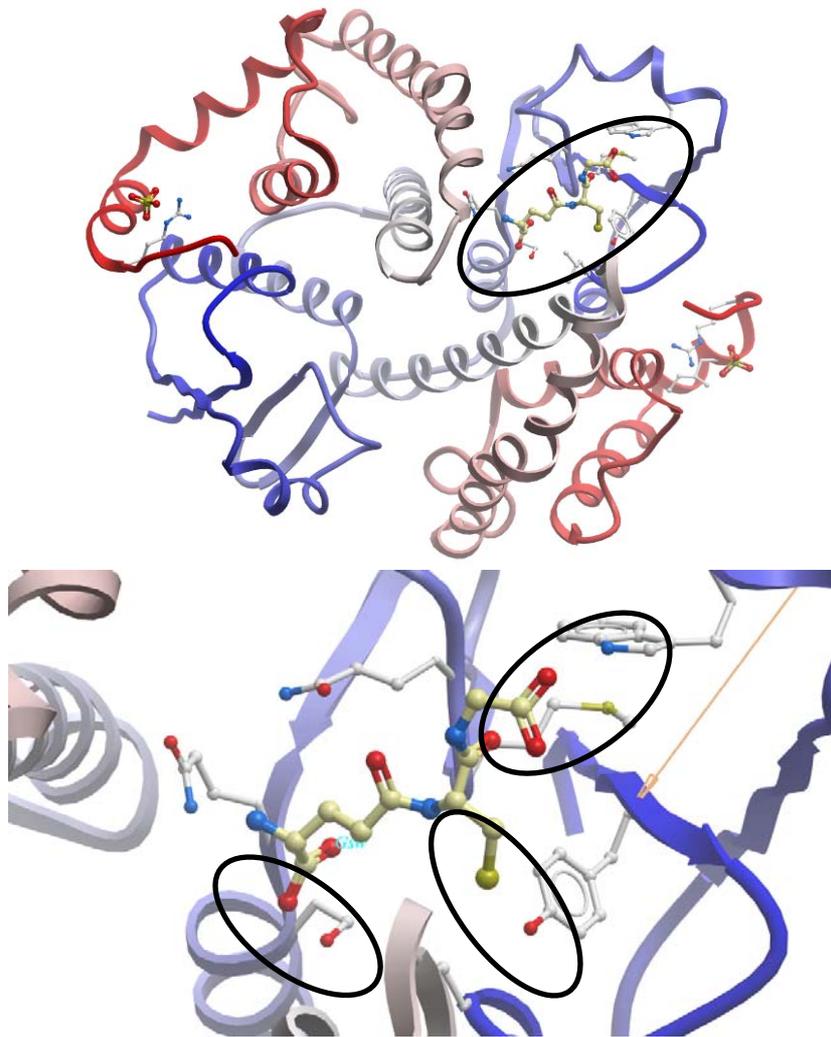


Figure 5 : en haut : structure cristallographique du dimère du complexe entre le glutathion et l'enzyme S-transferase. Seule la chaîne peptidique des protéines est représentée par un ruban (PDB 1m0u) et le glutathion est entouré en noir. En bas : agrandissement du site de liaison, où quelques liaisons H importantes pour la fixation du glutathion (représenté par des gros tubes) sont entourées en noir.

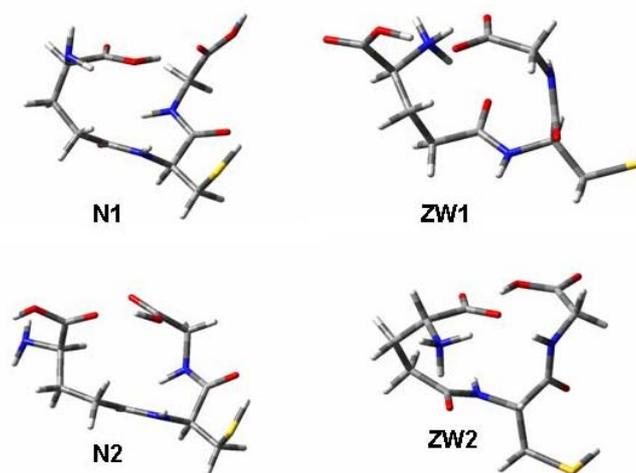


Figure 6 : structures des deux conformères du glutathion canoniques (N) et zwitterioniques (ZW) de plus basse énergie au niveau B3LYP/6-31+g(d) (voir chapitre « Techniques de modélisation »).

Une enzyme donnée reconnaît spécifiquement son substrat, et ne catalyse que certaines réactions. Cette spécificité a été d'abord expliquée par un simple modèle clé/serrure proposé par Fisher à la fin du 19^e siècle. Les formes de l'enzyme et de son substrat sont simplement supposées spatialement complémentaires ². Ce modèle n'explique cependant pas de façon satisfaisante l'abaissement de l'énergie d'activation de la réaction à catalyser et il a donc été amélioré au profit de l'ajustement de géométrie de l'enzyme et de son substrat induit par la complexation ³. Ce genre d'ajustement peut être observé à partir des structures issues de la base de données PDB (banque de données structurales concernant les protéines).

Dans le chapitre V de ce travail, je présenterai une étude concernant un complexe d'intérêt pharmaceutique en phase gazeuse comprenant un antibiotique, la vancomycine, et la fraction de son récepteur qui intervient dans la reconnaissance spécifique. Je parlerai notamment de changement de structure induit par la complexation.

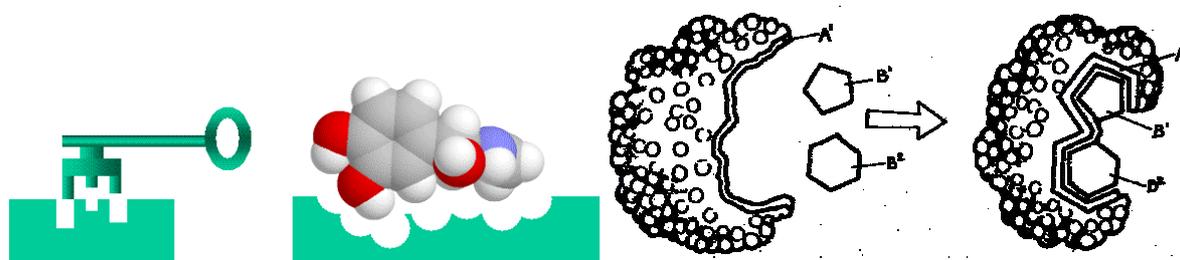


Figure 7 : modèles d'interaction substrat/enzyme de type clé/serrure (à gauche, tiré du site <http://home.mira.net/~reynella/debate/spetner.htm>) et d'ajustement induit (à droite, les ligands sont le pentagone et l'hexagone, l'image est tirée du site <http://chswab.lj.k12.nj.us/mstanley/outlines/enzymesap/Enzymesap.htm>).

1.2 Intérêt des études en phase gazeuse

La spectrométrie de masse est actuellement un outil très puissant pour étudier les peptides et protéines. Par exemple, elle est aujourd'hui couramment utilisée pour extraire la séquence d'acides aminés d'une protéine: il faut alors fragmenter celle-ci par des techniques de collisions avec des atomes de gaz (CID), de chauffage par absorption de rayonnement IR (IRMPD) ou encore de capture d'électron (ECD). Les fragments sont identifiés grâce à leur rapport masse sur charge ($\frac{m}{q}$), et le développement de spectromètres ayant des résolutions atteignant 9.10^5 (spectromètres à transformée de Fourier, voir chapitre « Techniques expérimentales » de ce manuscrit) permet aujourd'hui d'appliquer cette technique de façon routinière à de très grosses protéines.

D'un point de vue plus fondamental, les études en phase gazeuse sont idéales pour étudier les propriétés intrinsèques des systèmes d'intérêt biologique et pharmaceutique car elles permettent de s'affranchir des effets du solvant universel qui est l'eau. Elles permettent ainsi de distinguer les propriétés physico-chimiques des molécules ou complexes étudiés des effets dus au solvant. On peut alors s'intéresser, par exemple, à la dynamique et l'énergétique de fragmentation des ions par CID^{4,5} ou photodissociation UV⁶⁻¹⁰, ou chercher à comprendre le(s) mécanisme(s) de dissociation des espèces protonées par capture d'électron¹¹⁻¹⁵, une technique qui peut être une alternative à la CID pour le séquençage des protéines. Plus généralement, et toujours en employant la fragmentation des ions comme sonde, certains groupes se sont lancés dans l'étude de la réactivité des espèces chimiques en phase gazeuse¹⁶, ou du comportement des molécules organiques et de leurs agrégats après ionisation par collision avec des ions multichargés¹⁷. L'effet de la complexation avec une ou plusieurs molécules de solvant (souvent d'eau) sur diverses propriétés des molécules d'intérêt biologique a également été étudié par de nombreuses équipes¹⁸⁻²⁴. L'équipe de E. Williams s'intéresse également à ces complexes, mais s'en sert pour mesurer l'énergie de recombinaison d'un électron par un ion solvaté: cette méthode est nommée « nanocalorimétrie »²⁵. Les cations métalliques peuvent être toxiques ou utiles à l'organisme, selon leur nature et leur environnement. Il est donc intéressant d'étudier les interactions entre ces cations et des systèmes d'intérêt biologique en phase gazeuse²⁶⁻²⁹.

Parmi toutes ces études, un grand nombre concerne directement ou est relié à la structure 3D de ces systèmes. Selon les systèmes, différentes méthodes sont employées. Pour

les petites molécules ou complexes, c'est-à-dire ceux qui contiennent jusqu'à 50 atomes, la spectroscopie IR couplée aux calculs de chimie quantique est très puissante, surtout lorsqu'elle autorise une sélection des conformères présents dans l'expérience (voir chapitre « Techniques expérimentales »). Certains groupes utilisent la spectroscopie micro-onde, plus précise que la précédente mais limitée à des systèmes considérablement plus petits ^{24,30}. Lorsqu'on souhaite décrire la structure d'oligonucléotides, ou la structure secondaire, tertiaire ou quaternaire de protéines, les techniques souvent utilisées sont l'échange H/D ^{31,32}, l'ECD ^{33,34} et surtout la spectrométrie de mobilité ionique ³⁵⁻³⁸.

L'équipe AMIBES, dans laquelle a été effectué ce travail, se situe dans cette thématique puisqu'elle s'intéresse, depuis une dizaine d'années, aux caractéristiques structurales des systèmes d'intérêt biologique en phase gazeuse. Au début, les molécules étudiées étaient de petits modèles neutres de la liaison peptidique, comme la formamide, et la technique expérimentale utilisée était le détachement d'électrons induit par absorption de photons IR sur des anions dipolaires refroidis vibrationnellement ³⁹⁻⁴¹. Puis l'équipe a utilisé la dissociation par absorption résonante et multiple de photons IR (IRMPD, détaillée dans le chapitre « Techniques expérimentales ») pour interroger les vibrations d'ions moléculaires de plus grosse taille produits par électrospray et à température ambiante. Des calculs de chimie quantique ont permis, par comparaison avec les spectres IR ainsi mesurés, d'en déduire les conformères présents à 300 K pour des dipeptides et tripeptides ⁴²⁻⁴⁴, ainsi que des neurotransmetteurs ^{45,46}.

Récemment, nous avons montré par spectroscopie IRMPD que des structures particulières de brins de télomères humains (oligonucléotides situés à la fin des chromosomes), appelées quadruplexes de guanine, étaient conservées en phase gazeuse ⁴⁷. Ces systèmes sont de taille beaucoup plus élevée que les précédents, ce qui illustre la tendance générale des études de l'équipe: nous tentons d'obtenir, avec les mêmes outils que lors des travaux sur les petits peptides, des informations structurales sur des systèmes biologiquement plus pertinents. Dès lors que la taille du système augmente, de nouvelles problématiques apparaissent. En effet, même pour de petits systèmes, la résolution de l'IRMPD est limitée à cause du contour rotationnel important à 300 K. L'augmentation du nombre de transitions et de la diversité conformationnelle avec la taille du système laisse présager un élargissement des bandes qui, s'il est trop important, pourrait être un obstacle à l'interprétation des spectres. Celle-ci se basait jusqu'à maintenant sur des calculs de chimie quantique poussés qui demandent des capacités de calcul croissant très vite avec le nombre d'atomes dans la molécule, et donc deviennent rapidement irréalisables sur des ordinateurs de

bureau. Il faut donc penser à des solutions d'adaptation. De la même façon, le nombre de conformères d'un système flexible comme un brin de protéine est énorme, et se pose alors la question de la recherche des conformations les plus basses en énergie potentielle. Quelles méthodes sont les plus efficaces pour explorer la PES? Peut-on trouver le conformère d'énergie la plus basse, si oui comment et en combien de temps, et surtout cela a-t-il encore un sens? De plus, bien que la spectroscopie IRMPD soit puissante, une approche expérimentale combinant plusieurs techniques peut être fructueuse, c'est pourquoi nous l'avons testée en utilisant la spectrométrie de mobilité ionique, dont je parlerai tout au long de ce manuscrit, qui s'articulera en 5 parties principales. D'abord seront présentées les techniques expérimentales utilisées, puis je parlerai des méthodes de modélisation et plus particulièrement de la solution que nous avons choisie afin de pouvoir simuler les spectres IR des gros systèmes: la méthode QM/MM. Ensuite viendront les trois chapitres de résultats concernant l'étude structurale du peptide AGWLK protoné, la recherche et l'interprétation des signatures spectroscopiques de l'ajustement de la structure de la vancomycine induit par la présence du récepteur, et enfin les effets de l'état de protonation et du solvant dans lequel sont dilués des brins de la protéine amyloïde β sur leur structure secondaire. Je terminerai par la description du nouveau montage expérimental que nous avons commencé à monter pendant ma thèse. Ses principaux objectifs sont d'augmenter la résolution des spectres IR des espèces en phase gazeuse en les refroidissant vibrationnellement et de perturber le moins possible leur structure secondaire en utilisant une désorption sur microgouttelettes pour les mettre en phase gazeuse.

- (1) Ko, Y. J.; Wang, H.; Li, X.; Bowen, K. H.; Lecomte, F.; Desfrancois, C.; Pouilly, J.-C.; Grégoire, G.; Schermann, J. P. *ChemPhysChem* **2009**, *online preview*.
- (2) Fischer, E. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27*, 2985.
- (3) Koshland, D. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1958**, *44*, 98.
- (4) Cannon, W. R.; Taasevigen, D.; Baxter, D. J.; Laskin, J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*, 1625.
- (5) Madalinski, G.; Fournier, F.; Wind, F. L.; Afonso, C.; Tabet, J. C. *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *249*, 77.
- (6) Worm, E. S.; Andersen, I. H.; Andersen, J. U.; Holm, A. I. S.; Hvelplund, P.; Kadhane, U.; Nielsen, S. B.; Pouilly, J.-C.; Stochkel, K. *Physical Review A (Atomic, Molecular, and Optical Physics)* **2007**, *75*, 042709.
- (7) Sobolewski, A. L.; Domcke, W.; Dedonder-Lardeux, C.; Juvet, C. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*, 1093.
- (8) Kang, H.; Dedonder-Lardeux, C.; Juvet, C.; Gregoire, G.; Desfrancois, C.; Schermann, J. P.; Barat, M.; Fayeton, J. A. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 2417.
- (9) Gregoire, G.; Kang, H.; Dedonder-Lardeux, C.; Juvet, C.; Desfrancois, C.; Onidas, D.; Lepere, V.; Fayeton, J. A. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 122.
- (10) Antoine, R.; Broyer, M.; Chamot-Rooke, J.; Dedonder, C.; Desfrancois, C.; Dugourd, P.; Gregoire, G.; Juvet, C.; Onidas, D.; Poulain, P.; Tabarin, T.; van der Rest, G. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 1648.
- (11) Zubarev, R. A.; Haselmann, K. F.; Budnik, B.; Kjeldsen, F.; Jensen, F. *European Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *8*, 337.
- (12) Hvelplund, P.; Liu, B.; Nielsen, S. B.; Panja, S.; Pouilly, J.-C.; Stöckel, K. *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *263*, 66.
- (13) Ehlerding, A.; Jensen, C. S.; Wyer, J. A.; Holm, A. I. S.; Jorgensen, P.; Kadhane, U.; Larsen, M. K.; Panja, S.; Pouilly, J. C.; Worm, E. S.; Zettergren, H.; Hvelplund, P.; Nielsen, S. B. *International Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *282*, 21.
- (14) Chamot-Rooke, J.; Malosse, C.; Frison, G.; Turecek, F. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*, 2146.
- (15) Chakraborty, T.; Holm, A. I. S.; Hvelplund, P.; Nielsen, S. B.; Pouilly, J. C.; Worm, E. S.; Williams, E. R. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 1675.
- (16) van der Rest, G.; Mourgues, P.; Nedev, H.; Audier, H. E. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 5561.
- (17) Adoui, L.; Legendre, S.; Tarisien, M.; Cassimi, A.; Galassi, M. E.; Giglio, E.; Gervais, B. *Journal of Physics: Conference Series* **2007**, 012023.
- (18) Peteanu, L. A.; Levy, D. H. *Journal of Physical Chemistry* **1988**, *92*, 6554.
- (19) Carles, S.; Lecomte, F.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. *Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 10662.
- (20) Jockusch, R. A.; Lemoff, A. S.; Williams, E. R. *Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 10929.
- (21) Simons, J. P. *Comptes Rendus Chimie* **2003**, *6*, 17.
- (22) Balog, R.; Langer, J.; Gohlke, S.; Stano, M.; Abdoul-Carime, H.; Illenberger, E. *International Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *233*, 267.
- (23) Aviles Moreno, J. R.; Demaison, J.; Huet, T. R. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 10467.
- (24) Alonso, J. L.; Cocinero, E. J.; Lesarri, A.; Sanz, M. E.; Lopez, J. C. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 3471.
- (25) Donald, W. A.; Leib, R. D.; O'Brien, J. T.; Holm, A. I. S.; Williams, E. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 18102.
- (26) Salpin, J.-Y.; Guillaumont, S.; Tortajada, J.; Lamsabhi, A. M. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20*, 359.
- (27) Oomens, J.; Moore, D. T.; von Helden, G.; Meijer, G.; Dunbar, R. C. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 724.
- (28) Ai, H. Q.; Bu, Y. X.; Li, P.; Zhang, C. *New Journal of Chemistry* **2005**, *29*, 1540.
- (29) Rubina, A. Y.; Rubin, Y. V.; Sorokin, V. A.; Shukla, M. K.; Leszczynski, J. *Polish Journal of Chemistry* **2005**, *79*, 1873.
- (30) Aviles Moreno, J.-R.; Petitprez, D.; Huet, T. R. *Chemical Physics Letters* **2006**, *419*, 411.

- (31) Eghiaian, F.; Daubenfeld, T.; Quenet, Y.; van Audenhaege, M.; Bouin, A.-P.; van der Rest, G.; Grosclaude, J.; Rezaei, H. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 7414.
- (32) Gabelica, V.; Rosu, F.; Witt, M.; Baykut, G.; De Pauw, E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 201.
- (33) Breuker, K.; McLafferty, F. W. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 4911.
- (34) Zubarev, R. A.; Horn, D. M.; Fridriksson, E. K.; Kelleher, N. L.; Kruger, N. A.; Lewis, M. A.; Carpenter, B. K.; McLafferty, F. W. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 563.
- (35) Dugourd, P.; Hudgins, R. R.; Clemmer, D. E.; Jarrold, M. F. *Review of Scientific Instruments* **1997**, *68*, 1122.
- (36) Teplow, D. B.; Lazo, N. D.; Bitan, G.; Bernstein, S.; Wyttenbach, T.; Bowers, M. T.; Baumketner, A.; Shea, J. E.; Urbanc, B.; Cruz, L.; Borreguero, J.; Stanley, H. E. *Accounts of Chemical Research* **2006**, *39*, 635.
- (37) Clemmer, D. E.; Jarrold, M. F. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 577.
- (38) Kohtani, M.; Jones, T. C.; Sudha, R.; Jarrold, M. F. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 7193.
- (39) Seydou, M.; Modelli, A.; Lucas, B.; Konate, K.; Desfrancois, C.; Schermann, J. P. *European Physical Journal D* **2005**, *35*, 199.
- (40) Lecomte, F.; Lucas, B.; Gregoire, G.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. *European Physical Journal D* **2002**, *20*, 449.
- (41) Desfrancois, C.; Periquet, V.; Carles, S.; Schermann, J. P.; Adamowicz, L. *Chemical Physics* **1998**, *239*, 475.
- (42) Gregoire, G.; Gaigeot, M. P.; Marinica, D. C.; Lemaire, J.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. *Phys.Chem.Chem.Phys.* **2007**, *9*, 3082.
- (43) Lucas, B.; Gregoire, G.; Lemaire, J.; Maitre, P.; Glotin, F.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. *International Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *243*, 105.
- (44) Marinica, D. C.; Gregoire, G.; Desfrancois, C.; Schermann, J. P.; Borgis, D.; Gaigeot, M. P. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 8802.
- (45) Seydou, M.; Gillet, J. C.; Li, X.; Wang, H.; Posner, G. H.; Gregoire, G.; Schermann, J. P.; Bowen, K. H.; Desfrancois, C. *Chemical Physics Letters* **2007**, *449*, 286.
- (46) Seydou, M.; Gregoire, G.; Liquier, J.; Lemaire, J.; Lecomte, F.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 4187.
- (47) Gabelica, V.; Rosu, F.; De Pauw, E.; Lemaire, J.; Gillet, J.-C.; Pouilly, J.-C.; Lecomte, F.; Gregoire, G.; Schermann, J.-P.; Desfrancois, C. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 1810.

Chapitre II: Méthodes expérimentales pour l'étude structurale de molécules en phase gazeuse

II.1 La spectroscopie InfraRouge

1.1 Introduction

La spectroscopie Infrarouge (IR) existe depuis le 19^e siècle pour l'étude des molécules en phase liquide. C'est un outil utilisé de manière routinière en chimie pour connaître la structure d'une espèce moléculaire dont on ne possède que la formule brute. Des études complémentaires peuvent ensuite menées en spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Son principe est très simple: une source de rayonnement IR est placée devant une cuve où se trouve l'échantillon dilué, et un détecteur mesure le rayonnement absorbé par celui-ci pour chaque longueur d'onde. Après avoir retranché la contribution du solvant, on obtient le spectre IR de l'espèce en question, qui lui est propre. Ses caractéristiques spectrales permettent alors de l'identifier facilement. Lorsqu'on se met dans les conditions où le processus d'absorption est linéaire, c'est-à-dire qu'une molécule donnée ne peut absorber qu'un seul photon, l'intensité des bandes observées reflète directement la force d'oscillateur de la transition considérée. Pour qu'un mode de vibration soit actif en IR, il faut que son moment dipolaire change lorsque la molécule vibre. Généralement, les bandes sont intenses mais larges à cause des liaisons H fortes entre molécules étudiées et molécules de solvant. On peut distinguer des groupements différents car leurs modes de vibration n'ont pas la même fréquence. Lorsque les groupements des modes interrogés sont en liaison H ou ioniques avec d'autres, leur fréquence de vibration est modifiée. Par exemple, un mode d'élongation d'un groupement C=O qui est lié uniquement à des molécules de solvant possède une fréquence de vibration située autour de 1650 cm^{-1} (dans l'eau). Lorsqu'il est lié de façon intra- ou intermoléculaire, cette fréquence se déplace vers le bleu, c'est-à-dire les hautes fréquences. C'est pourquoi la spectroscopie IR donne des informations de structure.

Lorsqu'on veut étudier la structure de systèmes en phase gazeuse par spectroscopie IR, plusieurs problèmes se posent: premièrement, la densité de l'échantillon n'est pas assez grande pour pouvoir mesurer directement l'absorption à travers celui-ci, il faut donc contourner le problème et détecter l'absorption autrement. Ensuite, le dispositif expérimental est beaucoup plus complexe et coûteux, il nécessite une source de molécules en phase gazeuse, une enceinte à vide, et souvent un spectromètre de masse. Enfin, un rapport signal/bruit suffisant

est nécessaire pour limiter le temps d'acquisition, c'est pourquoi on utilise des lasers comme source de lumière IR, pour avoir une densité de photons élevée.

Dans ce chapitre, je présenterai la technique de spectroscopie laser IR de dissociation par absorption résonante multi-photonique (IRMPD) dont nous nous sommes servis, et je dirai quelques mots des autres méthodes les plus utilisées à l'heure actuelle: les spectroscopies de détachement d'électron et UV/IR.

1.2 La spectroscopie IRMPD

a) Principe

Comme son nom l'indique, l'IRMPD est un processus qui met en jeu l'absorption de plusieurs photons. En effet, l'absorption d'un rayonnement de longueur d'onde donnée par une molécule est détectée par la fragmentation de celle-ci. Or l'énergie d'un photon IR n'est que de l'ordre de 2000 cm^{-1} , c'est-à-dire quelques centaines de meV, soit un ordre de grandeur en deçà de l'énergie de liaison d'une liaison covalente, qui est de l'ordre de quelques eV. Une molécule doit donc absorber une dizaine de photons IR, voire plus, pour dépasser la limite de dissociation. Cependant, ces photons ne peuvent être absorbés de manière résonante par un même mode de vibration: la réduction de l'écart entre les niveaux vibrationnels à mesure que l'on augmente le nombre quantique de vibration ν l'empêche, l'anharmonicité étant responsable de cet effet. A température ambiante, l'énergie interne d'un ion biomoléculaire comme [RGD+H⁺] est de l'ordre de 0,6 eV. A l'équilibre, les différents modes de vibration sont peuplés selon une distribution de Maxwell-Boltzmann à la température considérée, ici 300 K, ce qui veut dire que la grande majorité des modes auxquels nous nous intéressons, situés entre 1000 et 2000 cm^{-1} , sont dans leur état vibrationnel fondamental (voir Figure 1). Le processus de fragmentation est le suivant: un photon IR est absorbé lorsque sa fréquence est en résonance avec une transition entre les niveaux vibrationnels $\nu = 0$ et $\nu = 1$ d'un mode de vibration de la molécule. Le système est alors hors d'équilibre. L'énergie de ce photon est ensuite redistribuée parmi les modes de plus basse fréquence par redistribution intramoléculaire vibrationnelle (IVR), ce phénomène étant dû au couplage anharmonique entre les modes de vibration. L'IVR est « complet » lorsque la distribution des modes en fonction de l'énergie est de type Maxwell-Boltzmann, c'est-à-dire lorsque le système est de nouveau à l'équilibre. Pour des petites molécules où certains modes sont très peu couplés aux autres, cela peut ne jamais être le cas, mais *a priori* pas pour nos systèmes qui contiennent de nombreux degrés de liberté. La durée de l'IVR est variable et diminue fortement lorsque la

taille du système et la densité de modes à une énergie donnée augmentent. Lienau *et al.* ont mesuré une durée de 50 ps pour un complexe neutre n-hexane/trans-stilbène (46 atomes) avec une énergie interne de 300 cm^{-1} . Ils estiment que la densité de modes à cette énergie dépasse 100 par cm^{-1} .

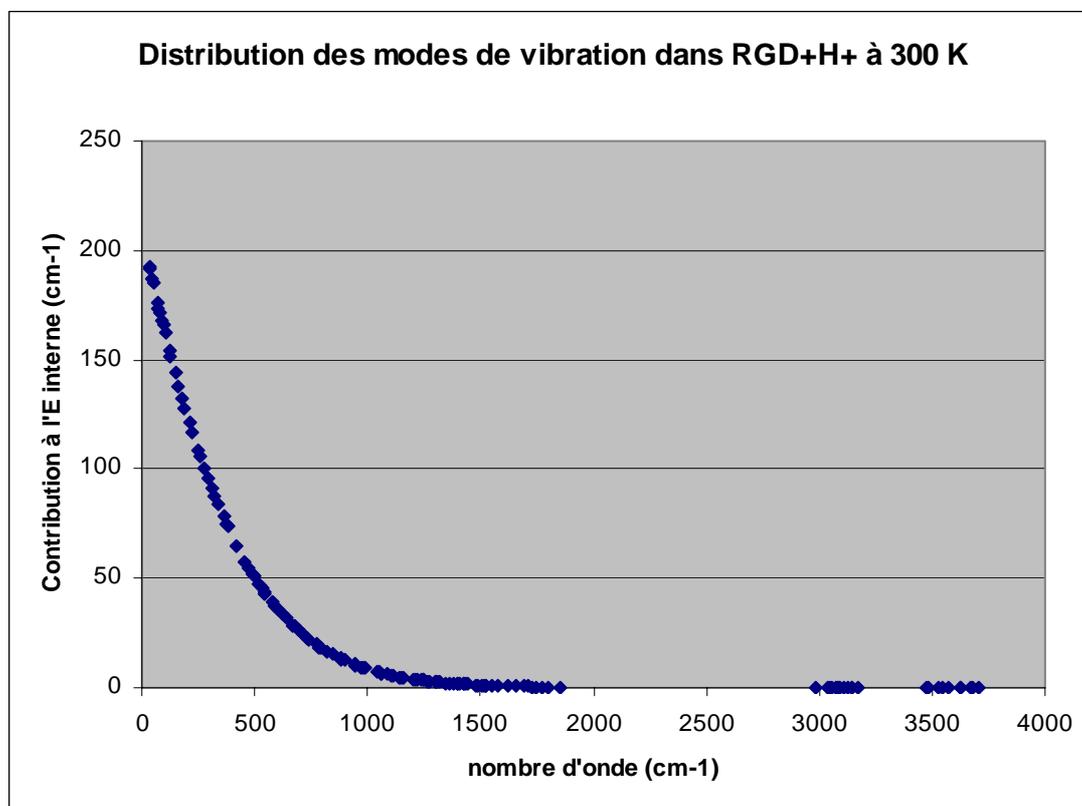


Figure 1: distribution des modes de vibration de l'ion $[\text{RGD}+\text{H}^+]$ à 300 K. La formule utilisée est tirée d'une publication de J. U. Andersen *et al.* ².

Lorsque le mode ayant absorbé le photon IR est revenu à l'état vibrationnel fondamental, il peut absorber un nouveau photon, *mais l'énergie du premier photon est conservée par le système*, la répétition du processus peut donc aboutir au dépassement de la limite de dissociation du système. Celle-ci correspond généralement à l'énergie requise pour activer la voie de fragmentation de plus basse énergie. Le processus est donc purement statistique et les *différents modes* excités donneront naissance aux *mêmes fragments*. Il faut cependant garder à l'esprit que si la densité de photons augmente, des voies de fragmentation de plus haute énergie peuvent être ouvertes, ce qui montre que l'absorption d'un nombre important de photons peut être plus rapide que la fragmentation ³. Les spectres de masse des fragments obtenus en IRMPD sont donc similaires à ceux obtenus par dissociation induite par collision (CID). Ceci est totalement différent du cas de la fragmentation induite par capture

d'électrons, qui est connue pour être plus rapide que l'IVR⁴. A noter également qu'il s'agit ici d'un processus d'absorption multi-photonique *séquentiel*, et donc linéaire au moins au premier ordre (hors saturation), et non pas d'un processus hautement non-linéaire comme lors de l'absorption de plusieurs photons simultanément.

Le profil temporel d'intensité d'un laser à électrons libres, comme celui que nous avons utilisé, est extrêmement bien adapté à l'IRMPD car c'est une succession de macro-impulsions de quelques microsecondes de large, composées elles-mêmes de micro-impulsions de quelques picosecondes séparées par quelques nanosecondes: un photon IR peut être absorbé à chaque micro-impulsion car l'IVR a le temps de s'achever entre deux d'entre elles (voir Figure 2). Il est important de noter que l'augmentation de l'énergie interne par absorption de photons IR augmente la densité d'états dans un intervalle d'énergie donné, et donc réduit l'écart entre les niveaux vibrationnels d'un mode de vibration donné. On pourrait donc s'attendre à ce que l'absorption soit inhibée après un certain nombre de photons, mais jusqu'à présent le problème ne s'est pas posé pour les nombreux systèmes que nous avons étudiés. Pour expliquer ceci, J. Oomens *et al.* avancent que l'IVR étant rapide dans les grosses molécules, les bandes sont élargies, et lorsque cet élargissement dépasse l'écart entre deux niveaux, on se trouve dans un quasi-continuum de niveaux vibrationnels³.

Une autre conséquence de la nature multi-photonique de l'IRMPD est le possible décalage vers le rouge des bandes par rapport à leur position en absorption linéaire. En effet, lorsque deux transitions sont proches, celle de plus basse fréquence peut gagner en intensité par rapport à l'autre grâce à l'anharmonicité. En effet, après absorption d'un ou plusieurs photons, l'énergie interne augmente et les niveaux vibrationnels se rapprochent, la transition de plus haute fréquence peut donc devenir résonante avec le laser IR fixé à la fréquence la plus basse. Oomens *et al.* ont observé cet effet dans des hydrocarbures aromatiques, pour des bandes séparées d'environ 10-20 cm⁻¹^{5,6}.

Il est important de noter que pour l'étude de complexes non-covalents, la voie de dissociation la plus basse est la rupture des liaisons entre deux molécules du complexe. L'ordre de grandeur de l'énergie de liaison des complexes récepteur/ligand étant de quelques centaines de meV, quelques photons (parfois un seul) suffisent à induire la fragmentation, et la non-linéarité est ainsi réduite. Par contre, dans le cas d'ions moléculaires, les intensités relatives des transitions ne suivent pas celles prédites par les simulations de spectres d'absorption IR. Il existe notamment des effets de seuils qui sont à l'origine de l'absence de certaines bandes, par exemple le mode d'élongation C=O lorsque le groupement est libre,

c'est-à-dire n'est pas lié par interaction électrostatique ou liaison H. La force d'oscillateur de cette transition est plus faible que dans le cas d'un groupement lié, et les modes d'élongation des groupements C=O sont moins couplés que les autres modes, aboutissant à un IVR plus long, et donc une absorption séquentielle moins efficace.

Même si des réarrangements et des ruptures de liaisons non-covalentes peuvent intervenir après absorption de quelques photons mais *avant* fragmentation et donc détection (dans le cas d'une molécule), la première absorption qui conditionne les suivantes est déterminée par la structure initiale du système. C'est ce qui est extrêmement important et qui permet d'obtenir des informations structurales. Ainsi, on peut distinguer non seulement les différents groupements chimiques constitutifs du système, mais également les mêmes groupements selon leur environnement. Par exemple, un mode d'élongation C=O libre de toute interaction a une fréquence d'environ 1800 cm^{-1} s'il fait partie d'un groupement COOH, mais se décale autour de 1750 cm^{-1} pour un groupement C=O d'une liaison amide. Celle-ci peut être fortement décalée vers le rouge (les basse fréquences) lorsque le groupement C=O est engagé dans une liaison H (jusqu'à plus de 100 cm^{-1} dans le cas d'un groupement chargé positivement engagé dans une liaison H linéaire, voir par exemple le cas du conformère C2 du peptide [AGWLK+H⁺] dans le chapitre « Résultats » de ce travail). Mais une interaction électrostatique sans liaison H modifie également la fréquence de vibration du mode d'élongation du groupe C=O, comme l'a montré le travail de M. Seydou lors de sa thèse au sein de notre équipe. Plus la charge est proche, et plus l'angle entre la liaison C=O et la charge est proche de 180° , plus le déplacement est grand. Une charge positive induit un déplacement vers le rouge si elle est devant l'oxygène, vers le bleu (les hautes fréquences) si elle est derrière (*cf.* Figure 3). C'est le contraire pour une charge négative. Il semble que le comportement des modes de pliage soit similaire ; en effet, la fréquence de vibration du mode de pliage d'une liaison NH se décale vers les plus hautes fréquences si le groupe est en liaison H linéaire, ou si la liaison NH « pointe » vers une charge négative.

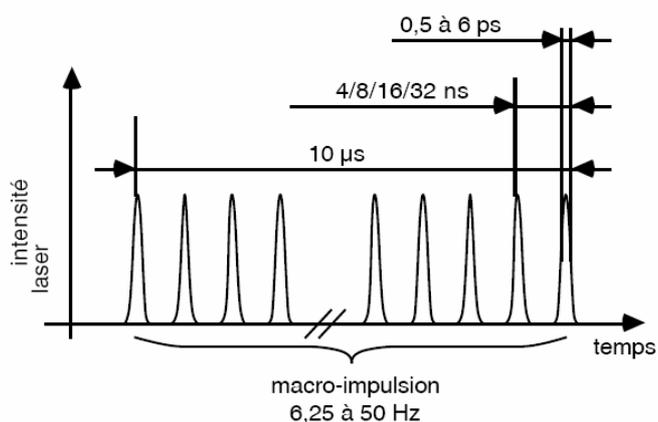


Figure 2: séquence temporelle du laser à électrons libre CLIO. Les pics gaussiens représentent les micro-impulsions.

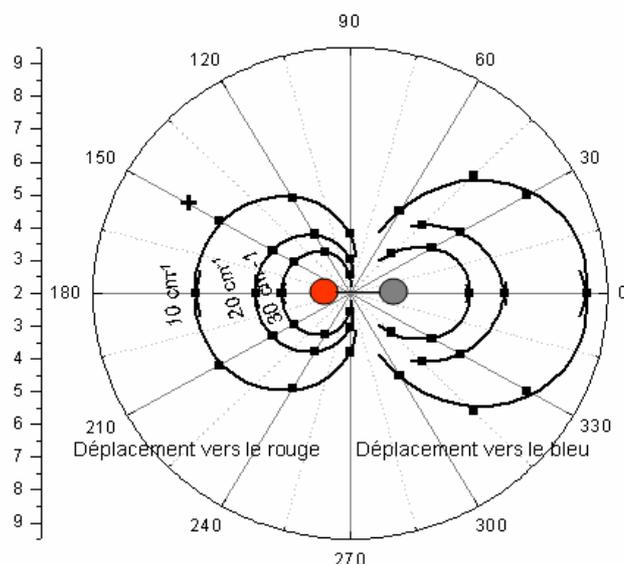


Figure 3: courbe d'iso-déplacement de la fréquence de vibration du mode d'élongation d'une groupe C=O (le carbone est représenté en gris, l'oxygène en rouge) induit par la présence d'une charge positive ponctuelle. (Figure tirée de la thèse de M. Seydou, 2007)

b) Description des dispositifs expérimentaux

Dans le paragraphe précédent, j'ai insisté sur le fait qu'il est nécessaire aux ions moléculaires d'absorber plusieurs dizaines de photons IR pour fragmenter, et que l'on puisse ainsi obtenir un spectre d'absorption IRMPD. Nous avons donc besoin d'une densité de photons élevée, et les seules sources de lumière qui offrent cette caractéristique aux longueurs d'onde qui nous intéressent sont les lasers à électrons libre entre 1000 et 2000 cm^{-1} , et les

lasers OPO entre 3000 et 4000 cm^{-1} (cf. chapitre « Sources d'espèces biomoléculaires en phase gazeuse »). Nous avons la chance d'avoir près du laboratoire un laser à électrons libre appelé CLIO, et situé à l'Université Paris 11 d'Orsay. Tous les spectres IRMPD présentés dans cette thèse ont été obtenus avec ce laser.

Dans la pratique, l'IRMPD est une spectroscopie d'action. En effet, on se place dans un régime où l'on sélectionne en masse l'espèce voulue (ion parent) et on détecte la baisse du signal apparaissant à son rapport masse/charge, en même temps que l'apparition de fragments lorsque le laser est réglé sur la fréquence d'une transition du système. La grandeur mesurée est donc un taux de fragmentation, noté $k(E)$ pour une énergie interne E donnée. On a alors, dans le cas d'une dissociation statistique unimoléculaire:

$$\frac{F}{F + P} = 1 - \exp(-k(E)t)$$

avec F la somme des ions fragments et P le nombre d'ions parents. Comme le temps d'irradiation est constant, il suffit alors de tracer la quantité $-\ln(1 - \frac{F}{F + P})$ (qui est proportionnelle à $k(E)$) en fonction de la longueur d'onde du laser pour obtenir un spectre ⁷.

En toute rigueur, il faudrait également considérer le détachement d'électron de l'ion parent induit par l'absorption de photons IR. Cependant, aucun dispositif n'est prévu pour détecter ces électrons, nous n'avons donc pas tenu compte de ce phénomène. Pour ne pas saturer les bandes, on prend soin de ne pas perdre tout le signal de l'ion parent, en réglant l'intensité du laser et le temps d'exposition dans ce but. On balaye ensuite la longueur d'onde du laser régulièrement par pas d'environ 5 cm^{-1} pour obtenir un spectre. Je vais détailler brièvement les dispositifs expérimentaux que nous avons utilisés au sein du Laboratoire de Chimie Physique à Orsay.

• *Le laser à électrons libre CLIO*

La lumière d'un laser à électrons libre est obtenue en faisant passer des électrons accélérés à des énergies de 10 à 50 MeV dans des dispositifs appelés « onduleurs ». Ceux-ci sont constitués d'aimants placés les uns à la suite des autres, et les polarisations de deux aimants successifs sont antiparallèles. L'onduleur est placé dans une cavité laser, ce qui a pour effet de stocker les photons émis par les électrons, et ces photons interagissent avec les

électrons pour augmenter la cohérence et l'intensité du rayonnement IR. La Figure 4 illustre ce fonctionnement.

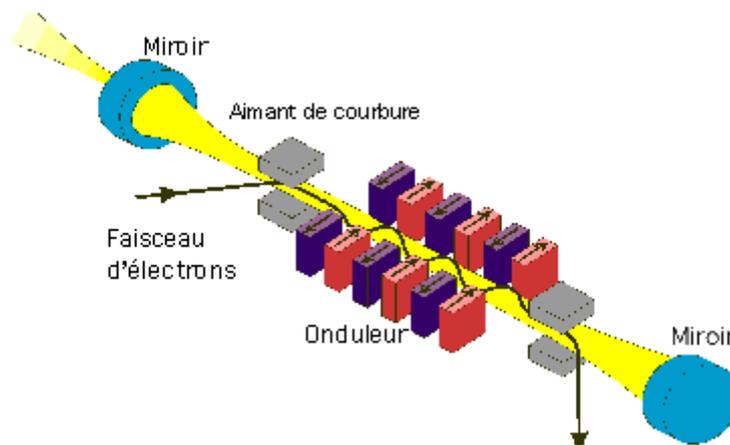


Figure 4: schéma de la cavité du laser à électrons libre CLIO. (Figure tirée du site http://www.lcp.u-psud.fr/rubrique.php3?id_rubrique=194)

Le laser CLIO possède une structure temporelle typique des lasers à électrons libres: il s'agit de macro-impulsions de lumière de 8 μs de long, délivrés à la fréquence de 25 Hz. Chaque macro-impulsion est composée d'environ 500 micro-impulsions de quelques picosecondes, séparées par 16 ns. L'énergie moyenne par micro-impulsion est d'environ 60 μJ , celle par macro-impulsion est de 30 mJ. La longueur d'onde du laser peut être balayée de 5 à plus de 100 μm , mais il faut changer l'énergie des électrons. La gamme qui nous intéresse est celle allant de 1000 à 1850 cm^{-1} , pour celle-ci les électrons sont accélérés à 50 MeV. L'énergie du laser est d'environ 300 mW à 1000 cm^{-1} , et augmente jusqu'à 1 W autour de 1500 cm^{-1} , puis diminue, rendant obligatoire une normalisation des intensités des spectres. La résolution du laser est de l'ordre de $\frac{\Delta\nu}{\nu} = 0,01$, ce qui, dans la région spectrale qui nous intéresse, se traduit par environ 15 cm^{-1} .

• *Le piège à ions*

Pour générer et stocker les ions en phase gazeuse, nous avons utilisé un spectromètre commercial Esquire (Brüker). Il s'agit d'une source électrospray classique couplée à un piège à ions quadrupolaire qui permet de stocker les ions et les sélectionner en masse. La résolution en masse est de l'ordre de quelques milliers, ce qui est suffisant pour les espèces que nous avons étudiées. Un schéma du piège est donné dans la Figure 5. Il est composé de deux

électrodes placées au même potentiel, une d'entrée et une de sortie (en violet dans la Figure 2), et d'une troisième électrode annulaire (en orange) dont la différence de potentiel avec les deux premières est la somme d'une composante continue et d'une composante radiofréquence. Le champ radiofréquence est indispensable au stockage, les ions décrivant une trajectoire à l'intérieur d'une sphère de rayon r qui augmente avec le rapport $\frac{m}{q}$ de l'ion (m est la masse, q la charge). L'électrode annulaire a été percée pour laisser passer le laser IR. Entre chaque micro-impulsion, les ions sont thermalisés par un bain d'hélium d'environ 1 mbar à température ambiante. Les ions ayant absorbé des photons mais pas assez pour fragmenter perdent ainsi leur excédent d'énergie et retrouvent une distribution des niveaux vibrationnels de Maxwell-Boltzmann, c'est-à-dire que l'état fondamental est majoritairement peuplé. La sélection en masse se fait en excitant, grâce au champ radiofréquence, les ions de rapport $\frac{m}{q}$ différents de celui qui nous intéresse. Une fois que l'on a stocké celui-ci, on peut envoyer le laser CLIO qui induit la dissociation statistique des ions si la fréquence du laser est en résonance avec un mode de vibration de l'ion. On détecte alors les fragments pour en déduire le taux de fragmentation.

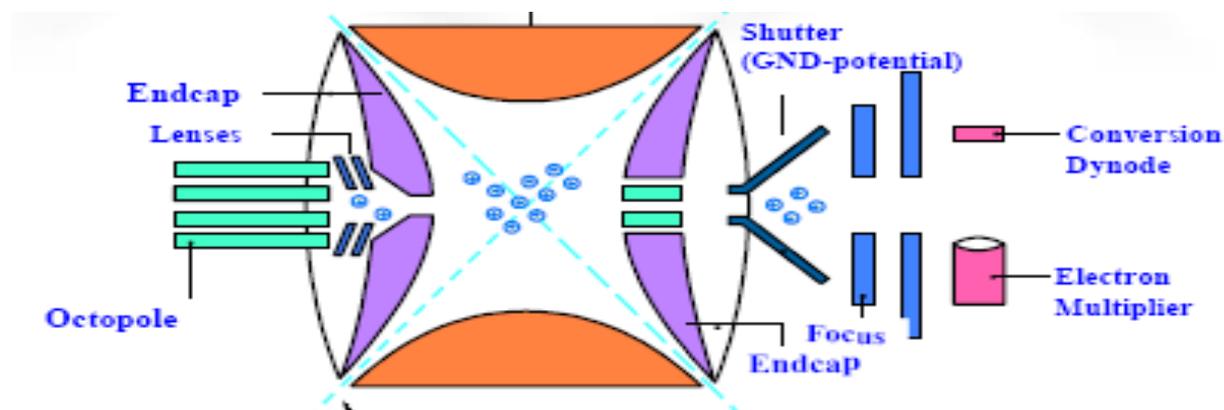


Figure 5: schéma du piège à ions de type Esquire installé sur le spectromètre Brüker.

• *Le spectromètre à transformée de Fourier*

La spectroscopie IRMPD peut également être effectuée avec un spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique par transformée de Fourier (FT-ICR) dans lequel les ions sont stockés par le champ magnétique d'un aimant de 7 T. Leur mouvement cyclotron est un

cercle autour de l'axe du champ magnétique, de rayon proportionnel à leur rapport $\frac{m}{q}$ et de fréquence inversement proportionnelle à ce même rapport. Le paquet d'ions passe à travers une électrode en forme d'anneau, et le signal détecté en fonction du temps, qui est une somme de fréquences correspondant aux différents ions présents, est converti en signal en fonction de la fréquence, donc en spectre de masse, par transformée de Fourier. La résolution que l'on peut atteindre est très grande, et celle de l'appareil est de l'ordre de 30000 pour un tripeptide. Cela permet de séparer les isotopes des ions, et donc de savoir l'état de charge de celui-ci. En effet, la différence entre deux isotopes d'un même ion est 1 Da dans le cas d'un ion monochargé, mais $\frac{1}{q}$ pour un état de charge q . L'intérêt est surtout de distinguer les cas d'un monomère monochargé d'un dimère doublement chargé qui apparaissent au même rapport $\frac{m}{q}$.

L'inconvénient avec ce spectromètre est que le recouvrement entre le laser et le paquet d'ions est moins bon que dans le cas du piège à ions, la dépopulation nécessite donc plus de macro-impulsions. De plus, les molécules atteignent l'équilibre thermique avec le rayonnement de corps noir des parois de la cellule du spectromètre bien plus lentement que par collisions avec les atomes d'hélium, le contour rotationnel dans le cas du spectromètre à transformée de Fourier est donc plus large.

1.3 La spectroscopie de détachement d'électrons

Lorsque les espèces à étudier sont trop fortement liées pour qu'un signal suffisant apparaisse en IRMPD, on peut utiliser un autre type de spectroscopie basée sur une astuce: au lieu de détecter les fragments de la dissociation de l'ion, c'est l'électron qui est détaché après absorption du rayonnement IR et dont on mesure le signal. C'est une technique idéale pour étudier les anions contenant un électron célibataire, car son énergie de liaison est plus faible que celle d'une liaison covalente⁸. Dans le cas des espèces déprotonées, son énergie de liaison est comparable à celle d'une liaison covalente, mais on peut obtenir un signal lorsque les voies de fragmentation les plus basses en énergie ne sont pas accessibles énergétiquement ou entropiquement, ou lorsque la taille de la molécule est trop petite pour que l'IVR soit assez rapide pour permettre une absorption séquentielle efficace^{9,10}. On peut aussi appliquer cette

méthode à certaines molécules neutres dont le potentiel d'ionisation est plus faible que l'énergie de dissociation de la première voie de fragmentation ¹¹. Dans tous les cas, il faut détecter l'électron détaché de manière efficace, on peut pour ce faire utiliser une bouteille magnétique dont les lignes de champ guident les électrons jusqu'à un détecteur de type MCP (Micro Channel Plate) ou channeltron ^{12,13}. Une autre alternative est la technique de l'accepteur d'électron, par exemple une molécule neutre ayant une forte affinité électronique comme SF₆ ou CCl₄. Récemment, J. D. Steill et J. Oomens ont mesuré le spectre IRMPD de petites espèces déprotonées, le benzoate, l'acétate, et le propionate, ce qui était inédit pour les deux dernières ¹⁴. L'intérêt était d'étudier l'influence de l'environnement chimique sur la fréquence de vibration des modes d'élongation du groupe carboxylate. Leur montage expérimental est très similaire à celui décrit dans le paragraphe précédent, et ils injectent du SF₆ gazeux à une pression de l'ordre de 10⁻⁷ mbar dans la cellule du FT-ICR. Le taux de détachement est obtenu à partir du rapport entre le signal de l'ion SF₆⁻ et la somme entre celui-ci et celui de l'ion parent.

1.4 La spectroscopie UV/IR

La technique la plus puissante en terme de résolution est à ce jour la spectroscopie avec absorption de plusieurs photons de différentes longueurs d'onde, souvent UV et IR. Le principe est le suivant: on envoie un laser UV sur des molécules neutres en phase gazeuse, celles-ci absorbent plusieurs photons de manière cohérente et sont ionisées si la fréquence du laser est réglée sur une transition électronique adaptée. On envoie ensuite ces ions dans un spectromètre de masse où ils sont discriminés selon leur rapport $\frac{m}{q}$, et on a ainsi un signal d'ions. Le spectre UV de la molécule peut ainsi être mesuré. Comme les transitions électroniques sont différentes selon la structure, les multiples conformères, s'ils sont présents et si la résolution du laser est suffisante, peuvent être discriminés à travers différents pics du spectre UV. Pour obtenir le spectre IR d'un conformère en particulier, on fixe la fréquence du laser UV sur une de ses transitions électroniques et on envoie un second laser, cette fois accordable dans une gamme de l'IR, sur les molécules neutres juste avant que le laser UV ionisant arrive. Elles vont alors absorber ce rayonnement IR, mais uniquement lorsque sa fréquence est résonante avec celle d'un mode de vibration de la molécule. L'état vibrationnel fondamental est ainsi dépeuplé et le laser UV, qui arrive après, ionise moins de molécules, d'où la chute du signal d'ions. On peut alors obtenir le spectre IR des différents conformères

d'une espèce neutre en balayant la longueur d'onde du laser IR. Souvent, cette technique est associée à un refroidissement ro-vibrationnel des molécules dans un jet supersonique pour assurer une bonne sélectivité de la spectroscopie UV. La mise en phase gazeuse est alors assurée par chauffage dans un four situé en amont de la vanne produisant le jet ou par désorption laser sur un substrat solide ou liquide situé juste devant cette même vanne. La contrainte majeure de cette technique de double spectroscopie IR/UV est que les espèces doivent posséder un groupement chimique absorbant la lumière UV (un chromophore). On ne peut donc étudier que les acides aminés aromatiques et les peptides qui en contiennent au moins un. Le groupe de J. Simons a ainsi exploré le paysage conformationnel de petites molécules et de complexes d'intérêt biologique ¹⁵ ainsi que des acides aminés phénylalanine ¹⁶ et tryptophane ¹⁷. M. de Vries et son équipe ont également fourni un travail important sur l'étude des états électroniques excités et des tautomères des bases de l'ADN comme la guanine ^{18,19} ou la cytosine ²⁰. Ils ont également exploré la complexation entre deux bases complémentaires (Adénine + Thymine et Guanine + Cytosine) en phase gazeuse ²¹. On doit également citer les travaux de l'équipe de M. Mons, à Saclay, sur la compétition entre structures locale et secondaire dans les petits peptides neutres protégés aux extrémités ²²⁻²⁵.

Une variante de cette technique expérimentale est la spectroscopie UV/IR d'ions. Le principe est le même mais le problème réside dans la nécessité d'ioniser les molécules à étudier *avant* de les refroidir ro-vibrationnellement. Dans le cas d'espèces d'intérêt biologique, il faut de plus les dénaturer le moins possible, on doit donc utiliser une source d'ions où la mise en phase gazeuse est très douce. Le spectre IR est également mesuré à partir de la dépopulation du signal d'ions de rapport $\frac{m}{q}$ voulu, mais le laser UV a pour effet de fragmenter les ions après excitation électronique. Le groupe de T. Rizzo à Lausanne utilise une source électrospray couplée à un piège à ions refroidi à l'hélium liquide, ce qui permet de thermaliser les ions à environ 10 K ²⁶. Nous sommes en train de monter au laboratoire une nouvelle expérience sur le même principe mais avec une source d'ions à désorption laser sur micro-gouttelettes de DMSO. Ce développement expérimental est détaillé dans le paragraphe 3 du chapitre VIII.

II.2 La spectrométrie de mobilité ionique

2.1 Introduction

La spectrométrie de mobilité ionique a connu un intense développement depuis une dizaine d'années. L'idée de base de la technique est très simple et se rapproche beaucoup de la chromatographie en phase gazeuse: il s'agit de distinguer les conformations d'un même ion moléculaire en le faisant passer dans un tube contenant un gaz rare à une pression de quelques millibars. Plus une conformation est étendue, plus elle est ralentie par collision sur les atomes de gaz rare, et plus elle mettra de temps à traverser celui-ci. Ce temps de mobilité est la grandeur physique mesurée directement en mobilité ionique. Des modèles théoriques permettent alors de relier ce temps à la section efficace de collision du système, c'est-à-dire indirectement à sa structure. Les conformations étendues ont une section efficace de collision plus grande que les conformations repliées. Des isomères de constitution, c'est-à-dire ayant la même formule brute, donc la même masse, mais des structures de Lewis différentes, ont pu ainsi être séparés ²⁷. La mobilité ionique est également capable, notamment grâce au développement d'appareils de haute résolution ²⁸, de distinguer les énantiomères d'une large gamme de composés chiraux d'intérêt pharmaceutique ou biologique ²⁹. Une des premières démonstrations de la puissance de cette technique, pour distinguer différentes structures secondaires de protéines entières isolées, a été fournie en 1995 par l'équipe de M. Jarrold sur le cytochrome C ³⁰. Par la suite, une multitude de groupes ont choisi la mobilité ionique pour étudier les structures et interactions de molécules ou complexes d'intérêt biologique, la plupart avec l'aide de la spectrométrie de masse ³¹⁻³³.

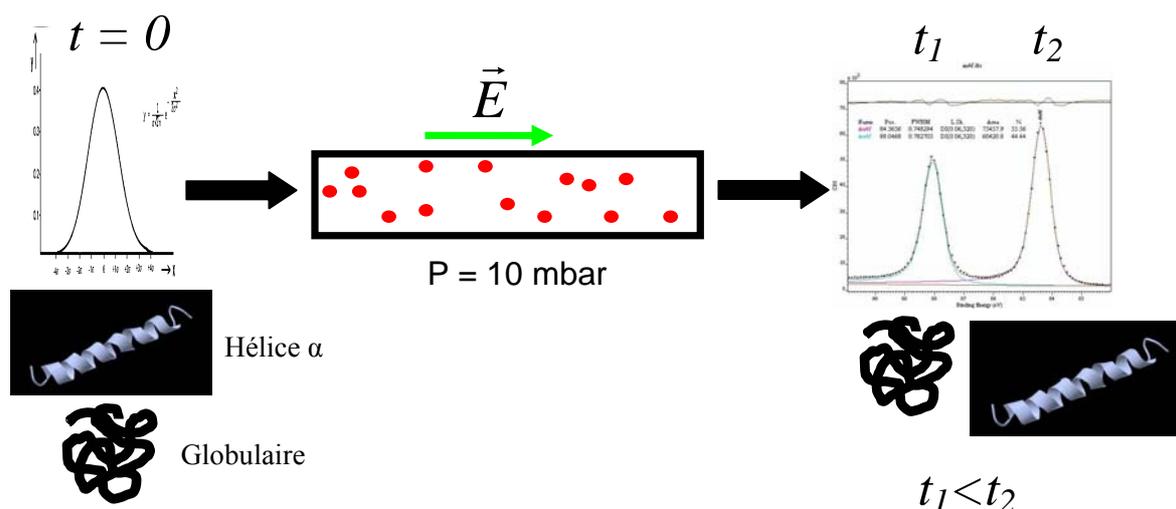


Figure 6: illustration du principe de la spectrométrie de mobilité ionique à travers l'exemple de deux structures secondaires d'un polypeptide: l'hélice α et la forme globulaire.

Nous avons donc utilisé la spectrométrie de mobilité ionique, comme technique complémentaire de la spectroscopie IR, afin d'obtenir des informations structurales sur des systèmes moléculaires en phase gazeuse.

2.2 Description du montage expérimental

Tous les spectres expérimentaux de mobilité ionique présentés dans cette thèse ont été obtenus au LASIM (Université Lyon 1), en collaboration avec l'équipe de P. Dugourd, et particulièrement R. Ballivian. Je vais, dans cette partie, détailler le montage présent au LASIM.

Les molécules à étudier sont guidées de l'entrée à la sortie du tube de mobilité par un champ électrique de plusieurs centaines de Volts par mètre, ce qui impose que les espèces soient chargées. Une source d'ions de type électrospray est placée avant le tube de mobilité, et des optiques ioniques sont nécessaires afin de guider les ions jusqu'à celui-ci. Cependant, la pression étant plus grande que dans un spectromètre de masse, on ne peut pas utiliser de simples lentilles électrostatiques créant des champs statiques à cause des collisions trop fréquentes. Il faut alors recourir à des « funnels » d'ions. Un funnel est constitué d'une série de lentilles électrostatiques séparées par une distance de l'ordre du millimètre, et dont le diamètre baisse linéairement pour focaliser les ions. On applique des tensions sur celles-ci qui créent un champ électrique radiofréquence avec une composante continue qui guide les ions

vers la sortie du funnel. Le champ radiofréquence sert à compenser les déviations dues aux collisions entre atomes de gaz rare et molécules.

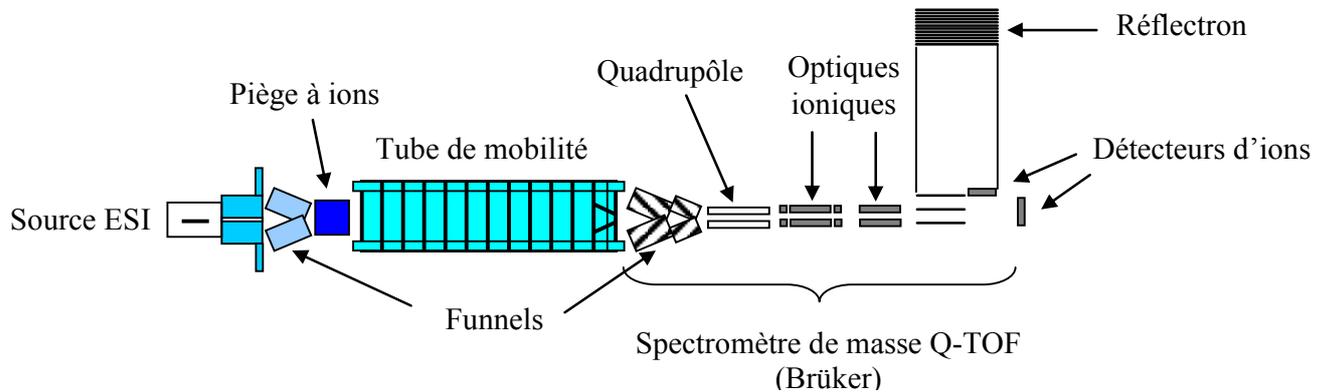


Figure 7: schéma du montage de mobilité ionique du LASIM.

Afin d'avoir un repère temporel pour mesurer le temps de mobilité des ions à étudier, il faut former un paquet d'ions et le stocker avant de l'envoyer dans le tube. C'est le rôle du piège circulaire, composé de trois électrodes: une d'entrée et une de sortie, toutes deux en forme de plaques percées, et une autre en forme d'anneau. Cette dernière est située entre les deux autres, et est portée à un potentiel radiofréquence, ce qui permet de stocker les ions avant de les envoyer dans le tube. Le paquet d'ions est envoyé par une impulsion de 1 ms dans le tube de mobilité de longueur 99 cm, où règne un champ électrique constant créé par 100 électrodes circulaires équidistantes. Sa valeur est d'environ 800 V.m^{-1} . Pour un ion chargé 5 fois par exemple, l'énergie cinétique acquise est de 4.10^3 eV . Si sa masse est de $3261,5 \text{ g.mol}^{-1}$ (brin amyloïde β 1-28), sa vitesse sera d'environ 1500 m.s^{-1} , et il traverserait donc le tube en 0,7 ms si celui-ci était sous un vide suffisant pour que le libre parcours moyen des ions soient supérieur à 1 m. En réalité, la pression est de l'ordre de 10 mbar, et le temps de mobilité est de l'ordre de 60 ms. A la sortie du tube est placé un spectromètre de masse à temps de vol de type microQ-TOF (Bruker). Celui-ci est composé d'un double funnel, d'un hexapôle, d'un quadripôle, d'une cellule de collision et d'un réflectron. Sa résolution en masse est de l'ordre

$$\text{de } \frac{m}{\Delta m} = 15000.$$

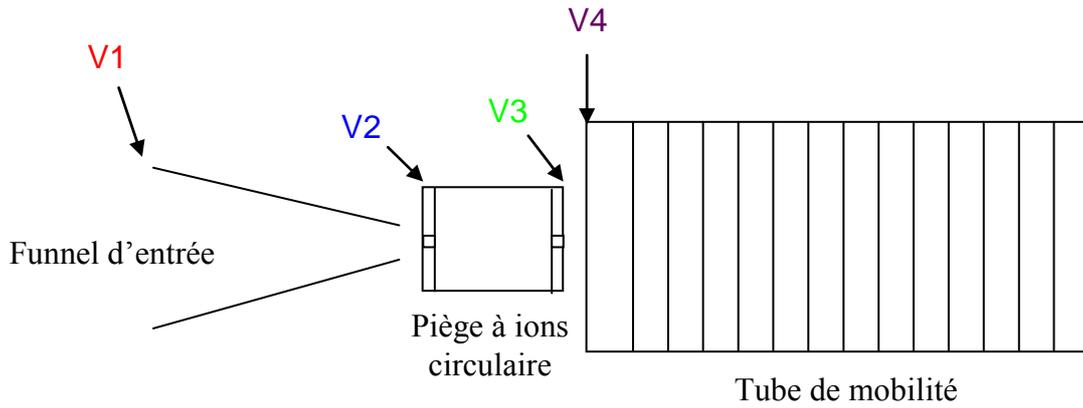


Figure 8: schéma des potentiels appliqués aux éléments importants pour l'envoi du paquet d'ions dans le tube de mobilité.

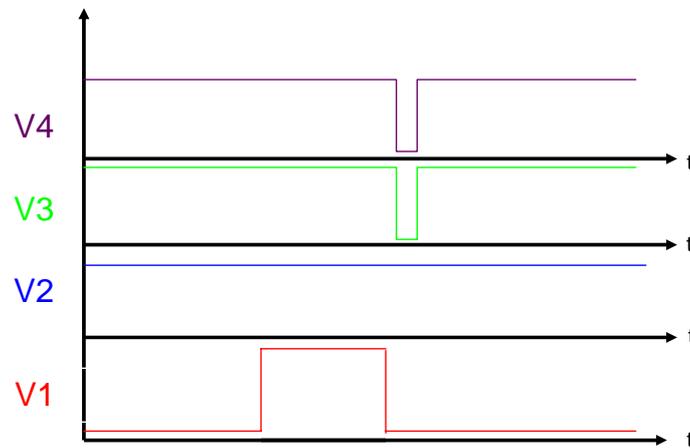


Figure 9: schéma de la séquence temporelle typique employée pour l'envoi du paquet d'ions.

Pour bien comprendre comment les ions sont injectés dans le tube, il faut regarder de plus près la séquence temporelle de quatre potentiels importants (cf. Figure 8 et Figure 9). Celui de l'entrée du piège annulaire (V2 dans la Figure 9) est toujours à la même valeur de façon à laisser passer les ions, et c'est V1, le potentiel appliqué au funnel d'entrée, qui régule le remplissage du piège: on met une différence de potentiels par rapport à V2 lorsqu'on veut bloquer les ions, et on les laisse passer pendant quelques dizaines de millisecondes juste avant de les injecter dans le tube. Enfin, le potentiel de sortie du piège annulaire V3 et celui d'entrée du tube de mobilité V4 suivent la même séquence: ils sont au même potentiel que V2 la majeure partie du temps pour piéger les ions, et abaissés pendant la durée d'injection, qui est de l'ordre de la milliseconde. La résolution de la mesure dépend de cette durée d'injection dans le tube par rapport au temps de dérive et de la diffusion des molécules dans le gaz rare,

qui dépend des conditions de l'expérience (Température T , Pression P). Pour un temps d'injection de 1 ms et un temps de dérive de 50 ms, la résolution théorique sur la section efficace de collision Ω est donnée par $\frac{\Omega}{\Delta\Omega}$ et est d'environ 50.

La grandeur physique intéressante ici est la section efficace de collision, qui contient l'information sur la conformation de l'ion moléculaire étudié. A partir du seul temps de mobilité, on peut remonter à cette grandeur. La vitesse moyenne de mobilité v_m dans le tube est définie par la relation suivante:

$$v_m = KE$$

où K est une grandeur appelée « mobilité », caractéristique de l'ion, et E est l'amplitude du champ électrique moyen vu par l'ion, que l'on suppose égal au champ appliqué sur les électrodes du tube de mobilité, car la pression est de l'ordre de 10 mbar et la constante diélectrique proche de 1. On peut donc écrire:

$$\frac{l}{t_d} = KE$$

avec l la longueur du tube et t_d le temps de dérive dans celui-ci, d'où:

$$t_d = \frac{l}{KE}$$

Comme c'est la grandeur K qui contient l'information sur la structure de l'ion, il faut donc mesurer t_d . Or nous n'avons pas accès expérimentalement directement à t_d car nous mesurons le temps qui s'écoule entre le moment où les ions sont injectés dans le tube et le moment où ils sont détectés dans le spectromètre de masse. Il existe un « temps mort » correspondant au temps de parcours entre la sortie du tube et la détection. Une seule mesure de temps de dérive ne suffit donc pas pour extraire la section efficace de collision d'une espèce: il faut recommencer l'opération pour plusieurs valeurs du champ électrique afin de tracer une droite de calibration (temps de dérive en fonction de l'inverse du champ électrique). De cette droite, on peut déduire la constante de mobilité et, en mesurant l'ordonnée à l'origine, avoir ce temps mort, qu'il faut retrancher au temps de dérive mesuré pour obtenir le temps de dérive dans le tube. L'expression de K en fonction de la section efficace de collision est alors:

$$K = \frac{\sqrt{18\pi}}{16} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{m_G} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{qe}{\sqrt{kT\Omega N}}$$

avec m la masse de l'ion, m_G la masse d'un atome du gaz rare contenu dans le tube, q la charge de l'ion, e la charge élémentaire, k la constante de Boltzmann, N la densité du gaz, Ω la section efficace de collision moyenne et T la température effective. Cette dernière est calculée comme suit:

$$T = T_G + \frac{m_G v_m^2}{3k}$$

avec T_G la température du gaz rare dans le tube, mesurée et constante dans l'expérience. La correction apportée sur cette température est petite, elle prend en compte l'effet du déplacement de l'ion dans le tube. Ces expressions viennent de la théorie de Viehland et Mason sur les propriétés de transport des ions moléculaires à travers un gaz³⁴. Cette théorie attribue une température différente aux ions et aux atomes de gaz.

On mesure l'intensité du signal en fonction du temps de mobilité, mais on peut convertir l'abscisse de ce spectre en section efficace et en déduire ainsi le nombre de conformations présentes à partir de la résolution théorique. Si le pic obtenu est aussi fin que l'autorise la résolution, alors une seule conformation contribue à celui-ci.

II.3 Conclusion du chapitre

La présentation des différentes techniques expérimentales dont j'ai tiré les résultats présentés dans ce manuscrit a été effectuée dans ce chapitre. Les principes physiques qui sous-tendent la spectrométrie de mobilité ionique et la spectroscopie IRMPD ont été exposés, ainsi que la description précise des montages expérimentaux que j'ai utilisés. J'ai également parlé brièvement des avantages et inconvénients de deux autres techniques connues de spectroscopie IR, le détachement d'électrons et la spectroscopie UV/IR.

- (1) Lienau, C.; Heikal, A. A.; Zewail, A. H. *Chemical Physics* **1993**, *175*, 171.
- (2) Andersen, J. U.; Bonderup, E.; Hansen, K. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 6518.
- (3) Oomens, J.; Sartakov, B. G.; Meijer, G.; von Helden, G. *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *254*, 1.
- (4) Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 3265.
- (5) Oomens, J.; Tielens, A. G. G. M.; Sartakov, B. G.; Helden, G. v.; Meijer, G. *The Astrophysical Journal* **2003**, *591*, 968.
- (6) Oomens, J.; Bakker, J. M.; Sartakov, B. G.; Meijer, G.; von Helden, G. *Chemical Physics Letters* **2003**, *367*, 576.
- (7) Lucas, B.; Gregoire, G.; Lemaire, J.; Maitre, P.; Glotin, F.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. *International Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *243*, 105.
- (8) Neumark, D. M.; Lykke, K. R.; Andersen, T.; Lineberger, W. C. *The Journal of Chemical Physics* **1985**, *83*, 4364.
- (9) Wight, C. A.; Beauchamp, J. L. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 6499.
- (10) Rosenfeld, R. N.; Jasinski, J. M.; Brauman, J. I. *The Journal of Chemical Physics* **1979**, *71*, 1030.
- (11) von Helden, G.; van Heijnsbergen, D.; Meijer, G. *The Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 1671.
- (12) Luder, C.; Meiwes-Broer, K. H. *Chemical Physics Letters* **1998**, *294*, 391.
- (13) Rijs, A. M.; Backus, E. H. G.; de Lange, C. A.; Westwood, N. P. C.; Janssen, M. H. M. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **2000**, *112*, 151.
- (14) Steill, J. D.; Oomens, J. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 4941.
- (15) Graham, R. J.; Kroemer, R. T.; Mons, M.; Robertson, E. G.; Snoek, L. C.; Simons, J. P. *The Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 9706.
- (16) Snoek, L. C.; Robertson, E. G.; Kroemer, R. T.; Simons, J. P. *Chemical Physics Letters* **2000**, *321*, 49.
- (17) Snoek, L. C.; Kroemer, R. T.; Hockridge, M. R.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, *3*, 1819.
- (18) Nir, E.; Grace, L.; Brauer, B.; de Vries, M. S. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 4896.
- (19) Nir, E.; Janzen, C.; Imhof, P.; Kleinermanns, K.; de Vries, M. S. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 4604.
- (20) Nir, E.; Muller, M.; Grace, L. I.; de Vries, M. S. *Chemical Physics Letters* **2002**, *355*, 59.
- (21) Nir, E.; Kleinermanns, K.; de Vries, M. S. *Nature* **2000**, *408*, 949.
- (22) Chin, W.; Mons, M.; Dognon, J. P.; Piuze, F.; Tardivel, B.; Dimicoli, I. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 2700.
- (23) Chin, W.; Piuze, F.; Dimicoli, I.; Mons, M. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 1033.
- (24) Chin, W.; Piuze, F.; Dognon, J.-P.; Dimicoli, I.; Tardivel, B.; Mons, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 11900.
- (25) Chin, W.; Piuze, F.; Dognon, J. P.; Dimicoli, I.; Mons, M. *Journal of Chemical Physics* **2005**, *123*.
- (26) Stearns, J. A.; Boyarkin, O. V.; Rizzo, T. R. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 13820.
- (27) Wu, C.; Siems, W. F.; Klasmeier, J.; Hill, H. H. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 391.
- (28) Dugourd, P.; Hudgins, R. R.; Clemmer, D. E.; Jarrold, M. F. *Review of Scientific Instruments* **1997**, *68*, 1122.
- (29) Dwivedi, P.; Wu, C.; Matz, L. M.; Clowers, B. H.; Siems, W. F.; Hill, H. H. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 8200.
- (30) Clemmer, D. E.; Hudgins, R. R.; Jarrold, M. F. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 10141.
- (31) McLean, J. A.; Ruotolo, B. T.; Gillig, K. J.; Russell, D. H. *International Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *240*, 301.
- (32) Rosu, F.; De Pauw, E.; Gabelica, V. *Biochimie* **2008**, *90*, 1074.
- (33) Lee, S.; Wyttenbach, T.; Bowers, M. T. *International Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *167*, 605.
- (34) Mason, E. A. a. E. W. M. **1988**.

Chapitre III: Méthodes utilisées pour la modélisation

III.1 Introduction

L'usage de logiciels informatiques permettant de calculer des propriétés d'atomes, de molécules ou de complexes liés de manière non-covalente est très répandu à l'heure actuelle, aussi bien en recherche privée que dans le milieu académique, et dans des domaines très variés, tels la physique, la chimie, l'astronomie ou la pharmacologie. La structure et les fréquences de vibration d'une molécule isolée ou solvatée, ou son moment dipolaire, sont des données pouvant être calculées par une variété de méthodes allant des champs de forces utilisant des potentiels inter-atomiques empiriques jusqu'à des méthodes de chimie quantique *ab initio* extrêmement élaborées qui sont fondées sur la résolution de l'équation de Schrödinger. Dans cette thèse, j'ai eu recours à de nombreux programmes utilisant ces différentes méthodes, et je vais dans cette partie en détailler le fonctionnement.

Pour conclure ce chapitre, je présenterai l'évaluation d'une méthode qui permet de prédire les spectres IR de systèmes de tailles plus importantes que celles qui ont été jusqu'à maintenant étudiées par notre équipe. Le problème qui se pose aux expérimentateurs est en effet le suivant. Une fois que le spectre infrarouge d'un système moléculaire a été enregistré expérimentalement, son interprétation repose sur la simulation de ce spectre. Pour cela, nous recherchons les différentes conformations possibles de la molécule et nous simulons les spectres infrarouges de chacune des conformations que nous supposons avoir été présentes lors de l'expérience. Les calculs étant nécessairement approchés, nous sommes à la recherche de méthodes minimisant les erreurs de prédiction afin de pouvoir attribuer de façon la plus fiable possible le spectre expérimental aux configurations moléculaires présentes.

III.2 La recherche de conformations

Lors d'une étude de spectroscopie infrarouge (IR) portant sur un système en phase gazeuse qui n'a pas été caractérisé auparavant, on ne peut pas *a priori* connaître la conformation spatiale, sauf dans des cas très simples où le système n'est composé que de quelques atomes, et il est donc nécessaire en général de faire une recherche conformationnelle. Plusieurs solutions s'offrent alors. La plus simple est de construire le système et d'en explorer de façon systématique la surface d'énergie potentielle (PES) pour en déterminer les minima (conformations d'équilibre) avec un programme de modélisation

moléculaire. Cette solution n'est efficace et rapide que pour de « petits systèmes » au regard de la recherche de conformations, c'est-à-dire ne contenant qu'un tout petit nombre d'angles dièdres fondamentaux pour la structure. Lorsque le système en contient trop pour une recherche « manuelle », il faut utiliser des méthodes plus élaborées qui requièrent un logiciel informatique. L'approche s'effectue en plusieurs étapes successives avec une première exploration aussi extensive que possible de la surface d'énergie potentielle avec un niveau de représentation grossier, suivie de raffinements de plus en plus élaborés. La première étape utilise souvent des champs de forces pour calculer l'énergie potentielle des structures et parfois optimiser leurs géométries. Je vais détailler le fonctionnement de ceux que j'ai utilisés.

2.1 Les champs de forces

a) Introduction

On appelle « champ de forces » une expression analytique empirique de l'énergie potentielle interatomique dont les paramètres sont ajustés pour reproduire une série de données expérimentales et/ou obtenues par des méthodes de chimie quantique. Un champ de forces réduit pratiquement le système moléculaire à un ensemble de sphères dures (atomes) reliées par des ressorts. L'énergie potentielle est une somme de termes décrivant les interactions covalentes et non-covalentes:

$$E = E_{liaison} + E_{angle} + E_{torsion} + E_{vdW} + E_{electrostatique} + E_H$$

où $E_{liaison}$ est l'énergie de liaison covalente entre les atomes, E_{angle} l'énergie associée aux angles formés par deux liaisons consécutives, $E_{torsion}$ celle associée aux angles de torsion, E_{vdW} est l'énergie des interactions non-covalentes de van der Waals, $E_{electrostatique}$ est l'énergie des interactions électrostatiques, et E_H celle des liaisons hydrogène. On effectue une minimisation locale de l'énergie autour des minima, appelée aussi « optimisation de géométrie », ce qui permet de trouver les conformations de plus basse énergie d'un système moléculaire. A partir de l'énergie potentielle, les structures d'équilibres ainsi que d'autres grandeurs physiques peuvent également être obtenues, telles les fréquences et intensités de vibration IR (absorption) et Raman (diffusion).

Il existe un nombre conséquent de champs de forces différents: par exemple, AMBER et CHARMM ont été paramétrés pour des molécules d'intérêt biologique. Par contre, MMFF

a été conçu pour être transférable à une large gamme de composés, afin d'être utilisé en recherche pharmaceutique (en anglais « drug design »), où un nombre très grand de molécules différentes doit être testé pour déterminer celle qui possède la plus grande affinité avec le récepteur ciblé. Comme nos thèmes de recherche s'orientent vers l'étude de complexes moléculaires d'intérêt pharmaceutiques, j'ai utilisé en majorité ce champ de force dans mes recherches de conformations. L'énorme avantage des techniques de modélisation par champ de forces est leur très faible demande de mémoire et de puissance informatique et, du coup, leur rapidité de calcul. L'optimisation de géométrie d'un tripeptide prend quelques minutes tout au plus, et peut être effectuée avec un ordinateur de bureau classique. Cependant, la précision et la fiabilité du calcul de l'énergie potentielle en champ de forces sont limitées, il convient donc d'être prudent lors de la discrimination en énergie des structures potentiellement présentes dans nos expériences. Le paragraphe suivant a pour but d'établir le degré de confiance pouvant être accordé aux calculs d'énergie sur des systèmes chargés d'intérêt biologique.

b) Etude des énergies relatives de différents conformères d'un ion moléculaire selon la méthode de calcul

Les surfaces d'énergie potentielle calculées par différentes méthodes, parfois même avec différentes bases et la même méthode quantique (*cf.* paragraphe III.4), sont rarement identiques, et possèdent même parfois des minima locaux différents. Il est alors important de savoir si les champs de forces permettent de classer correctement différents conformères d'un même système selon leur énergie potentielle. Une étude récente ¹ indique que MMFF est parmi les meilleurs champs de forces pour décrire les interactions non-covalentes, en prédisant par exemple à 10 kJ.mol⁻¹ près les énergies de liaison de complexes de la base de données JSCH-2005 de l'équipe de P. Hobza ². J'ai donc évalué l'erreur faite par le champ de forces MMFF, que j'ai largement utilisé dans ma thèse, sur le calcul de différents minima de la PES d'une molécule d'intérêt biologique. J'ai choisi le peptide déprotoné [D-Ala-D-Ala – H⁺] car la petite taille de celui-ci autorise des calculs au niveau MP2/6-31g(d). J'ai donc considéré que cette méthode *ab initio* donne les résultats les plus fiables, et je me suis basé sur ceux-ci pour évaluer les performances du champ de forces MMFF.

Une recherche de conformations effectuée avec celui-ci donne 22 conformères situés entre 0 et 42 kJ.mol⁻¹ (intervalle arbitraire) par rapport à la conformation de plus basse

énergie. Les problèmes sur lesquels je me suis penché sont: les structures données par le champ de forces sont-elles les mêmes que celles obtenues après optimisation avec une méthode de chimie quantique ; à partir de quel niveau de calcul l'ordre relatif des conformères en énergie potentielle est-il fiable ; et enfin quel intervalle d'énergie doit-on prendre en compte lors d'une recherche de conformation en champ de forces? Pour cela, j'ai optimisé les structures de chacun des 22 conformères issus de la recherche au niveau MMFF successivement avec les méthodes AM1, B3LYP/3-21g(d), B3LYP/6-31g(d) et MP2/6-31g(d). Les énergies minimisées de tous les conformères sont regroupées dans le Tableau 1.

Tableau 1: comparaison des énergies potentielles des conformères du peptide déprotoné [D-Ala-D-Ala – H⁺] calculées après optimisation à différents niveaux de calcul. Les conformères de plus basse énergie sont mis en valeur en caractères gras.

Conformation	Energie MMFF (kJ.mol ⁻¹)	Energie AM1 (kJ.mol ⁻¹)	Energie B3LYP/3-21g(d) (kJ.mol ⁻¹)	Energie B3LYP/6-31g(d) (kJ.mol ⁻¹)	Energie MP2/6-31g(d) (kJ.mol ⁻¹)
1	0,0	11,3	0,0	0,0	0,0
2	0,3	3,4	3,3	0,0	0,0
3	2,7	5,1	5,4	4,6	3,9
4	2,9	2,4	5,4	4,6	3,9
5	8,0	2,1	11,0	11,0	9,4
6	9,5	0,0	13,7	16,8	16,3
7	10,8	12,6	9,9	0,0	0,0
8	12,2	11,3	0,0	0,0	0,0
9	18,2	5,0	5,4	4,6	3,9
10	19,4	7,4	16,6	13,4	13,3
11	20,1	12,6	9,9	0,0	0,0
12	20,6	5,3	32,9	16,5	11,3
13	22,0	3,4	3,3	0,0	0,0
14	22,8	0,0	13,7	16,8	16,3
15	24,5	3,4	3,3	0,0	0,0

16	27,4	0,0	13,7	16,8	16,3
17	29,7	5,0	5,4	4,6	3,9
18	32,9	4,2	16,6	13,4	13,3
19	39,0	4,2	16,6	13,4	13,3
20	39,0	22,3	48,4	51,5	46,4
21	39,9	22,0	43,8	44,9	39,7
22	41,5	7,8	44,4	36,5	36,5

Une précision importante est que les conformères ayant la même énergie *pour un même niveau de calcul* ont également la même structure. Par contre, le conformère possédant l'énergie potentielle la plus basse n'a pas forcément la même structure selon le niveau de calcul: par exemple, ils sont différents pour MMFF, AM1 et B3LYP/3-21g(d), mais il reste identique pour les méthodes B3LYP et MP2. La seconde observation que l'on peut faire est que le nombre de conformations distinctes lorsqu'on augmente le niveau de calcul diminue, on passe ainsi de 22 conformères en MMFF à 9 avec la méthode MP2. Cela veut dire que la surface d'énergie potentielle est très différente selon les méthodes de calcul, et surtout qu'elle contient plus de minima locaux en champ de forces qu'avec un traitement *ab initio*, environ deux fois plus pour MMFF qu'avec la méthode MP2 d'après cette étude. Cette tendance a été également observée par H. Valdes *et al.* dans leur investigation de la PES du tripeptide neutre GFA isolé ³. Ensuite, on peut noter que les énergies relatives changent beaucoup, les conformères sont notamment distribués de manière à peu près homogène de 0 à 42 kJ.mol⁻¹ au niveau MMFF, alors qu'au niveau MP2 on a clairement un intervalle vide entre 16,3 et 36,5 kJ.mol⁻¹. Un résultat important est que les énergies relatives calculées avec le champ de force MMFF sont plus proches de celles calculées avec la méthode MP2 qu'avec AM1. Ceci peut paraître surprenant car un niveau de calcul semi-empirique est censé reproduire de manière plus précise les calculs *ab initio*. Un autre point en faveur du champ de forces MMFF est que la structure du conformère d'énergie minimale est plus proche de celui obtenu par DFT et MP2 que la conformation la plus basse en énergie trouvée en AM1. On peut également constater que les énergies relatives sont presque constantes lorsqu'on passe de B3LYP à MP2 en gardant la base 6-31g(d), excepté pour le conformère 12, qui subit un changement de structure stabilisant. Le nombre de conformations distinctes reste également le même. On peut donc en conclure que le niveau de calcul minimal donnant l'ordre relatif correct en énergie est B3LYP/6-31g(d), pour le peptide considéré. Cependant, il faut insister sur le fait que ce n'est

généralement pas valable, surtout pour les peptides dont l'énergie de dispersion (interaction entre dipôles induits) est non-négligeable devant les autres interactions. C'est notamment le cas dans les acides aminés dont la chaîne latérale possède un groupement aromatique, comme le tryptophane, la phénylalanine, et la tyrosine, et les peptides les contenant, et dans les espèces neutres dans lesquelles les interactions électrostatiques sont plus faibles que dans les ions. Un bon exemple est le tripeptide neutre FGG étudié par les équipes de P. Hobza et M. de Vries ⁴.

Concernant l'intervalle à prendre lors d'une recherche de conformations avec le champ de forces MMFF, on peut estimer celui-ci en remarquant que la conformation 18 a une énergie potentielle de 32,9 kJ.mol⁻¹ au-dessus du minimum en champ de forces, alors qu'elle tombe à 13,3 kJ.mol⁻¹ au niveau de calcul MP2/6-31g(d), sans changer fondamentalement de structure. On peut donc estimer que le champ de force MMFF fait une erreur d'environ 20 kJ.mol⁻¹ sur la prédiction de l'énergie potentielle par rapport à MP2. L'erreur relative ne varie pas avec la taille du système, mais en absolu on peut s'attendre à une augmentation et, comme je me suis intéressé dans cette thèse à des molécules et complexes d'une taille plusieurs fois supérieure à [D-Ala-D-Ala – H⁺], j'ai décidé de prendre un intervalle de 84 kJ.mol⁻¹ (20 kcal.mol⁻¹) au-delà duquel les conformères ne sont pas retenus dans les recherches de conformations.

2.2 Les méthodes implémentées dans MacroModel

Le programme MacroModel que j'ai utilisé, développé par la société Schrödinger, permet de choisir parmi plusieurs méthodes de recherche de conformations d'équilibre: la recherche par torsion systématique des angles dièdres (en anglais « Systematic Pseudo Monte-Carlo torsional sampling » (SPMC) ⁵), la recherche Monte-Carlo qui est très utilisée (en anglais « Monte-Carlo Multiple Minimum » (MCMM) ⁶), ou encore des méthodes plus récentes telle que celle fondée sur les modes de basses fréquences ⁷. Je n'ai utilisé que la première, étant donné que la méthode MCMM, bien que rapide et efficace dans certains cas, est connue pour rester confinée dans une région limitée de l'espace configurationnel, lorsque le nombre d'angles dièdres devient supérieur à 15 ⁸.

La méthode de recherche systématique SPMC consiste, à partir d'une conformation initiale quelconque du système, à définir les angles dièdres à utiliser, puis à régler les paramètres suivants:

- nombre d'angles,

- nombre de conformations à générer,
- domaine d'énergie dans lequel les conformations uniques seront sauvegardées,
- nombre total de conformations à sauvegarder,
- méthode de discrimination des conformations uniques,
- nombre d'itérations pour l'optimisation de géométrie,
- méthode d'optimisation de géométrie.

Le principe de la méthode est le suivant: à partir d'une structure de départ choisie arbitrairement, un premier angle dièdre retenu est modifié de 120°, générant en cela la conformation n°1 optimisée grâce à la méthode d'optimisation (je n'ai employé que celle de Polak et Ribière ⁹) et au champ de forces choisis. Celle-ci effectue le nombre d'itérations prévu, l'énergie potentielle est calculée, et la boucle recommence, jusqu'à ce que tous les angles aient été modifiés de 360 ° par pas de 120°. Le programme recommence alors en modifiant l'angle dièdre de départ, mais cette fois-ci de 60 ° (donc avec une résolution deux fois plus importante), et ainsi de suite. L'étape faisant l'originalité et l'efficacité de MacroModel est que chaque structure après optimisation de géométrie est comparée avec celles déjà sauvegardées. Si tous les critères choisis au début par l'utilisateur sont remplis (énergie, conformation unique), la structure est mémorisée. La durée d'une recherche typique dépend de plusieurs facteurs, notamment du nombre d'atomes du système, d'itérations pour l'optimisation de géométrie, et de conformations à générer par le programme. Sur l'ordinateur de bureau que j'ai utilisé, ces durées ont varié de deux minutes pour 500 conformations du dipeptide protoné [AA+H⁺] jusqu'à une dizaine d'heures pour 40000 conformations de l'amyloïde β 1-28 avec 500 itérations de minimisation. Nous pouvons suivre le déroulement de la recherche, notamment connaître l'énergie de chaque structure générée (calculée avec le champ de forces choisi), si celle-ci a été sauvegardée et sinon, pourquoi (identique à une structure déjà sauvegardée, trop haute en énergie...). Nous pouvons donc savoir à quel moment une recherche de conformation peut être stoppée: ceci peut être effectué lorsque la majorité des nouvelles conformations générées est rejetée. Nous affichons les conformations sauvegardées grâce au logiciel Maestro. Ce dernier est une interface graphique très puissante qui permet d'utiliser facilement les logiciels développés par Schrödinger, comme Macromodel.

Macromodel trouve souvent plusieurs centaines, voire des milliers de conformations de plus basse énergie potentielle, même si on se fixe un intervalle de 80 kJ/mol au-delà duquel

on ne retient plus les structures calculées. Cet intervalle, assez arbitraire, est là pour rejeter des conformations qui ont fort peu de chance d'être présentes dans nos expériences, et notamment celles dans lesquelles on utilise un moyen de refroidissement vibrationnel et rotationnel des molécules, comme par exemple dans une trappe à azote ou hélium liquide, ou encore un jet supersonique (dont les principes sont détaillés dans le chapitre II de ce manuscrit). Le problème principal est que le calcul de l'énergie des différents minima n'est absolument pas fiable, en valeur absolue ou relative, lorsqu'elle est calculée à partir d'un champ de forces. On doit donc recalculer la structure et l'énergie de chacune des conformations à un niveau beaucoup plus élevé, avec par exemple, la fonctionnelle de la densité (DFT), la méthode de Möller-Plesset (MP2), ou la méthode « Complete Active Space Self-Consistent Field » (CASSCF). Or de tels calculs ne sont réalisables que pour des systèmes de quelques dizaines d'atomes, comme par exemple la 2-pyridone (*cf.* Annexe 3). Dès que l'on veut traiter une molécule d'intérêt biologique de taille plus conséquente, ces méthodes prennent des temps extrêmement longs, même en employant des moyens de calculs puissants. Thomas Rizzo et ses collaborateurs ont étudié un pentapeptide protoné contenant 100 atomes en optimisant toutes les conformations trouvées dans un intervalle d'énergie donné avec la méthode B3LYP (DFT), avec des résultats plutôt satisfaisants ¹⁰. Cependant, la possibilité pour qu'il existe des conformations plus stables que celle d'énergie la plus basse qu'ils ont trouvée n'est pas à exclure...

Dans le cadre de cette thèse, la plupart des systèmes étudiés l'ont été dans des expériences d'IRMPD où les ions sont soumis à l'irradiation laser à température ambiante et ne sont pas sélectionnés en isomère. Parler d'une structure unique n'a donc, en toute rigueur, pas de sens. Il est plus raisonnable de décrire le système en parlant de « familles » de conformations ayant des caractères communs importants et ne différant que par des détails. Par exemple, pour un peptide, une famille peut être définie comme une structure du squelette, par exemple en structure secondaire hélice alpha (*cf.* Figure 1), et les différences résident alors dans l'orientation des chaînes latérales. Le but du traitement post-recherche est, dans ce cas-là, de distinguer les principales familles caractéristiques du système et de les classer en énergie. J'ai utilisé pour cela deux méthodes, le regroupement de conformations et le tri par propriétés moléculaires.

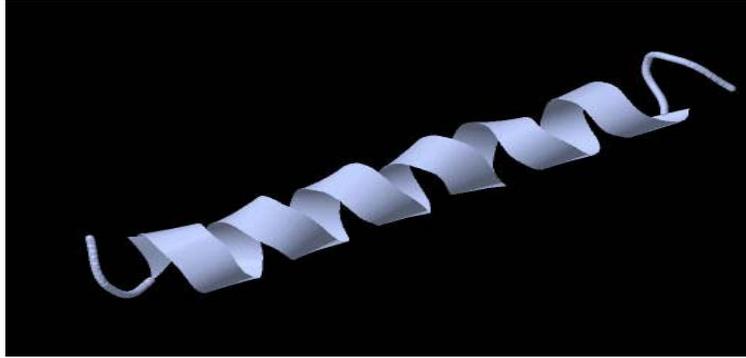


Figure 1: structure secondaire en hélice alpha (seule la chaîne peptidique est représentée par un ruban) du peptide amyloïde β 1-28 (code PDB 1amb).

- Le regroupement de conformations.

Voici le principe de cette méthode. Au départ, chaque structure constitue un groupe. On a donc n groupes si l'ensemble est composé de n conformères. La première étape consiste à comparer la structure de chaque conformation avec chacune des autres de l'ensemble en calculant l'écart quadratique moyen des distances interatomiques (RMSD), et de mettre les deux structures les plus proches, c'est-à-dire dont le RMSD est le plus faible, dans un groupe. On a donc $(n-1)$ groupes. On répète ce processus $(n-1)$ fois, jusqu'à n'avoir plus qu'un seul groupe contenant toutes les conformations de l'ensemble. Plus précisément, une conformation est intégrée dans le groupe dont le RMSD entre sa structure et une des structures du groupe considéré est le plus faible au cours de cette étape.

- Le tri par propriétés moléculaires.

Maestro possède une fonctionnalité très utile: dans un ensemble de structures de la même molécule, on peut ne retenir que celles qui ont une propriété particulière et éliminer les autres. Par exemple, dans le peptide $[AGWLK+H^+]$, le groupement ammonium NH_3^+ peut être en interaction avec l'indole du tryptophane. Pour savoir quelles conformations contiennent ce type d'interaction, il suffit de mesurer la distance entre le groupement ammonium et l'indole et éliminer les structures pour lesquelles cette distance excède, par exemple, 4 Å. Si l'on veut en plus que le NH_2 terminal ne soit pas en liaison H avec l'ammonium, on recommence la même manipulation en mesurant cette fois la distance $NH_2-NH_3^+$. On peut ainsi réduire le nombre de conformations et former des familles caractérisées par une série de paramètres précis. Cette façon de procéder n'est efficace que lorsqu'on a accès à des informations extérieures au calcul sur le système étudié.

III.3 Les méthodes de dynamique moléculaire

Les méthodes de simulation par dynamique moléculaire consistent à laisser évoluer un système donné dans un environnement contrôlé pendant un certain temps Δt , à l'équilibre à la température T , et à en tirer des grandeurs thermodynamiques. Les lois qui régissent alors les interactions entre atomes sont empiriques, si l'on choisit d'utiliser un champ de forces. Il est également possible d'utiliser des approches beaucoup plus sophistiquées, comme la dynamique quantique Car-Parinello (CPMD), qui permettent de prendre en compte, de façon quantique, les effets physico-chimiques sur la dynamique conformationnelle. Marie-Pierre Gaigeot et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence la possibilité de transfert de proton dans la di-alanine protonée à 300 K par une dynamique au niveau BLYP¹¹. Mais ce niveau de calcul est lourd et peu courant pour une dynamique moléculaire sur des systèmes comportant plusieurs dizaines d'atomes ou plus pour lesquels on utilise généralement des champs de forces. C'est ce que nous avons retenu en utilisant la méthode par échange de répliques proposée par Y. Sugita et Y. Okamoto. Cette méthode a été utilisée avec succès pour prédire la conformation de cinq protéines différentes¹² et, plus récemment, pour explorer le paysage conformationnel de brins de la protéine Amyloïde β ¹³ que j'ai étudiée dans cette thèse (voir le chapitre VI). Florent Calvo, du LASIM (Université Lyon 1), a généreusement réalisé pour nous un programme Fortran utilisant cette méthode avec le champ de force AMBER99. Le principe consiste à simuler n dynamiques à n températures entre deux valeurs T_1 et T_n , et à comparer régulièrement les énergies des conformations des simulations voisines, par exemple 20 et 21, avec $T_{20} < T_{21}$. Si $E_{21} < E_{20}$, les deux structures s'échangent automatiquement, et si $E_{21} > E_{20}$, elles peuvent s'échanger avec une probabilité proportionnelle à $\exp\left(-\frac{E_{21} - E_{20}}{k(T_{21} - T_{20})}\right)$ (critère de Metropolis). Par contre, les températures *ne s'échangent pas*, et les simulations continuent à partir des conformations échangées ou non. Ceci est la clé de cette méthode qui permet d'explorer les différents puits d'une surface d'énergie potentielle en permettant au système de passer au-dessus des barrières d'énergie pour éviter de rester piégé dans des minima secondaires. En pratique, on doit régler la série de paramètres suivante:

- T_1 (K)
- T_n (K)
- durée du pas (fs)
- nombre de pas
- nombre de pas d'équilibration

- période d'échantillonnage des structures (nombre de pas)
- période d'essai d'échange entre répliques (nombre de pas)

A l'issue de la dynamique moléculaire, on obtient ainsi un ensemble de fichiers contenant les structures brutes du système provenant des échantillonnages des différentes températures. On peut alors optimiser les géométries avec AMBER99 pour réduire le nombre de conformations et avoir ainsi une représentation, qu'on espère exhaustive, des conformations d'équilibre de plus basses énergies.

Une fois que l'on a obtenu les familles de conformations typiques d'un système moléculaire, on veut en calculer le spectre IR. Pour cela, on fait appel à des méthodes de chimie quantique.

III.4 Les méthodes quantiques de calculs de structures et de fréquences

4.1 Introduction

Notre but est de prédire le spectre d'absorption IR des différentes conformations de l'espèce moléculaire étudiée, dans un solvant ou isolée, et de le comparer au spectre expérimental pour en déduire des propriétés de structure du système. Ce spectre simulé est obtenu en calculant les fréquences des modes normaux de vibration du système. En mécanique classique, ces modes sont ceux de ressorts (oscillateurs harmoniques) représentant les liaisons entre atomes. Pour une molécule diatomique, l'énergie potentielle est simplement donnée par:

$$E = \frac{1}{2}k(r - r_0)^2$$

où k est la constante de raideur du ressort et r_0 la distance d'équilibre entre les atomes.

La force de rappel entre les deux atomes est donnée par la dérivée de E par rapport à r :

$$F = k(r - r_0)$$

Enfin, la fréquence de vibration entre ces deux atomes est:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$$

où m est la masse réduite des deux atomes reliés par le ressort. On peut donc obtenir les fréquences de vibrations à partir de la dérivée seconde de l'énergie potentielle. Pour une molécule polyatomique, l'équivalent de cette dérivée est une matrice à $3N-6$ dimensions, le Hessien, dont il faut calculer les valeurs propres pour avoir les fréquences de vibration de la molécule.

4.2 Les méthodes DFT

Les molécules et complexes moléculaires sont par nature des objets quantiques. Les modes normaux sont contenus dans le Hessien calculé en dérivant deux fois par rapport aux coordonnées atomiques la matrice formée par les valeurs propres de l'observable énergie potentielle, elle-même trouvée en résolvant l'équation de Schrödinger pour l'ensemble des électrons du système considéré. En physico-chimie moléculaire, on utilise souvent des méthodes dérivées de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). C'est une théorie fondée sur le théorème de Hohenberg et Kohn, qui stipule que l'énergie potentielle d'un système dans son état électronique fondamental peut s'exprimer en fonction de la densité d'électrons du système, qui dépend elle-même des coordonnées de l'espace et du temps. Le principal problème est que ce théorème ne précise pas la forme de cette fonctionnelle de la densité. Il en existe de nombreuses, plus ou moins adaptées aux différentes grandeurs physiques à calculer. Les équipes travaillant en spectroscopie IR utilisent en majorité la fonctionnelle B3LYP (abréviation de Becke 3 paramètres, Lee, Yang et Parr). La fonctionnelle en elle-même a été développée par Becke ¹⁴ et des termes de corrélation électronique ont été ajoutés par Lee, Yang et Parr ¹⁵. De nombreuses autres fonctionnelles existent et sont développées à l'heure actuelle, parmi lesquelles BPW91 et BLYP, que nous avons été amenés à utiliser.

Pour résoudre l'équation de Schrödinger, on a besoin d'une base d'orbitales atomiques pour le calcul de la fonction d'onde électronique. Là encore, les recherches ont donné naissance à plusieurs types de bases parmi lesquelles nous avons principalement utilisé les bases gaussiennes développées par Pople (STO-3g ¹⁶ et 6-31g ¹⁷) ou bien la base SVP d'Ahlrichs *et al.* ¹⁸.

L'un des buts de ce travail de thèse est de tenter d'étudier de plus gros systèmes que ceux que l'équipe avait traités jusqu'alors, c'est-à-dire plus de 50 atomes. Lorsque les

systèmes contiennent un grand nombre d'atomes, nous nous trouvons face à un dilemme: nous voudrions utiliser une méthode précise et fiable, adaptée à ce que nous souhaitons calculer, mais sommes limités par la puissance de calcul des ordinateurs dont nous disposons... Un PC de bureau, avec 2 Go de mémoire vive, peut calculer, avec le logiciel Gaussian 03, les fréquences d'un système contenant à peu près 500 fonctions de base. Cela correspond à un peptide contenant quatre acides aminés au niveau quantique B3LYP/6-31G(d). Même la grappe de PC dont nous disposons, qui comporte 16 processeurs travaillant en parallèle, ne permet pas d'étudier des protéines entières, pour la simple raison que l'ordre de grandeur du temps requis pour un calcul de fréquences en DFT augmente en N^3 , avec N le nombre de fonctions de base prises en compte dans la fonction d'onde électronique. On est donc conduit à explorer d'autres voies, parmi lesquelles figurent les méthodes de résolution de l'identité (RI) ¹⁹ qui réduisent d'un ordre de grandeur les temps de calcul en négligeant certaines intégrales au poids très faible, ou bien la méthode SCC-DFTB (Self-Consistent Charge Density Tight-Binding) développée dans le groupe d'Elstner qui introduit des approximations et des paramètres dérivés des méthodes DFT dans le calcul des interactions moléculaires ²⁰. Dans ce travail de thèse, je me suis penché tout particulièrement sur les méthodes mixtes quantiques/classiques QM/MM, qui traitent la partie « intéressante » du système à un niveau de calcul décrivant de façon satisfaisante les interactions étudiées, faisant alors appel à la mécanique quantique (Quantum Mechanics), et qui utilisent, pour le reste du système, une méthode moins précise (souvent un champ de forces de mécanique moléculaire, Molecular Mechanics) mais moins coûteuse en mémoire et temps de calcul. Dans la prochaine partie, je vais détailler mon travail d'évaluation d'une de ces méthodes QM/MM implémentée dans le logiciel Gaussian03 et appelée ONIOM, pour la prédiction de spectres IR de molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse.

4.3 Evaluation de la méthode ONIOM

a) Introduction

L'idée qui sous-tend les méthodes QM/MM n'est pas récente et les premiers essais sont nés dans les années 70, avec Warshel et ses collaborateurs qui eurent l'idée de représenter l'eau par des dipôles classiques autour d'un complexe enzyme-substrat traité quantiquement ²¹. Depuis, ces méthodes ont été appliquées à de nombreux cas, allant de l'étude des mécanismes de catalyse enzymatique ²² à la simulation de transferts de proton

et/ou d'électron en solution ou dans des protéines par dynamique moléculaire ^{23,24}. La méthode implémentée dans Gaussian03 s'appelle ONIOM, pour « Our own N-layered Integrated molecular-Orbital molecular Mechanics » ²⁵. Elle est la plus aboutie des méthodes développées par ces mêmes chercheurs, les précédentes s'appellant Integrated Molecular Orbital-Molecular Orbital (IMOMO) ²⁶ ou IMO-Molecular Mechanics (IMOMM)²⁷. D'autres méthodes existent, comme Protein Dipole-Langevin Dipole (PD-LD) ²⁸ ou encore Qsite (Schrödinger), spécialisée dans l'étude des sites actifs enzymatiques. N'ayant utilisé qu'ONIOM pour des raisons pratiques, je vais en détailler le fonctionnement dans Gaussian03. Je parlerai ensuite de mon travail d'évaluation de cette méthode pour la prédiction de spectres IR de molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse, et j'insisterai sur les principales conclusions à tirer de cette étude.

b) Description de la méthode

Le principe fondamental d'ONIOM est de diviser le système à traiter en plusieurs « couches » d'atomes, calculées à différents niveaux. L'utilisateur peut choisir arbitrairement les atomes à mettre dans la couche haute CH, traités avec une méthode élaborée (Méthode Haute, MH), et ceux traités par une méthode moins coûteuse (Méthode Basse, MB) qui font partie de la couche basse CB. Une troisième couche, appelée couche moyenne, peut même être introduite entre les deux autres. Je n'ai cependant pas eu la nécessité de recourir à cette option.

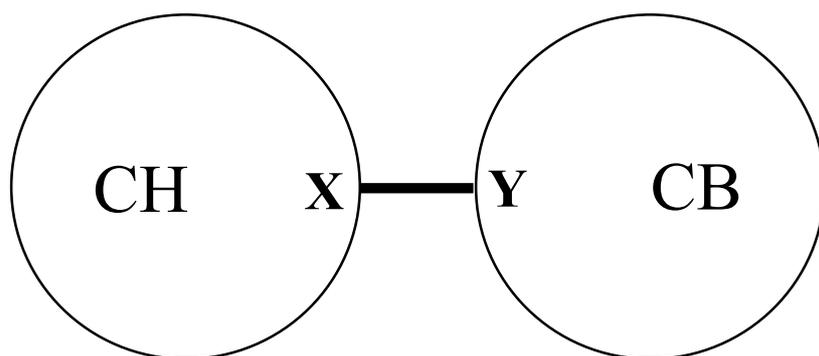


Figure 2: schéma représentant les couche haute (CH) et couche basse (CB) lors d'un calcul ONIOM. Les atomes-frontières sont notés X et Y.

Une des tâches les plus délicates est le traitement de la frontière entre les différentes couches, dont les atomes-frontières sont représentés par X et Y sur le schéma de la Figure 2.

L'idée la plus simple est de « couper » les liaisons entre atomes de deux couches différentes symétriquement, c'est-à-dire en laissant un électron à chacun des deux atomes de chaque côté de la frontière. Cependant, des espèces chimiques radicalaires sont ainsi artificiellement formées. Pour éviter les comportements indésirables induits par ces électrons célibataires, on introduit un atome n'existant pas dans le système mais dont le but est de saturer la valence de l'atome à la frontière des deux couches. C'est la méthode dite de l'atome de liaison. Par défaut dans Gaussian03, l'atome de liaison est un atome d'hydrogène. Des alternatives existent qui remplacent l'atome H par un atome paramétré pour avoir les propriétés de la liaison d'origine, au moyen d'un Hamiltonien semi-empirique²⁹ ou d'un potentiel de cœur effectif³⁰. Une autre manière de représenter la frontière entre CH et CB est d'introduire des orbitales localisées, ou « gelées ». Un exemple est celui de X. Assfeld et ses collaborateurs, qui développent une méthode dans laquelle chaque liaison coupée est remplacée par une orbitale moléculaire gelée (« Strictly Localized Bond Orbital ») obtenue par calcul sur des molécules modèles. Comme le but est d'étudier des réactions chimiques, les SLBO ne doivent pas perturber le site de réaction à modéliser, et elles doivent être orthogonales aux autres orbitales moléculaires. Cette approche est plus précise et plus rigoureuse que celle de l'atome de liaison, mais elle est plus complexe et montre ses limites lorsqu'on veut utiliser un champ de forces qui n'est pas paramétré pour les orbitales gelées.

Dans ce travail, je n'ai utilisé que des atomes d'hydrogène comme atomes de liaison. Dans la méthode de l'atome d'hydrogène de liaison, que je noterai H_l , la localisation de H_l est la suivante: pour éviter d'ajouter un degré de liberté en plus dans le système, H_l est contraint de rester sur l'axe de la liaison entre les atomes à la frontière de CH et CB. Si par exemple une liaison C-C est coupée, la distance entre C_{CH} et H_l est:

$$d = g.l_{C-C}$$

avec g un facteur déterminé comme suit:

$$g = \frac{l_0(C_{CH} - H_l)}{l_0(C - C)} \approx 0,71$$

avec l_0 la somme des rayons covalents des atomes considérés. La distance d est donc variable et tient compte des changements de géométrie lors d'une optimisation. Le facteur g s'adapte aussi aux différents types de liaison.

Si l'on ne considère que deux couches, une couche haute (CH) et une couche basse (CB), et que l'on définit $E_{MH/CH}$ comme l'énergie de la couche haute calculée avec la méthode

haute, $E_{MB/CH}$ comme l'énergie de la couche haute traitée avec la méthode basse, et $E_{MB/total}$ celle du système entier calculée avec la méthode basse, l'énergie ONIOM est ²⁵:

$$E_{ONIOM} = E_{MH/CH} - E_{MB/CH} + E_{MB/total}$$

Il faut bien noter qu'*a priori*, et c'est aussi cela qui fait la force de cette méthode, les couches n'ont pas à être « incluses » l'une dans l'autre. On peut également définir de manière équivalente l'énergie ONIOM par:

$$E_{ONIOM} = E_{MH/CH} + E_{MB/CB} + E_{interaction}$$

On voit alors que $E_{MB/CB} + E_{interaction} = E_{MB/total} - E_{MB/CH}$, c'est-à-dire que les interactions entre CH et CB sont traitées par la MB. Plus celle-ci se rapprochera en précision de la MH, plus les résultats tendront vers un calcul du système entier par la MH. Lorsque la MB est un champ de forces, le traitement des interactions électrostatiques entre les deux couches, déterminantes pour la structure, pose problème. Par contre, dès que l'on utilise une méthode semi-empirique comme MB, ce genre de problème est écarté car les interactions entre CH et CB sont traitées plus correctement qu'avec un champ de forces. Je n'ai donc pas utilisé de champ de forces dans mes calculs ONIOM.

c) Utilisation de la méthode ONIOM pour la spectroscopie IR

Les méthodes QM/MM ont déjà été utilisées pour prédire les spectres IR de grandes molécules isolées et de petits systèmes d'intérêt biologique dans l'eau. Klähn *et al.* ont, par exemple, étudié la fixation de la guanosine triphosphate (GTP) sur le site de liaison de la protéine Ras en spectroscopie IR, avec une précision de 3% dans la région des amides I et II, c'est-à-dire environ 45 cm^{-1} en valeur absolue ³¹.

Pour notre part, nous nous sommes penchés sur l'évaluation de la méthode ONIOM en ce qui concerne la prédiction des spectres IR de systèmes moléculaires d'intérêt biologique ou pharmaceutique en phase gazeuse. Nous avons choisi cette méthode parmi toutes les méthodes QM/MM existantes pour des raisons pratiques, ONIOM étant implémentée directement dans Gaussian03 ³².

d) Détermination des facteurs d'échelle pour la méthode ONIOM

Les modes de vibration moléculaires sont, par nature, anharmoniques et couplés entre eux. Un calcul rigoureux des fréquences IR devrait donc tenir compte du caractère anharmonique des potentiels décrivant les liaisons inter-atomiques. Cependant, si l'on

considère que seuls les niveaux vibrationnels les plus bas sont peuplés, on peut faire l'approximation que ces potentiels sont harmoniques, et les calculs demandent alors moins de mémoire et sont beaucoup plus rapides. Par exemple, le spectre du peptide protégé Ac-Phe-NH₂ (29 atomes) est simulé en 150 fois moins de temps ! Pour tenir compte empiriquement de l'anharmonicité, il suffit alors de multiplier les fréquences obtenues par ce que l'on appelle un facteur d'échelle pour, ensuite, simuler les résultats d'expérience et interpréter ceux-ci. Ces facteurs peuvent être globaux, c'est-à-dire être valables pour toute la gamme des modes vibrationnels, ou locaux, donc spécifiques à chaque type de vibration. Ils sont également dépendants de la méthode de calcul et de la base d'orbitales moléculaires utilisée. La détermination de facteurs locaux des modes d'élongation (« stretching ») NH, NH₂ asymétriques et symétriques, C=O et OH, et des modes de pliage (« bending ») NH et NH₂ est un des thèmes de recherche de l'équipe. Nous les avons déterminés pour les fonctionnelles B3LYP (bases 3-21g, 3-21g(d, p), 3-21+g(d), 6-31g(d), 6-31+g(d), 6-311++g(d, p) et SVP) et B3PW91 (bases 6-31g(d) et 6-31+g(d))³³. Le gain de prédiction, en ce qui concerne le niveau B3LYP/6-31g(d), est passé de 24 cm⁻¹, pour un facteur global, à seulement 8 cm⁻¹ avec des facteurs spécifiques. Plus récemment nous avons testé de nouvelles méthodes telles que la résolution de l'identité (RI) appliquée à la DFT et à la méthode de Möller-Plesset (MP2), ainsi que la méthode DFT avec un terme décrivant l'interaction entre dipôles induits (dispersion). Nous avons ainsi montré que l'on pouvait atteindre une erreur de prédiction moyenne de 5 cm⁻¹ seulement avec la méthode RI-MP2 et la base SVP³⁴.

La méthode de détermination d'un facteur d'échelle local est la suivante: pour un mode m donné du conformère j de la molécule i , nous attribuons la fréquence de vibration obtenue, à un niveau de calcul donné L , à la valeur mesurée de la raie spectrale expérimentale correspondante, et nous en déduisons le facteur d'échelle par le rapport:

$$fe^{m,L} = \frac{v_{\text{exp}}^{i,j,m}}{v_{\text{calc}}^{i,j,m,L}}$$

La même détermination est répétée pour chaque vibration de chaque conformère et nous effectuons ensuite la moyenne arithmétique, sur i et j , de tous les facteurs obtenus *pour un mode* m . Ce facteur moyen est ensuite appliqué à toutes les fréquences calculées du mode, et nous obtenons l'écart-type des différences entre calcul et expérience par la formule:

$$\sigma_{m,L}^2 = \frac{\sum_{i,j} (fe^{m,L} v_{\text{calc}}^{i,j,m,L} - v_{\text{exp}}^{i,j,m})^2}{n}$$

où n est le nombre de fréquences prises en compte pour calculer le facteur d'échelle du mode considéré. Le facteur $fe^{m,L}$ obtenu est construit pour annuler l'erreur moyenne *arithmétique* entre calcul et expérience pour la série de conformères utilisée. Cette erreur moyenne n'a donc pas de sens, sauf lorsqu'on passe à une autre série de molécules sans changer de facteur local. C'est pourquoi je ne parlerai dans cette partie que d'écart type pour comparer les différentes méthodes de calcul.

Cette approche nous a déjà permis de montrer que, dans le cas du niveau de calcul DFT/B3LYP avec différentes bases, les facteurs locaux permettent de réduire considérablement l'écart-type de l'erreur de prédiction sur les fréquences par rapport à l'utilisation d'un simple facteur global³³. C'est pourquoi nous avons choisi de déterminer les facteurs d'échelle locaux pour l'approche QM/MM implémentée par la méthode ONIOM, pour différents couples CH/CB. Le but de cette étude est de tester la méthode ONIOM pour des systèmes de tailles plus importantes que ceux déjà étudiés par l'équipe, pratiquement limitées aux pentapeptides. Pour cela, nous avons commencé par une détermination des facteurs locaux d'ONIOM à partir de résultats expérimentaux de la littérature concernant la spectroscopie infrarouge de molécules résolue en conformères. Les molécules retenues pour faire partie de la série de conformères de test ont toutes au moins 25 atomes. La technique de spectroscopie de double résonance IR/UV (« hole burning »), qui permet de sélectionner un conformère d'un système moléculaire et d'en déterminer le spectre d'absorption IR, a fourni les données expérimentales établies par différents groupes et dont nous avons besoin. Etant donné que la résolution spectrale de cette technique est de quelques cm^{-1} , la comparaison avec les calculs de chimie quantiques élaborés, typiquement au niveau B3LYP/6-31g(d), permet une attribution sans équivoque de la plupart des transitions observées expérimentalement. Nous nous sommes fondés sur ces travaux pour évaluer la méthode ONIOM: les modes d'élongation NH, NH₂, C=O et les modes de pliage NH et NH₂ ont été étudiés par M. Mons et collaborateurs (LFP, CEA Saclay), qui ont obtenu les spectres de 19 conformères de peptides neutres protégés des côtés N et C terminaux par un groupement acétyle et NH₂, respectivement³⁵⁻³⁷. L'équipe de J. Simons (Oxford) a mesuré ceux de cinq conformères de peptides neutres^{38,39} et sept conformères de sucres⁴⁰⁻⁴³ (*cf.* Annexe 1). Les sucres contiennent de nombreux groupes OH, le mode d'élongation OH y est donc très représenté. Afin de réduire l'erreur de prédiction, il est important de souligner qu'il est préférable d'introduire, pour ce dernier mode, un second facteur d'échelle local afin de mieux tenir compte du grand déplacement en fréquence (supérieur à 150 cm^{-1}) induit par les liaisons H fortes³³. Cependant,

étant donné que notre but principal est d'interpréter des spectres que nous avons pris dans la région 1000-2000 cm^{-1} , je n'ai pas jugé utile de calculer ce second facteur pour la méthode ONIOM. Le facteur d'échelle du mode d'élongation OH est donc à utiliser avec prudence lorsque le système étudié contient des groupements OH fortement liés.

Dans cette étude, nous avons choisi comme méthode MH le niveau DFT et plus exactement la fonctionnelle B3LYP, qui est connue pour donner de bons résultats en ce qui concerne les fréquences de vibrations IR de systèmes neutres ou chargés en phase gazeuse^{44,45}. Les travaux récents de notre équipe sur les facteurs d'échelle ayant indiqué que la base 6-31g(d) est celle qui offre le meilleur rapport précision/temps de calcul, nous avons donc opté pour celle-ci afin de réduire le plus possible la durée des calculs et la demande de mémoire. Pour le traitement de la couche CB et les interactions entre les couches CB et CH, de nombreuses possibilités sont offertes par Gaussian, depuis l'utilisation de champ de forces⁴⁶ jusqu'à la méthode CCSD (Coupled Clusters Single Double excitation). F. Claeysens et ses collaborateurs ont par exemple utilisé CHARMM pour étudier une réaction chimique au sein d'une enzyme en solution⁴⁷. Les nombreux travaux de J. J. Dannenberg^{48,49} sur le mode amide I des peptides avec la méthode AM1 en tant que méthode MB ainsi que ceux d'autres équipes⁵⁰ ont prouvé que celle-ci était suffisamment précise pour la détermination de structures. Une autre équipe l'a utilisée pour faire une recherche conformationnelle⁵¹. L'énergie d'interaction de complexes non-covalents de plusieurs petites molécules peut être prédite avec une précision meilleure que 1% par des méthodes QM/QM par rapport à des calculs avec la méthode CCSD(T)⁵². Nous avons donc choisi de tester trois méthodes MB différentes: AM1, HF/sto-3g et B3LYP/sto-3g, et de comparer leurs performances en terme d'écart type des différences entre prédiction et mesure des fréquences des modes de vibration de molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse.

Dans la méthode ONIOM, on peut mettre n'importe quel atome dans n'importe quelle couche, haute ou basse, et lancer le calcul. C'est un choix à double tranchant: la souplesse et la liberté d'utilisation s'obtiennent au prix d'une étude obligatoire des différentes manières de « couper » les liaisons, c'est-à-dire de définir les couches CH et CB, pour en déduire les règles qui permettent de mener à bien les calculs que l'on veut et obtenir des résultats cohérents. W. Deng et ses collaborateurs ont établi quelques-unes de ces règles pour l'étude d'une déprotonation⁵³. Tout d'abord, étant donné que les atomes de liaison sont des atomes d'hydrogène, ils ne peuvent établir que des liaisons simples. Nous avons constaté qu'il est donc préférable de couper uniquement des liaisons σ , sans caractère π prononcé. En ce qui

concerne les peptides, nous pouvons donc immédiatement en conclure que les liaisons amides ne doivent pas être coupées. L'équipe de J. J. Dannenberg suit d'ailleurs ce principe pour calculer les fréquences de polyalanines dans la région des amides I, c'est-à-dire les elongations C=O⁵⁴. Les atomes formant des liaisons polaires doivent également rester dans la même couche et j'ai donc traité par la même méthode les liaisons C-O, C-N ou C-Cl. Les groupes aromatiques comme les cycles benzéniques ou les groupements indoles sont des sites où la délocalisation électronique est indispensable à la structure. L'introduction d'atomes de liaison induirait donc des erreurs considérables de géométrie dans le système. J'ai ajouté d'autres règles, plus spécifiques à la spectroscopie IR, en testant ONIOM sur des peptides protonés dont l'équipe avait déjà interprété les spectres IR obtenus avec le laser CLIO. Le premier système sur lequel je me suis penché est la séquence peptidique protonée [RGD+H⁺], et je vais détailler la méthodologie employée.

Le but de ce travail est de tester ONIOM pour l'appliquer à des systèmes moléculaires de plus de 100 atomes, mais nous désirons également que les temps de calculs restent raisonnables, c'est-à-dire les plus courts possibles sur [RGD+H⁺], qui contient 47 atomes, pour espérer ne pas dépasser quelques jours de calcul pour les plus gros systèmes. Pour cela, nous cherchons à inclure le minimum d'atomes dans la couche CH. Comme nous interrogeons expérimentalement les vibrations NH, NH₂, C=O et OH, nous avons tenté de simuler le spectre du système apparaissant sur la Figure 3, avec B3LYP/6-31g(d) comme méthode MH et AM1 comme méthode MB.

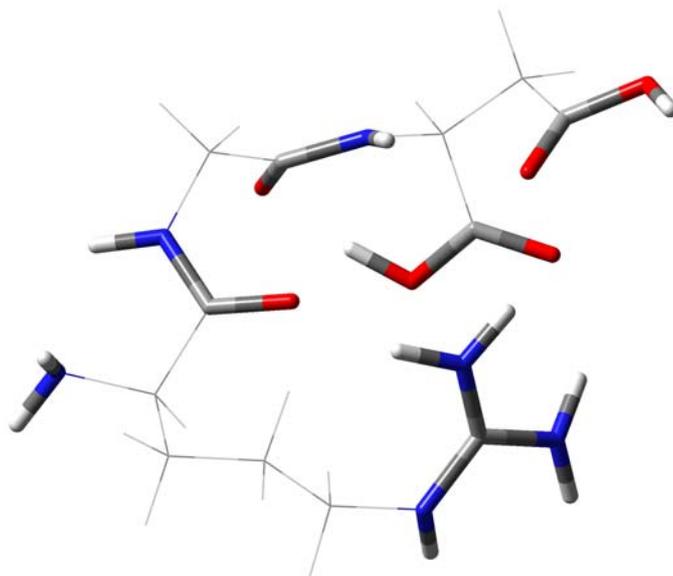


Figure 3: Répartition minimale pour le nombre d'atomes dans la couche CH pour [RGD+H⁺]. Les atomes de la couche CH sont représentés par des intersections de tubes, et ceux de la couche CB par des intersections de traits.

Le programme Gaussian requiert que l'utilisateur indique dans le fichier d'entrée la charge et la multiplicité de chaque calcul d'énergie, $E_{MH/CH}$, $E_{MB/CH}$ et $E_{MB/total}$. Comme la molécule est protonée, mais qu'elle ne contient pas d'électrons célibataires, la charge et la multiplicité sont égales à 1. Or le calcul Gaussian ne peut pas être fait et le programme s'arrête parce que la charge et la multiplicité indiquées sont incompatibles. Si on met 2 comme multiplicité, Gaussian ne s'arrête pas et simule un spectre! Ceci est dû au fait que lorsque deux atomes de la CH sont reliés au même atome appartenant à la CB, ONIOM ne met *qu'un seul atome de liaison* sur l'un des deux atomes et l'autre possède alors un électron célibataire. On ne peut donc pas couper deux liaisons adjacentes. La répartition entre couches CH et CB pour [RGD+H⁺] devient donc celle de la Figure 4.

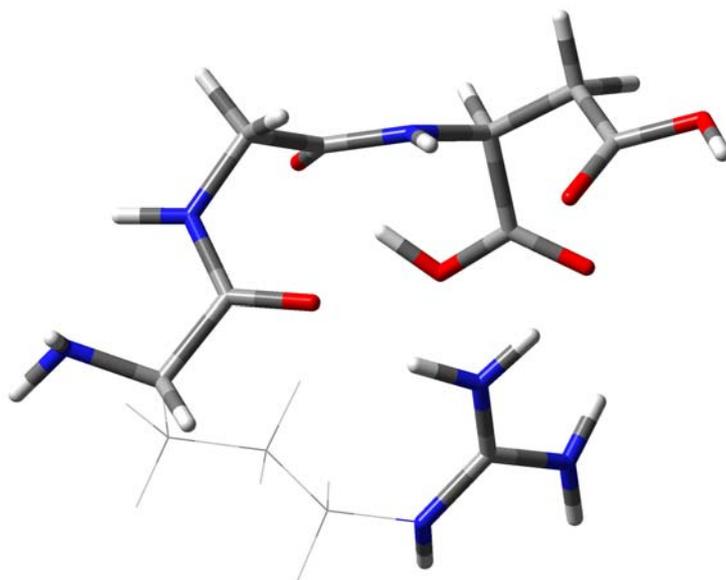


Figure 4: Répartition en couches CH/CB optimale pour [RGD+H⁺].

Nous avons vu précédemment que lorsqu'une liaison C-C (par exemple) est coupée, un hydrogène de liaison est relié à un carbone de la couche haute par une liaison simple de longueur $d = g \cdot l_{C-C}$ lors du calcul de $E_{MH/CH}$ et $E_{MB/CH}$. Ce facteur g est variable selon les différents types de liaison, mais on s'attend à ce qu'il soit plus ou moins adapté à un couple MH/MB donné. Derat et collaborateurs ont étudié cette possibilité sur une liaison C=C dans la molécule (E)-hexatriène et ont conclu que, pour les couples MH:MB MP2:HF, B3LYP:AM1 et B3LYP:UFF (la base utilisée est à chaque fois 6-31g(d)), l'énergie de dissociation varie peu et la géométrie varie de façon négligeable, pour des facteurs g variant entre 0,741 et 0,889. Or le facteur g déterminé par Gaussian étant 0.712 pour ce type de liaison, j'ai donc laissé Gaussian déterminer chaque valeur de g pour tous les calculs effectués.

Il est important de déterminer si l'influence de l'environnement chimique traité en MB sur les atomes des vibrations examinées (et donc traités par la méthode MH) induit des résultats erronés pour les fréquences. J'ai donc pris comme test le mode de pliage NH d'un conformère du peptide Ac-FA-NH₂ neutre où le groupement NH est en interaction avec le nuage π de la chaîne latérale de la phénylalanine. La répartition entre couches CH et CB pour le calcul ONIOM est montrée sur la Figure 5. La Figure 6 présente la superposition des structures optimisées aux niveaux de calcul B3LYP/6-31g(d) et ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1. L'écart quadratique moyen des distances entre atomes n'est que de 0,4 Å.

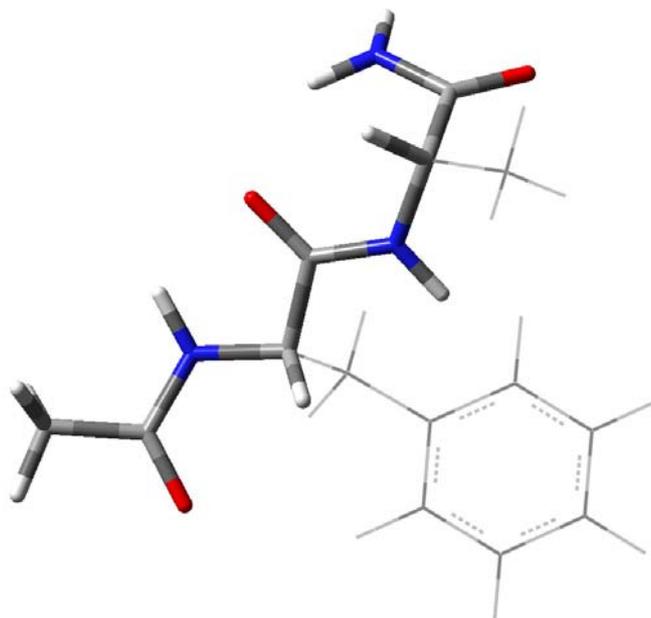


Figure 5: Répartition CH/CB pour le calcul ONIOM de Ac-FA-NH₂.

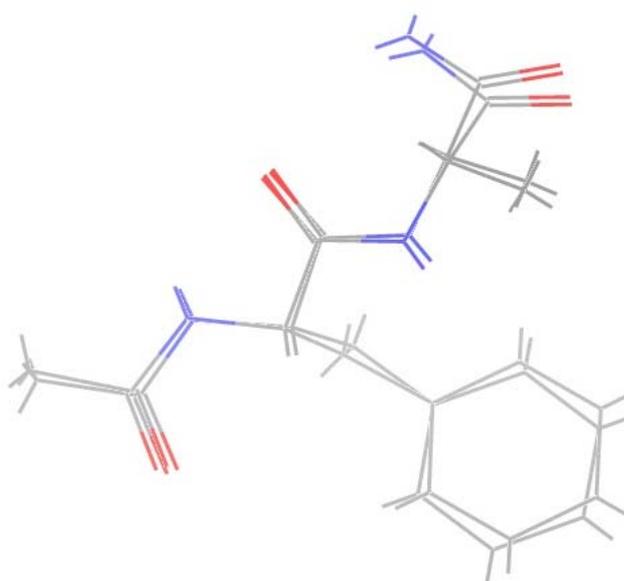


Figure 6: Superposition des structures de Ac-FA-NH₂ calculées aux niveaux B3LYP/6-31g(d) et ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1.

Les deux structures sont très semblables et l'environnement chimique du groupe NH est le même pour les deux niveaux de calcul. Les fréquences du pliage NH sont respectivement égales à 1577 et 1576 cm⁻¹ pour la DFT seule et ONIOM. Cette différence de fréquence est négligeable compte tenu de la résolution de la spectroscopie IRMPD (15 cm⁻¹ au mieux), ce résultat est donc encourageant.

Pour déterminer les facteurs d'échelle spécifiques aux différents couples CH/CB, j'ai procédé comme suit: la molécule a été optimisée au niveau de calcul voulu, puis le spectre IR a été simulé. Pour vérifier que la structure est bien un minimum de la PES, il faut vérifier qu'il n'y a pas de valeurs propres négatives du Hessien (fréquences imaginaires) dans le fichier de sortie de Gaussian. Après l'avoir fait, j'ai procédé comme l'équipe avait fait pour déterminer les facteurs d'échelle dans la référence ³³. Le Tableau 2 donne ces facteurs pour trois couples CH/CB ONIOM, mais aussi pour la méthode DFT B3LYP avec les bases 3-21g et 6-31g(d). Je compare également dans le Tableau 3 les performances en termes d'écart types des différences de fréquences entre expérience et simulation pour les mêmes méthodes.

Tableau 2: facteurs d'échelle pour les couples ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1, B3LYP/6-31g(d):HF/sto-3g, B3LYP/6-31g(d):B3LYP/sto-3g, et les méthodes B3LYP avec les bases 3-21g et 6-31g(d). γ désigne un mode de pliage, ν un mode d'élongation.

Mode de vibration	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{NH}_2)_{\text{as}}$	$\nu(\text{NH}_2)_{\text{s}}$	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CO})$	$\gamma(\text{NH}_2)$	$\gamma(\text{NH})$	Facteur d'échelle global
B3LYP/ 6-31g(d):AM1	0.977	0.958	0.958	0.958	0.957	0.964	0.964	0.962
B3LYP/ 6-31g(d):HF/ sto-3g	0.973	0.957	0.957	0.952	0.956	0.964	0.967	0.960
B3LYP/ 6-31g(d):B3LYP/ sto-3g	0.974	0.958	0.959	0.955	0.954	0.964	0.970	0.962
B3LYP/3-21g	1.061	0.974	0.983	0.978	0.995	0.943	0.991	1.001
B3LYP/6-31g(d)	0.974	0.961	0.962	0.960	0.961	0.963	0.963	0.965

Tableau 3: écarts types (cm⁻¹) des différences entre fréquences expérimentales et calculées aux mêmes niveaux que dans le Tableau 2.

Mode de vibration	v(OH)	v(NH ₂) _{as}	v(NH ₂) _s	v(NH)	v(CO)	γ(NH ₂)	γ(NH)	Facteur d'échelle global
B3LYP/6-31g(d):AM1	16,9	7,2	13,4	23,2	6,8	5,9	8,2	28,8
B3LYP/6-31g(d):HF/sto-3g	17,1	8,0	8,5	15,7	11,6	6,3	10,6	27,5
B3LYP/6-31g(d):B3LYP/sto-3g	22,0	7,7	11,7	21,0	9,2	6,7	11,2	28,7
B3LYP/3-21g	47,8	22,4	46,5	17,9	8,1	17,7	14,5	131,6
B3LYP/6-31g(d)	9,1	11,1	12,6	9,0	4,9	7,4	2,7	24,2

La conclusion immédiate qui peut être tirée de la lecture de ce tableau est que la méthode ONIOM est capable de prédire la position des raies IR expérimentales des modes considérés à mieux que 15 cm⁻¹ près pour tous les modes considérés, sauf les modes d'élongation NH et OH. Même en prenant en compte ces deux modes, l'écart type est de 12 cm⁻¹ en moyenne. Par rapport au facteur global, c'est un gain de prédiction de 17 cm⁻¹ en moyenne. Nous pouvons aussi constater que les performances globales des méthodes ONIOM n'augmentent pas avec l'élévation du niveau de calcul de la MB, ce qui peut paraître surprenant. Comme les interactions entre couches CH et CB sont traitées avec la méthode MB, on devrait se rapprocher des performances obtenues en employant le niveau de calcul B3LYP/6-31g(d) en passant d'AM1 à HF/sto-3g, puis à B3LYP/sto-3g. Nous pouvons avancer que le fait que nous n'observons pas ce comportement peut être dû à des compensations d'erreurs au sein d'ONIOM. Il doit cependant être précisé que B3LYP/sto-3g et HF/sto-3g donnent de meilleurs résultats qu'AM1 en ce qui concerne les modes d'élongation NH₂ symétrique et NH. Cependant, le temps requis pour optimiser la géométrie du peptide Ac-FGG-NH₂ (partant de la même structure) et simuler son spectre IR est 50% plus élevé pour HF/sto-3g que pour AM1. Tout dépend alors des modes de vibration que l'on veut sonder: dans la région 1000-2000 cm⁻¹ où les modes d'élongation NH₂ et NH ne sont pas excités, AM1 en tant que couche CB est la meilleure méthode à tout point de vue. Elle offre

également le meilleur rapport « qualité/prix », ou plutôt performances/exigences informatiques (ces dernières étant le temps et la mémoire vive demandés par le calcul). C'est pourquoi nous l'avons choisie pour interpréter les spectres des systèmes étudiés au cours de ce travail.

Afin d'évaluer le gain de temps des méthodes ONIOM, j'ai calculé le temps que demande la simulation du spectre IR de quatre peptides avec le même ordinateur et les méthodes B3LYP/3-21g, B3LYP/6-31g(d), et ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1. L'unité de temps correspond ici à la durée du calcul des fréquences d'Ac-F-NH₂ en ONIOM. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4: temps de calcul relatifs pour la simulation du spectre IR de quatre peptides. L'unité de calcul est indiquée en gras.

Peptides	Ac-F-NH ₂	Ac-FGG-NH ₂	Ac-FA-NH ₂	[RGD+H ⁺]
Nombre d'atomes dans la couche CH pour les calculs ONIOM	11	25	17	33
Nombre d'atomes au total	29	43	39	47
Nombre de fonctions de base pour le calcul ONIOM de $E_{MH/CH}$	117	249	183	317
Nombre de fonctions de base pour le calcul B3LYP/6-31g(d)	253	385	338	406
Nombre de fonctions de base pour le calcul B3LYP/3-21g	163	247	218	262
Temps de calcul pour ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1	1	12	3.3	21.5
Temps de calcul pour B3LYP/6-31g(d)	12	42	28	53
Temps de calcul pour B3LYP/3-21g	3.6	13.3	8.3	16.6

Le temps de calcul des fréquences au niveau AM1 étant de l'ordre de 60 fois plus faible qu'au niveau B3LYP/6-31g(d), les durées du Tableau 4 sont en grande majorité déterminées par le nombre de fonctions de base constituant la CH, noté N_{CH} . Ces durées, si

l'on appelle N_{tot} le nombre total de fonctions de base dans le système, sont proportionnelles au rapport $\left(\frac{N_{CH}}{N_{tot}}\right)^3$.

En résumé, moins nous mettons d'atomes dans la couche CH, moins le calcul est long. C'est pour cela que, malgré le fait qu'il faille mettre 33 atomes sur 47 dans la CH pour [RGD+H⁺], le gain de temps dépasse un facteur deux lorsqu'on passe de B3LYP/6-31g(d) à ONIOM.

e) Un test de l'approche ONIOM: interprétation du spectre IR de la séquence [RGD+H⁺]

La séquence RGD est présente dans plusieurs protéines du milieu inter-cellulaire (matrice extra-cellulaire). Elle présente un grand intérêt thérapeutique car elle est reconnue par les intégrines, des protéines trans-membranaires, jouant ainsi un rôle important dans l'adhésion cellulaire. L'équipe, dans des travaux antérieurs à mon arrivée ¹¹, a mesuré le spectre IRMPD de cette séquence protonée. Elle a montré, grâce aux contributions de B. Paizs et C. Desfrancois, qu'il existe quatre types de conformères mais, qu'en phase gazeuse, deux conformères du même type prédominent (appelés CS₁ et CS₂). Ces conformères sont peuplés à 300 K, tous deux protonés sur la chaîne latérale de l'arginine (groupe guanidinium). Le conformère CS₁ est le plus bas en énergie au niveau B3LYP/6-31g(d), et CS₂ est à 3,7 kJ/mol au-dessus. Ils se distinguent géométriquement par la solvation de la charge positive: dans CS₁, le groupe carboxyle du C terminal est en interaction avec le groupement guanidinium, alors que pour CS₂, il s'agit alors de la chaîne latérale de l'acide aspartique. J'ai simulé le spectre de ces deux conformères en procédant comme précédemment: les structures trouvées par B. Paizs et C. Desfrancois qui ont été ré-optimisées au niveau ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1. J'ai ensuite calculé les fréquences au même niveau. Je compare dans la Figure 7 les structures ONIOM et B3LYP/6-31g(d) entre lesquelles le RMSD est très faible, égal à 0.08 Å. Cela nous assure que les différences éventuelles entre les fréquences ne proviennent pas d'une différence de géométrie et prouve que la méthode ONIOM est fiable en ce qui concerne l'optimisation de structure, ce qui est indispensable pour l'étude de systèmes en phase gazeuse. D'autres travaux vont également dans ce sens, tout particulièrement ceux de J. J. Dannenberg ^{54,55}. Je présente dans la Figure 8 les spectres du conformère CS₁ de [RGD+H⁺] calculés en ONIOM et DFT avec deux bases différentes.

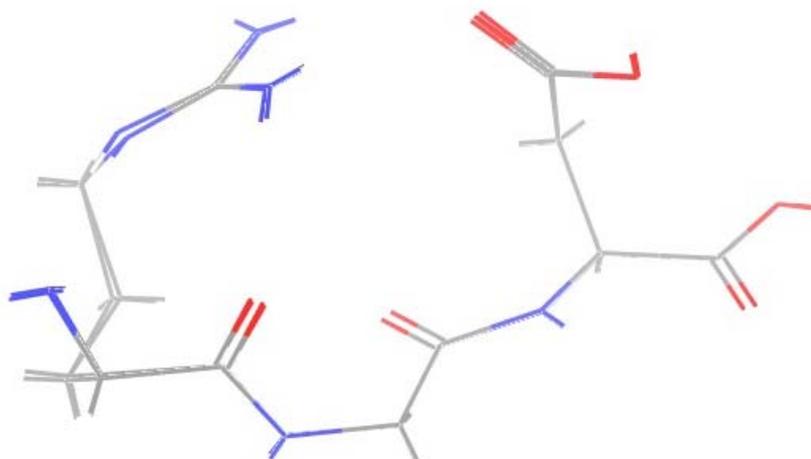


Figure 7: Superposition des structures du peptide [RGD+H⁺] optimisées aux niveaux B3LYP/6-31g(d) et ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1.

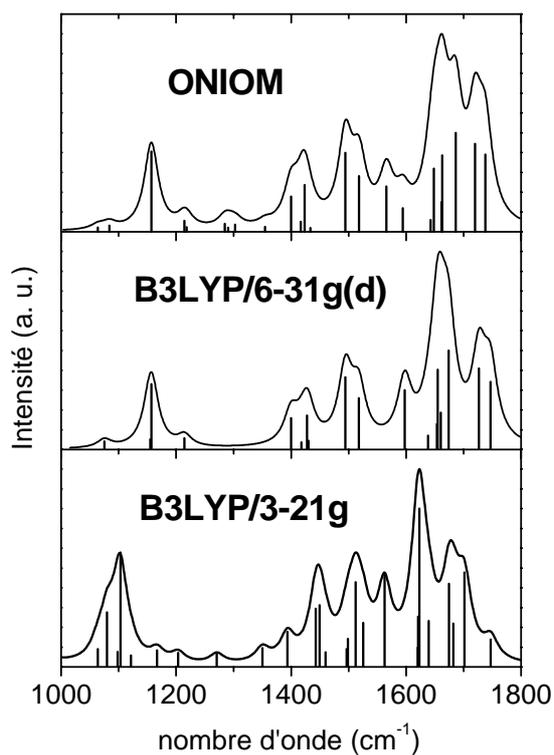


Figure 8: Spectres IR du conformère CS1 du peptide [RGD+H⁺] simulés par ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1, B3LYP/6-31g(d) et B3LYP/3-21g. Les spectres de raies ont été convolués par une fonction de Lorentz de 30 cm⁻¹ de largeur à mi-hauteur.

L'examen de ces spectres permet de constater que les modes de pliage OH et NH peu liés sont représentés à peu près de la même façon dans les trois cas. En effet, les bandes à 1150 et 1500 cm^{-1} où ces modes sont présents, se ressemblent. Par contre, les vibrations impliquant des atomes engagés dans des liaisons hydrogène plus fortes ne sont correctement prédites que par les niveaux B3LYP/6-31g(d) et ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1. Par exemple, la fréquence du mode de pliage OH du groupement carboxyle du C terminal en interaction avec un groupe C=O est prédite à 1483 cm^{-1} par ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1, 1487 cm^{-1} au niveau B3LYP/6-31g(d) pur, mais à 1495 cm^{-1} lorsque la base est 3-21g. Cela peut s'expliquer par l'absence de fonctions de polarisation dans cette dernière, contrairement à la base 6-31g(d).

D'après les travaux précédents de l'équipe, il existe deux autres conformères de [RGD+H⁺], l'un à 75 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (énergie calculée au niveau ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1) au-dessus de CS₁, avec le proton situé sur le NH₂ terminal, donc avec la guanidine (chaîne latérale de l'arginine) neutre, appelée GN₁, et l'autre pour laquelle l'interaction électrostatique entre les deux sites protonés, le N terminal et la guanidine, et le groupe carboxyle de la chaîne latérale de l'acide aspartique, qui est lui déprotoné, stabilise fortement une structure en pont salin (« Salt Bridge »). Cette structure est située à 39 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ au-dessus du conformère CS₁ et est notée SB₁ par la suite. Si nous comparons les spectres IR simulés en ONIOM des quatre conformères (cf. Figure 9) à l'expérience, nous remarquons que les spectres des conformères CS₁ et CS₂ sont nécessaires et suffisants pour reproduire la totalité des bandes expérimentales. Par exemple, la raie spectrale IRMPD à 1763 cm^{-1} qui correspond au mode d'élongation C=O libre, n'est présente que dans le spectre de CS₂. A l'inverse, CS₁ est le conformère qui donne la plus fidèle représentation des bandes de la région 1600-1750 cm^{-1} dues aux modes de pliage NH₂ et d'élongation C=O liés. Le spectre IR caractéristique du conformère GN₁ est clairement différent de l'expérience et son énergie potentielle est très élevée par rapport à son énergie vibrationnelle à 300 K calculée par un modèle statistique (environ 56 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)⁵⁶. Nous pouvons donc avancer avec confiance qu'il n'est peuplé que de façon négligeable à 300 K en phase gazeuse. Le conformère SB₁ ne peut être écarté par des critères énergétiques car il se place à 39 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ au-dessus du conformère CS₁. Cependant, bien que quelques bandes de son spectre (1150, 1500 et 1760 cm^{-1}) soient cohérentes avec l'expérience, il n'est sans doute peuplé que faiblement. Ces conclusions sont en accord avec celles que l'équipe a publié dans la référence¹¹. Ce test de la méthode ONIOM sur la séquence tripeptidique RGD protonée est donc concluant.

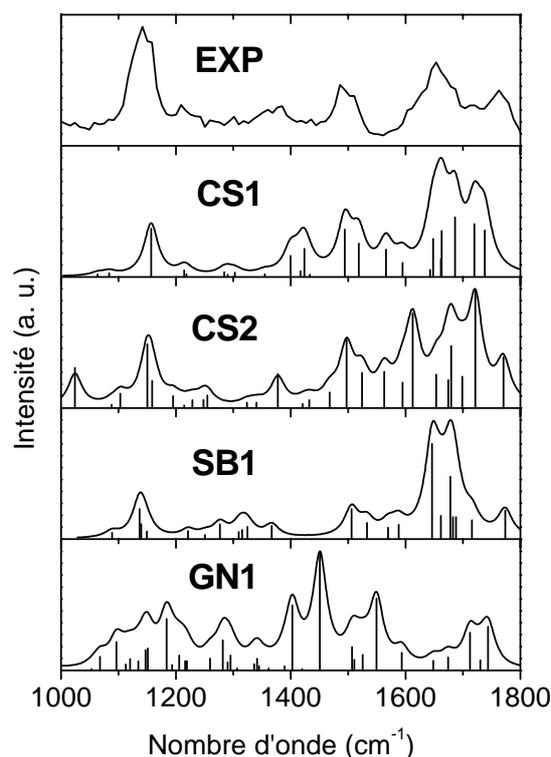


Figure 9: Comparaison de l'expérience d'IRMPD avec les spectres IR simulés par ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1 pour quatre conformères du peptide [RGD+H⁺]. Les spectres de raies ont été convolués par une fonction de Lorentz de 30 cm⁻¹ de largeur à mi-hauteur.

En résumé, les facteurs d'échelle spécifiques aux principaux modes de vibration absorbant fortement dans le domaine compris entre 1000 et 2000 cm⁻¹ ont été déterminés par minimisation de la moyenne arithmétique des écarts des fréquences calculées par rapport à l'expérience, et ceci pour le niveau B3LYP/6-31g(d) en tant que méthode MH et pour différents niveaux de méthode MB de la méthode ONIOM. Ils permettent d'améliorer nettement les performances de prédiction des simulations de spectres infrarouge par rapport à un facteur d'échelle global. Ces facteurs spécifiques permettent d'interpréter les données de spectroscopie IRMPD de systèmes flexibles et possédant une cinquantaine d'atomes. Les calculs ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1 constituent le meilleur rapport précision/exigences informatiques parmi les méthodes testées, mais à condition de respecter quelques règles gouvernant la répartition des atomes selon les couches CH et CB. Cela aboutit parfois, comme dans le cas de [RGD+H⁺], à mettre la majorité des atomes dans la couche CH, mais le gain de temps par rapport à la DFT pure devient rapidement conséquent à cause de sa dépendance en

N_{CH}^3 , avec N_{CH} le nombre de fonctions dans la base d'orbitales utilisée pour décrire cette couche. On peut également conclure de ce travail que, bien que les facteurs d'échelle aient été déterminés sur des molécules neutres, ils s'adaptent apparemment bien aux espèces chargées, en tout cas protonées. Je discuterai de ce point important de manière plus approfondie dans le paragraphe suivant.

4.4 Prédiction des fréquences de vibration des modes incluant un groupement chargé

Il est légitime de s'interroger sur la transférabilité des facteurs d'échelle, qui ont été calculés à partir d'une base de données concernant des espèces neutres, vers des systèmes protonés ou déprotonés. Nous pouvons avancer le fait que les interactions électrostatiques induites par l'ajout ou l'enlèvement d'un ou plusieurs protons à une molécule doivent être prises en compte par la méthode DFT. Cela doit être particulièrement vrai pour le groupement NH_3^+ , dans lequel la charge se répartit de manière équitable sur les trois atomes H et polarise les trois liaisons NH. On doit alors pouvoir prédire avec une précision comparable aux résultats obtenus sur les molécules neutres les vibrations caractéristiques du groupement NH_3^+ , par exemple les modes de pliage avec les facteurs d'échelle du mode $\gamma(\text{NH}_2)$. Dans cette partie, je vais tester les prédictions des niveaux B3LYP/6-31g(d) pour le mode de pliage symétrique de NH_3^+ .

Ronghu Wu et Terry B. McMahon ont étudié le peptide $[\text{GG}+\text{H}^+]$, dont la conformation qui reproduit le mieux le spectre possède le groupe NH_3^+ en interaction C5 avec un groupe C=O (voir Figure 10) ⁵⁷. Ils observent une bande à 1418 cm^{-1} pour le mode symétrique de NH_3^+ . Au niveau B3LYP/6-31g(d), et avec le facteur d'échelle du mode de pliage NH_2 (0.963), le calcul conduit à la valeur de 1408 cm^{-1} , soit un écart de 10 cm^{-1} . Avec le facteur recommandé par le NIST (0.960), on obtient 1404 cm^{-1} . La situation est identique pour le peptide protoné $[\text{AA}+\text{H}^+]$, qui a été étudié par notre équipe. Les isomères les plus bas en énergie potentielle, dont les spectres s'ajustent le mieux avec l'expérience, sont liés via une interaction C5 avec un groupe C=O ⁵⁸. Ici, le calcul au niveau B3LYP/6-31g(d) prédit 1412 et 1408 cm^{-1} (en utilisant, respectivement, le facteur spécifique et le facteur du NIST) pour la structure *transA1*, qu'il faut comparer avec la bande à 1400 cm^{-1} . Lorsque le groupe NH_3^+ est en interaction avec deux groupements C=O, on peut s'attendre à un décalage vers le bleu de la fréquence de vibration du mode de pliage symétrique par rapport à l'interaction précédente. N. Polfer *et al.* ont mené une étude structurale du peptide Leu-enkephaline par spectrométrie de masse et spectroscopie IRMPD dans laquelle ils ont montré que l'un deux conformères

majoritaires comporte une interaction de ce type ⁵⁹. Leurs calculs au niveau B3LYP/6-31g(d) prédisent que ce mode de pliage du NH₃⁺ se situe à 1511 et 1507 cm⁻¹ (facteur spécifique et facteur du NIST), alors que le maximum d'une bande assez large est observé à 1516 cm⁻¹. Ceci corrobore *a priori* notre hypothèse, mais il faut cependant être prudent au vu de la basse résolution des spectres IRMPD. Un exemple de calcul au même niveau du même mode de vibration lorsque le groupement protoné est en interaction avec trois C=O est donné dans une publication récente de Vaden *et al.*: la fréquence est encore plus haute, cette fois à 1566 et 1562 cm⁻¹ (facteur spécifique et facteur du NIST).

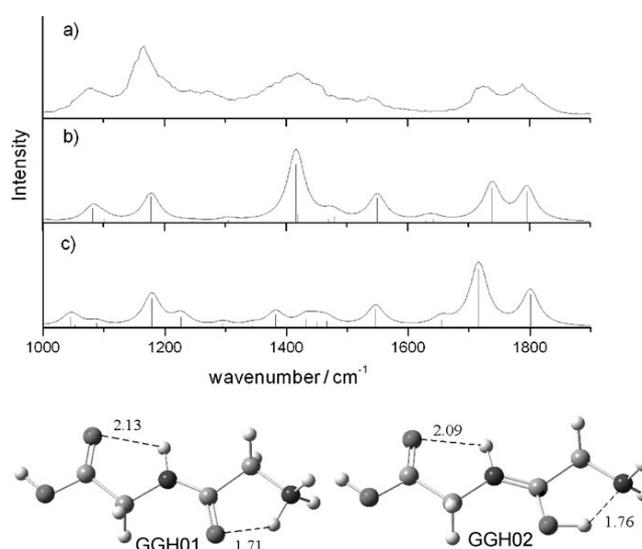


Figure 10: spectres IRMPD (a) et simulés (b et c) au niveau B3LYP/6-311+g(d,p) pour les deux plus bas conformères du peptide [GG+H⁺] représentés en bas de la figure (tirée de la référence ⁵⁷).

4.5 Détermination des facteurs d'échelle pour la méthode ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1

Alors que les systèmes protonés sont correctement décrits par la méthode B3LYP/6-31g(d), des problèmes apparaissent dès qu'on aborde les systèmes déprotonés. En effet, les sites de déprotonation en phase liquide sont le C terminal (pK_a ≈ 2) ainsi que les chaînes latérales des acides aminés acides (acide aspartique et glutamique, pK_a ≈ 4). Ces sites sont en fait des groupements carboxyles (COOH) qui deviennent des carboxylates lorsqu'ils sont déprotonés. Mais la charge négative ne reste pas localisée sur l'oxygène qui était lié au proton: elle se délocalise sur les deux liaisons CO équivalentes qui ont un caractère π prononcé. Il faut alors ajouter une fonction diffuse à la base d'orbitales atomiques utilisée pour le calcul des fréquences de vibration des modes des systèmes étudiés. Comme son nom l'indique, cette fonction a pour but de décrire les électrons délocalisés dont la probabilité de

présence loin du noyau n'est pas négligeable, notamment dans les anions ⁶⁰. Pour prédire les spectres IR des espèces comportant des groupements carboxylates, il faut donc utiliser la méthode B3LYP/6-31+g(d). Le signe « + » désigne une fonction diffuse de type s et une de type p ajoutées sur les tous les atomes sauf les hydrogènes, ce qui n'est *a priori* pas gênant puisque l'on veut décrire des groupements déprotonés sans hydrogène. Comme la base d'orbitales atomiques change, il faut calculer les nouveaux facteurs d'échelle spécifiques aux mêmes modes de vibration que précédemment, mais pour la méthode ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1. La méthode de calcul des facteurs ne change pas: il faut minimiser l'erreur arithmétique entre fréquences prédites et celles venant de la base de données expérimentales donnée en Annexe 1. Les résultats sont donnés en termes de facteurs d'échelles spécifiques (voir Tableau 5) et d'écart types des erreurs de prédiction (*cf.* Tableau 6) pour tous les modes précédents sauf l'élongation OH.

Pour tester la prédiction des fréquences des modes asymétrique et symétrique du groupement carboxylate, je me suis basé sur des données expérimentales qui viennent principalement de travaux récents de J. Oomens *et al.*, qui ont étudié par spectroscopie IRMPD un certain nombre d'espèces déprotonées, mais relativement petites. Je n'ai donc pas pu utiliser la méthode ONIOM sur ces ions, j'ai donc simulé leurs spectres IR à l'aide de la méthode B3LYP/6-31+g(d), et ai appliqué le même facteur d'échelle à ces modes qu'aux modes d'élongation des groupes C=O neutres (Les facteurs d'échelle pour cette méthode et cette base ont été calculés précédemment par l'équipe ³³). La moyenne des valeurs absolues des erreurs de prédiction entre les fréquences calculées et expérimentales est de 9,7 cm⁻¹, ce qui est acceptable (voir Tableau 7). J'ai donc fait l'hypothèse que le facteur d'échelle spécifique au mode d'élongation des groupes C=O mais déterminé pour la méthode ONIOM était valable pour les modes du groupe carboxylate. J'utiliserai donc ce facteur d'échelle et n'en introduirai pas de nouveaux pour ces modes.

Tableau 5: facteurs d'échelle spécifiques et facteur d'échelle global (moyenne des facteurs spécifiques) pour la méthode ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1.

Mode de vibration	$\nu(\text{NH}_2)_{\text{as}}$	$\nu(\text{NH}_2)_{\text{s}}$	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CO})$	$\gamma(\text{NH}_2)$	$\gamma(\text{NH})$	Facteur d'échelle global
B3LYP/6-31+g(d):AM1	0,958	0,958	0,960	0,975	0,966	0,965	0,964

Tableau 6: écarts types des erreurs de prédiction (en cm^{-1}) avec les facteurs d'échelle spécifiques et le facteur global donnés dans le Tableau 5 pour la méthode ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1.

Mode de vibration	$\nu(\text{NH}_2)_{\text{as}}$	$\nu(\text{NH}_2)_{\text{s}}$	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CO})$	$\gamma(\text{NH}_2)$	$\gamma(\text{NH})$	Facteur d'échelle global
B3LYP/6-31+g(d):AM1	7,5	9,1	27,4	6,6	4,7	8,1	20,7

Tableau 7: valeurs des erreurs de prédiction (en cm^{-1}) pour les fréquences de vibration des modes d'élongation symétrique et asymétrique du groupement carboxylate des anions donnés par la méthode B3LYP/6-31+g(d). Le X désigne une donnée expérimentale ambiguë et donc non prise en compte.

	Propionate	Benzoate	Phénylalanine	Tyrosine	Tryptophane	Cystéine	$[\text{RR}+\text{H}^+]$
$\nu(\text{COO}^-)_{\text{as}}$	-23,5	-17,1	9,6	2,7	-0,4	-2,3	-20,7
$\nu(\text{COO}^-)_{\text{s}}$	-24,3	-4,6	4,6	-2,4	-2,1	-12,4	X

III.5 Simulations de sections efficaces de collision

La technique expérimentale de mobilité ionique a été décrite dans le chapitre II de ce manuscrit et je vais à ici présenter le programme dont je me suis servi pour calculer les sections efficaces de collisions théoriques des systèmes moléculaires auxquels je me suis intéressé. Ce programme s'appelle Mobcal, fonctionne sous Linux et a été développé par le groupe de Martin Jarrold, aux Etats-Unis. Il permet de calculer la section efficace de collision d'un ion moléculaire avec un gaz rare, par 3 méthodes différentes:

- La première est la méthode d'approximation par projection, développée par M. T. Bowers et ses collaborateurs. Les atomes de l'ion étudié sont représentés par des sphères dures dont le rayon est égal à la distance de collision entre deux sphères dures, et la section efficace est calculée en faisant la moyenne des sections efficaces selon toutes les géométries de collision possibles.
- La seconde est la méthode exacte par diffusion de sphères dures (Exact Hard Sphere Scattering Method), qui traite les atomes comme la première, mais qui calcule la section efficace en moyennant sur un grand nombre de trajectoires possibles des atomes de gaz rentrant en collision avec l'ion ⁶¹.

- La méthode des trajectoires, quand à elle, calcule la section efficace comme la méthode précédente mais traite les interactions des atomes de l'ion étudié avec les atomes de gaz diffusants par un potentiel de Lennard-Jones plus un potentiel ion-dipôle variant en $\frac{1}{r^3}$ ⁶². Le potentiel effectif de l'ion est calculé en sommant toutes les contributions individuelles des atomes et les trajectoires de collisions entre atomes de gaz et ion sont calculées dans ce potentiel.

La première méthode ne prend pas en compte les collisions multiples et a donc tendance à sous-estimer les sections efficaces, alors que c'est le contraire pour la seconde, car elle surestime la contribution des collisions multiples. Pour les comparaisons avec l'expérience, j'ai donc uniquement utilisé la troisième méthode qui est la plus fiable d'après M. Jarrold.

Par ailleurs, il existe deux manières de simuler les spectres de mobilité ioniques: on peut avoir une conformation unique ou bien plusieurs pour le système considéré. Dans tous les cas, il faut représenter l'exploration de la PES par le système durant le trajet dans le tube de mobilité qui est, le plus souvent, à température ambiante. Si on a mené une dynamique moléculaire ou une recherche conformationnelle préalablement, on peut mettre plusieurs conformations dans le fichier d'entrée du programme. Celui-ci calcule la section efficace pour chacune d'entre elles et en fait une moyenne arithmétique. Le groupe de M. Jarrold considère que 50 conformations constituent une bonne moyenne en général, mais je n'en ai pris que 15 pour mes calculs, pour des raisons pratiques. De plus, une rapide étude m'a permis de montrer que, pour le peptide amyloïde β 1-28 quatre fois protoné, 15 conformations donnait une moyenne de $722,3 \text{ \AA}^2$, contre $722,5 \text{ \AA}^2$ pour 50 conformations. L'incertitude sur la mesure de la section efficace étant de quelques Å^2 , limiter le nombre de structures à 15 n'a alors qu'une incidence négligeable. Dans le cas d'une conformation unique, il faut augmenter d'un facteur 50 le nombre de trajectoires sur lesquelles la section efficace est calculée. Dans la pratique, il suffit de deux fichiers pour faire fonctionner le programme, plus un exécutable Fortran. Le premier fichier contient les structures, le nombre d'atomes et les charges partielles atomiques, et le second permet de définir les noms des fichiers d'entrée et de sortie. Le calcul prend quelques heures pour le peptide amyloïde β 1-28 (447 atomes pour l'état de charge 4+ par exemple) dans le cas de 15 structures mais une journée pour une configuration unique. Ceci peut paraître surprenant, mais il faut se rappeler qu'un calcul sur un conformère unique

requiert un nombre de trajectoires plus élevé que sur une série de 15 conformères et le temps de calcul augmente beaucoup.

III.6 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, j'ai présenté diverses méthodes de modélisation dont je me suis servi pour mener à bien ce travail de thèse. Les logiciels de recherche de conformations et de dynamique moléculaire par champ de force sont utiles pour explorer la surface d'énergie potentielle du système considéré et ainsi en tirer des familles de conformères bien distinctes. Leurs spectres IR peuvent alors être simulés grâce aux méthodes de chimie quantique comme ONIOM, dont j'ai évalué la précision des prédictions à mieux que 1 % en termes de fréquences de vibration, et comparés aux résultats des expériences de spectroscopie IRMPD. Leurs sections efficaces de collision peuvent également être calculées par d'autres méthodes, et comparées aux spectres de mobilité ionique pour en déduire des informations structurales.

- (1) Paton, R. S.; Goodman, J. M. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2009**, *49*, 944.
- (2) Jurecka, P.; Sponer, J.; Cerny, J.; Hobza, P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 1985.
- (3) Valdes, H.; Spiwok, V.; Rezac, J.; Reha, D.; Abo-Riziq, A. G.; de Vries, M. S.; Hobza, P. *Chemistry-a European Journal* **2008**, *14*, 4886.
- (4) Reha, D.; Valdes, H.; Vondrasek, J.; Hobza, P.; Abu-Riziq, A.; Crews, B.; de Vries, M. S. *Chemistry-a European Journal* **2005**, *11*, 6803.
- (5) Goodman, J. M.; Clark Still, W. *Journal of Computational Chemistry* **1991**, *12*, 1110.
- (6) Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 4379.
- (7) Kolossvary, I.; Guida, W. C. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 5011.
- (8) Saunders, M.; Houk, K. N.; Wu, Y. D.; Still, W. C.; Lipton, M.; Chang, G.; Guida, W. C. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 1419.
- (9) Polak, E.; Ribiere, G. *Revue Francaise d'Informatique et de Recherche Operationelle, Serie Rouge* **1969**, *16*, 35.
- (10) Stearns, J. A.; Boyarkin, O. V.; Rizzo, T. R. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 13820.
- (11) Gregoire, G.; Gaigeot, M. P.; Marinica, D. C.; Lemaire, J.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, *9*, 3082.
- (12) Nancias, M.; Chinchio, M.; Oldziej, S.; Czaplewski, C.; Scheraga, H. A. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26*, 1472.
- (13) Chebaro, Y.; Mousseau, N.; Derreumaux, P. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 7668.
- (14) Becke, A. D. *Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648.
- (15) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Physical Review B* **1988**, *37*, 785.
- (16) Collins, J. B.; Schleyer, P. v. R.; Binkley, J. S.; Pople, J. A. *The Journal of Chemical Physics* **1976**, *64*, 5142.
- (17) Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. *The Journal of Chemical Physics* **1971**, *54*, 724.
- (18) Schafer, A.; Horn, H.; Ahlrichs, R. *The Journal of Chemical Physics* **1992**, *97*, 2571.
- (19) Eichkorn, K.; Treutler, O.; Öhm, H.; Häser, M.; Ahlrichs, R. *Chemical Physics Letters* **1995**, *242*, 652.
- (20) Elstner, M. *Theoretical Chemistry Accounts* **2006**, *116*, 316.
- (21) Warshel, A.; Levitt, M. *Journal of Molecular Biology* **1976**, *103*, 227.
- (22) Park, H.; Brothers, E. N.; Merz, K. M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 4232.
- (23) Hammes-Schiffer, S. K., M. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 10435.
- (24) Lin H., T. D. G. *Theoretical Chemistry Accounts* **2007**, *117*, 185.
- (25) Dapprich, S.; Komaromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **1999**, *461*, 1.
- (26) Svensson, M.; Humbel, S.; Morokuma, K. *The Journal of Chemical Physics* **1996**, *105*, 3654.
- (27) Maseras, F. M., K. *Journal of Computational Chemistry* **1995**, *16*, 1170.
- (28) Yuk Yin Sham, Z. T. C., Holly Tao, Arie Warshel, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **2000**, *39*, 393.
- (29) Antes, I.; Thiel, W. *The Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 9290.
- (30) Zhang, Y.; Lee, T.-S.; Yang, W. *The Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 46.
- (31) Klähn, M.; Schlitter, J.; Gerwert, K. *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 3829.
- (32) Frisch, M.; Trucks, J., G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian; Revision B03 ed.; Gaussian, I., Ed. Pittsburgh, PA, 2003.*
- (33) Bouteiller, Y.; Gillet, J. C.; Gregoire, G.; Schermann, J. P. *Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 11656.
- (34) Bouteiller, Y.; Pouilly, J. C.; Desfrancois, C.; Gregoire, G. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 6301.

- (35) Chin, W.; PiuZZi, F.; Dimicoli, I.; Mons, M. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 1033.
- (36) Chin, W.; Dognon, J. P.; PiuZZi, F.; Tardivel, B.; Dimicoli, I.; Mons, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 707.
- (37) Chin, W. *Thèse de doctorat* **2006**, Université Paris 11, Orsay.
- (38) Snoek, L. C.; Kroemer, R. T.; Hockridge, M. R.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, *3*, 1819.
- (39) Snoek, L. C.; Robertson, E. G.; Kroemer, R. T.; Simons, J. P. *Chemical Physics Letters* **2000**, *321*, 49.
- (40) Talbot, F. O.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*, 3562.
- (41) Jockusch, R. A.; Talbot, F. O.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2003**, *5*, 1502.
- (42) Hunig, I.; Painter, A. J.; Jockusch, R. A.; Carcabal, P.; Marzluff, E. M.; Snoek, L. C.; Gamblin, D. P.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7*, 2474.
- (43) Carcabal, P.; Patsias, T.; Hunig, I.; Liu, B.; Kaposta, C.; Snoek, L. C.; Gamblin, D. P.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 129.
- (44) Carteret, C.; Labrosse, A.; Assfeld, X. *Spectrochimica Acta Part A* **2007**, *67*, 1421.
- (45) Contreras-Torres, F. F.; Basiuk, V. A. *Spectrochimica Acta Part A* **2007**, *61*, 2560.
- (46) Bruice, T. C.; Kahn, K. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 540.
- (47) Claeysens, F. K. E. R., Frederick R. Manby, Jeremy N. Harvey and Adrian J. Mulholland. *Chemical Communications* **2005**, 5068.
- (48) Dannenberg, R. W. a. J. J. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 1320.
- (49) Salvador, P. A., A. Dannenberg, J. J. *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 7462.
- (50) Wann, B.; Ruangpornvisuti, V. *Journal of molecular structure (TheoChem)* **2004**, *685*, 57.
- (51) Carauta, A. N. M.; de Carneiro, J. W.; Tellez Soto, C. A. *International Journal of Quantum Chemistry* **2005**, *103*, 763.
- (52) Tschumper, G. S. *Chemical Physics Letters* **2006**, *427*, 185.
- (53) Deng, W.; Vreven, T.; Frisch, M. J.; Wiberg, K. B. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2006**, *775*, 93.
- (54) Wiczorek, R.; Dannenberg, J. J. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 1320.
- (55) Wiczorek, R.; Dannenberg, J. J. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 17216.
- (56) Andersen, J. U.; Bonderup, E.; Hansen, K. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 6518.
- (57) Wu, R.; Terry B. McMahon. *Chemistry - a European Journal* **2008**, *14*, 7765.
- (58) Marinica, D. C.; Gregoire, G.; Desfrancois, C.; Schermann, J. P.; Borgis, D.; Gaigeot, M. P. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 8802.
- (59) Polfer, N. C.; Oomens, J.; Suhai, S.; Paizs, B. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 5887.
- (60) Clark, T.; Jayaraman Chandrasekhar; Günther W. Spitznagel; Paul Von Ragué Schleyer. *Journal of Computational Chemistry* **1983**, *4*, 294.
- (61) Shvartsburg, A. A.; Jarrold, M. F. *Chemical Physics Letters* **1996**, *261*, 86.
- (62) Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F. *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 16082.

Chapitre IV: Etude structurale du peptide AGWLK protoné

IV.1 Introduction

Le peptide AGWLK a été choisi par l'équipe pour étudier les interactions intra-moléculaires non-covalentes dans ce peptide protoné une et deux fois au moyen de plusieurs techniques expérimentales (CID, IRMPD, ECD et LID) et théoriques. En effet, sa taille (5 acides aminés et 85 atomes) permet de mener des calculs poussés de chimie quantique permettant une prédiction précise du spectre d'absorption IR, et des recherches conformationnelles rapides et sondant de manière poussée l'espace des conformations. Les sites de protonation les plus probables sont l'azote terminal et le groupement NH_2 de la chaîne latérale de la lysine. L'affinité protonique de ce dernier étant supérieure au N-terminal au vu de leurs pKa mesurés pour les acides aminés isolés, j'ai fait l'hypothèse que le monocation est protoné majoritairement sur la chaîne latérale de la lysine en phase gazeuse. L'étude du peptide [RGD+H] en phase gazeuse par l'équipe avant mon arrivée a par ailleurs montré que le site de protonation est l'arginine, qui a un pKa plus faible que celui de la lysine, ce qui justifie également notre hypothèse. Il est très probable que le dication soit pour sa part protoné sur la lysine et le N-terminal car il n'existe pas d'autres sites basiques. La présence de trois acides aminés hydrophobes (Alanine, glycine et leucine) permet de réduire les possibilités de liaisons H intra-moléculaires et d'étudier leur influence sur les différentes propriétés physiques et chimiques du peptide isolé. Enfin, l'intérêt du groupement indole du tryptophane est qu'il absorbe les photons UV, aussi bien en solution (entre 240 et 300 nm), et le spectre expérimental du tryptophane protoné isolé a été mesuré par plusieurs groupes, notamment celui de R. Weinkauf, et consiste en une large bande centrée sur 285 nm^{1,2}. L'absorption d'un photon est induite par une transition électronique de l'état fondamental S_0 au premier état excité S_1 et induit, entre autres, une perte d'hydrogène directe à l'état excité en formant le radical Trp^+ , fragmentation de type non-statistique, c'est-à-dire que l'énergie n'a pas le temps de se redistribuer entre tous les modes de vibrations (IVR). Dans la référence³, l'équipe en collaboration avec d'autres groupes a montré qu'il existe une nette différence de comportement après absorption d'un photon de 266 nm de longueur d'onde entre les ions [AGWLK+H] et [AGWLK+2H]: celui-ci a une probabilité de fragmentation près de 50 fois *inférieure* à celle du monocation. La photo-fragmentation du tryptophane protoné seul dans les mêmes conditions a été étudiée dans la référence⁴. Le résultat principal a été la mise en évidence d'une voie de fragmentation spécifique à l'excitation UV, la perte d'hydrogène.

L'état localement excité de nature $\pi\text{-}\pi^*$ est couplé avec un état électronique excité de type $\pi\text{-}\sigma^*$ où l'électron est localisé sur une orbitale de Rydberg autour du groupement NH_3^+ . Cet état est dissociatif suivant la coordonnée d'élongation N-H mais croise aussi l'état électronique fondamental, conduisant soit à la perte d'un atome d'hydrogène directement à l'état excité, soit à la conversion interne rapide caractérisée par les voies de fragmentations observées notamment en CID. Pour être efficace, ce mécanisme implique un couplage fort entre les deux états électroniques, qui dépend de la distance entre la charge et l'indole: plus celle-ci est élevée, plus le couplage est faible. Or des simulations de dynamique moléculaire par échange de répliques (REMD) ont été effectuées et ont montré que l'indole est pour la majorité des conformations à environ 4 Å du NH_3^+ pour le monocation et à 8 Å pour le dication. Une hypothèse plausible est donc que la dissociation est réduite dans le dication à cause de l'augmentation de la distance entre l'indole et la charge. Un autre résultat intéressant tiré de cette étude est qu'on n'observe pas d'ions c et z par dissociation après capture d'électron (ECD) (*cf.* Figure 1 où les lettres désignent les ions formés lorsque la charge se trouve du côté de la lettre par rapport à la liaison rompue, symbolisée par les pointillés: par exemple un ion a_1 est produit lorsque la charge se trouve à gauche des pointillés). Ces ions c et z sont habituellement produits par ECD sur des peptides, mais pas par dissociation induite par collisions (CID), où les ions b et y dominent les spectres de masse. Cette absence de fragmentation typique de l'ECD est curieuse, et les auteurs ont tenté de l'expliquer en mettant en avant le fait que, d'après les simulations de dynamique moléculaire, les deux groupements NH_3^+ du dication sont peu solvatés par les groupements carbonyles des liaisons peptidiques. En effet, un des mécanismes de production d'ions c et z couramment cité est le transfert d'hydrogène sur liaison amide, ce qui est hautement favorisé par une liaison H entre celle-ci et un groupement NH_3^+ .

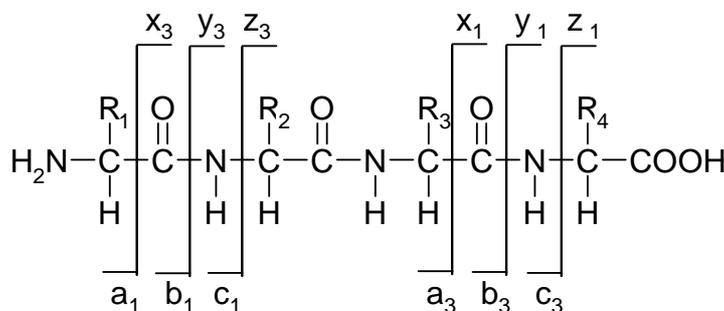


Figure 1: Nomenclature des ions produits par fragmentation de peptides. Les groupements symbolisés par R_n sont les chaînes latérales.

A l'époque où cette étude avait été faite, les données expérimentales issues de l'IRMPD n'avaient pas pu être interprétées en raison du manque de capacités de calcul. L'achat de la grappe de PC ainsi que la collaboration avec Florent Calvo du LASIM à Lyon ayant abouti à l'élaboration par celui-ci et la mise à disposition d'un programme de REMD pour notre équipe durant ma thèse ont ouvert de nouvelles possibilités en terme de moyens de calcul de chimie quantique et de recherches conformationnelles. J'ai donc tenté d'obtenir des informations structurales complémentaires à celles issues des recherches précédentes sur les deux états de charge du peptide AGWLK.

IV.2 Résultats

2.1 Commentaire sur la précision des calculs d'énergie et de fréquences effectués

Tous les spectres simulés pour cette étude l'ont été au niveau B3LYP/6-31g(d). Les fréquences des modes de vibrations entre 1000 et 2000 cm^{-1} ont été mises à l'échelle avec le facteur d'échelle global du NIST (0,960). Les énergies potentielles ont été calculées au niveau MP2/6-31g(d) après optimisation au niveau B3LYP/6-31g(d). Les énergies libres, quand à elles, nécessitent un calcul de fréquences, et ont donc été simulées au même niveau. La description des méthodes théoriques ainsi que les commentaires sur la précision attendue se trouvent dans le chapitre III de cette thèse.

2.2 Le monocation

Une recherche de conformations systématique avec le champ de force MMFF avec le logiciel MacroModel a été effectuée. Le fonctionnement du programme est décrit en détails dans le chapitre III de cette thèse. 10000 structures ont été générées, 1307 conformations distinctes de plus d' 1\AA en RMSD ont été trouvées entre 0 et 84 kJ/mol. Les 500 plus basses ont été sauvegardées, et parmi elles, seulement 59 possèdent une interaction NH_3^+/π (indole), et se trouvent plutôt dans les hautes énergies (calculées en MMFF). Un regroupement effectué grâce au logiciel XCluster (*cf.* chapitre III) sur les 175 premières conformations donne six familles de conformations bien séparées, dont trois avec l'ammonium en interaction avec l'indole. Parmi les six familles issues du regroupement, la conformation la plus basse est notée C1, et son spectre est superposé au spectre IRMPD dans la Figure 2. Elle présente une

interaction NH_3^+/π . L'accord est bon pour les bandes de pliage NH et d'élongation C=O libre, mais la bande due aux modes impliquant des liaisons C=O liées est mal reproduite.

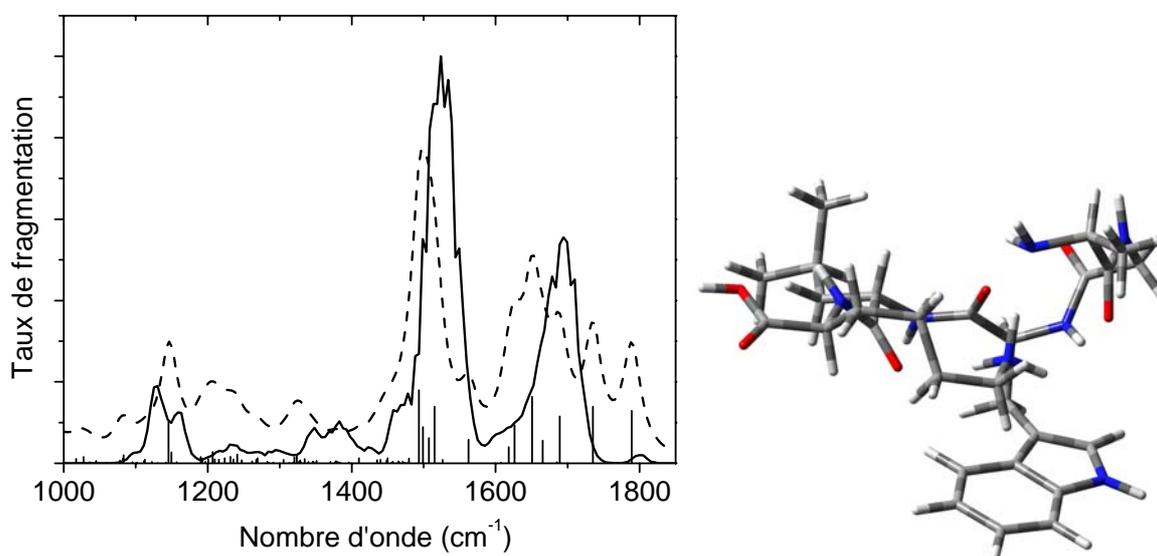


Figure 2: structure (à droite) et spectre IRMPD superposé au spectre simulé au niveau B3LYP/6-31g(d) (à gauche) du conformère C1 du peptide [AGWLK+H⁺].

Une recherche de conformation systématique avec le champ de force OPLS a été faite après la première. Le conformère dont le spectre simulé reproduit le mieux le spectre IRMPD est issu de cette recherche, il sera noté C3. Son spectre est présenté dans la Figure 3. Son énergie potentielle est à $48,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ au-dessus de C1, son énergie libre à 300K est plus élevée de $3,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$, et elle présente une interaction NH_3^+/π , bien qu'elle soit plus faible que pour C1 ($5,5 \text{ \AA}$ entre l'azote de NH_3^+ et celui de l'indole, contre $4,6 \text{ \AA}$). L'accord global avec l'expérience est bon, malgré un décalage de 13 cm^{-1} de la bande due aux modes d'élongation des liaisons C=O. On peut cependant remarquer que la bande qui apparaît expérimentalement à 1800 cm^{-1} et qui est due à l'absorption de la liaison C=O libre du groupement COOH, est systématiquement prédite par le calcul à 1781 cm^{-1} . Le facteur d'échelle global du NIST semble donc inadapté ici. Si l'on multiplie le maximum de la bande amide 1 par $\frac{1800}{1781} = 1,011$, on obtient 1699 cm^{-1} , ce qui est très proche de la valeur expérimentale.

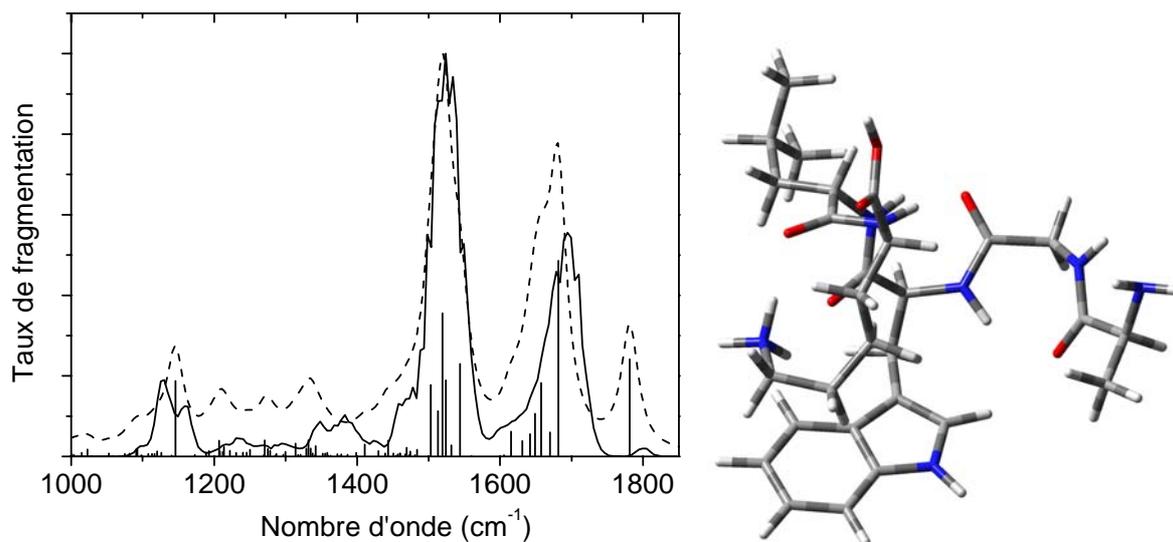


Figure 3: structure (à droite) et spectre IRMPD superposé au spectre simulé au niveau B3LYP/6-31g(d) (à gauche) du conformère C3 du peptide [AGWLK+H⁺].

La Figure 4 montre le spectre d'une conformation identique à C3 (notée C4) mais avec l'indole à 7 Å du groupement NH₃⁺. On voit clairement la bande des modes de pliage des groupements NH se décaler vers le bleu, et celle des modes d'élongation des liaisons C=O s'élargir vers le rouge. L'énergie potentielle monte à 62,5 kJ.mol⁻¹ au-dessus de celle du conformère C1. On voit clairement deux bandes principales entre 1100 et 1200 cm⁻¹, alors que le calcul n'en prédit qu'une, correspondant au pliage de la liaison OH du groupement COOH terminal. C4 est par contre le conformère qui reproduit le mieux la large bande peu intense entre 1300 et 1400 cm⁻¹, attribuable à des modes de pliage des liaisons CH plutôt délocalisés et peu spécifiques d'une structure particulière.

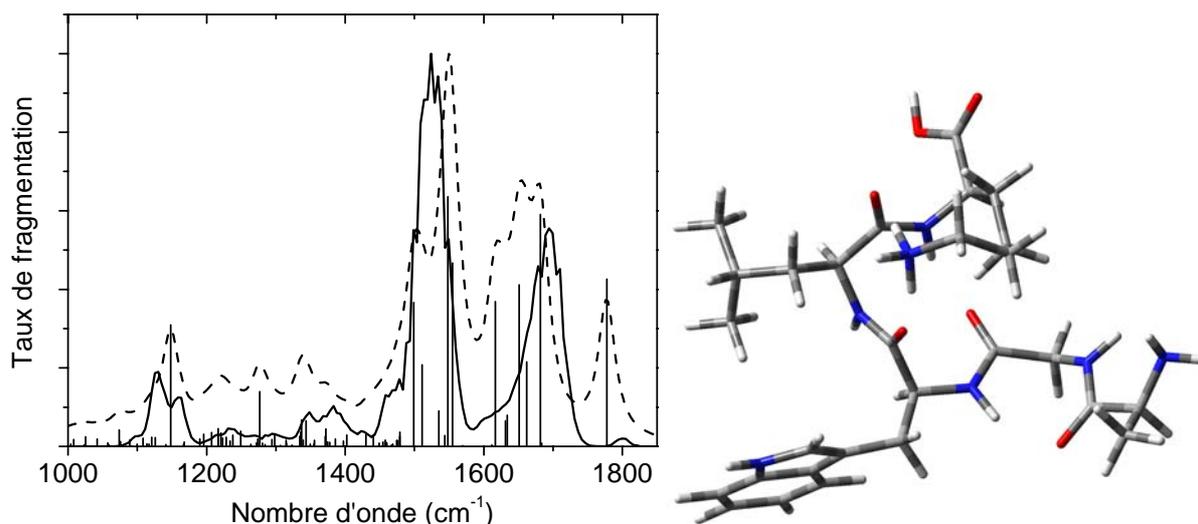


Figure 4: structure (à droite) et spectre IRMPD superposé au spectre simulé au niveau B3LYP/6-31g(d) (à gauche) du conformère C4 du peptide [AGWLK+H⁺].

Sur la Figure 5 on voit le spectre de la conformation C2 et sa structure, à 15,6 kJ.mol⁻¹ au-dessus de C1. Le groupement ammonium est solvate par trois liaisons C=O, et il n'y a pas d'interaction NH₃⁺/π. La bande des modes d'élongation C=O est trop large dans les bas nombres d'onde par rapport au spectre IRMPD.

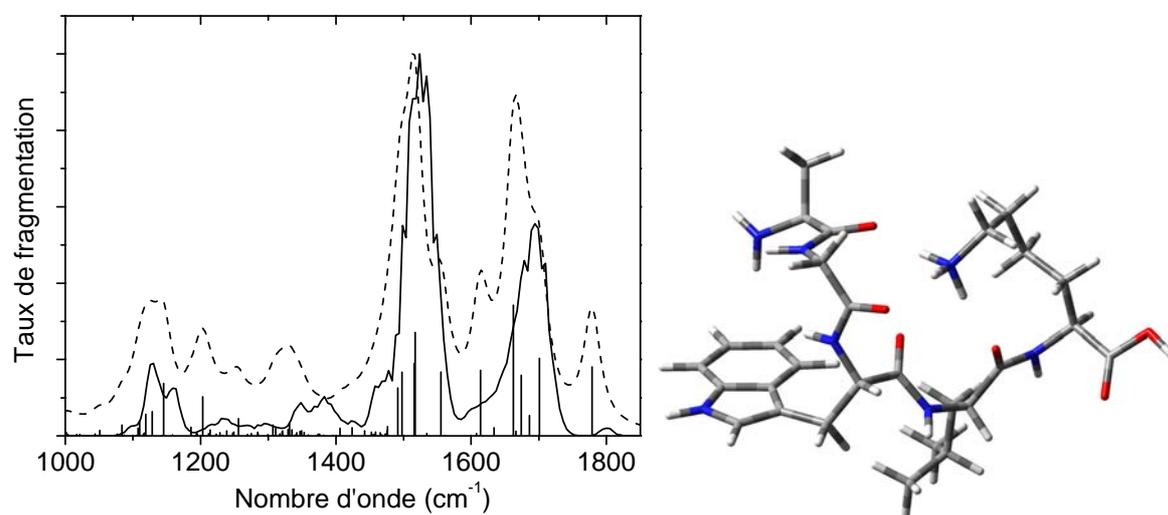


Figure 5: structure (à droite) et spectre IRMPD superposé au spectre simulé au niveau B3LYP/6-31g(d) (à gauche) du conformère C2 du peptide [AGWLK+H⁺].

Lorsqu'on considère les énergies libres à 300 K, c'est-à-dire à la température de l'expérience IRMPD, l'ordre des conformations devient: C2 (0 kJ.mol⁻¹), C1 (0,05), C3 (35,5) et C4 (38,5).

2.3 Le dication

La même méthodologie a été appliquée à l'étude du peptide doublement chargé. Une recherche de conformation identique à celle effectuée pour le monocation a été faite, 2457 conformères distincts ont été trouvés. Parmi les 500 retenus, 337 présentent une interaction NH₃⁺/π, et parmi ceux-là, 289 impliquent le N terminal. Un regroupement des 50 conformères les plus bas en énergie donne 10 familles bien distinctes. La moitié contiennent une interaction NH₃⁺/π, elles se situent plutôt dans les basses énergies, et quatre impliquent le N terminal.

La conformation la plus basse en énergie (notée C1) a un spectre (*cf.* Figure 6) qui rend compte de la majorité des bandes présentes dans l'expérience, mais la présence d'autres conformères ne peut être complètement exclue, surtout celui noté C2 (*cf.* Figure 7) qui est situé seulement à 3 kJ.mol⁻¹ au-dessus du conformère C1 en énergie, et dont la bande à 1500 cm⁻¹ reproduit mieux l'expérience que C1. Les conformations C3 et C4 sont à 12,5 et 17,8 kJ.mol⁻¹ en énergie au-dessus du conformère C1, leurs spectres IR et leurs structures sont présentés dans la Figure 8 et la Figure 9. Une structure plus dépliée (notée C5) ainsi que son spectre IR sont présentés dans la Figure 10. Son énergie est située 36,4 kJ.mol⁻¹ au-dessus de celle de la conformation C1, et son spectre contient la même bande caractéristique du mode de pliage symétrique du NH₃⁺ terminal que dans celui du conformère C4, qui est absente de l'expérience. Lorsqu'on considère les énergies libres à 300 K, l'ordre devient: C4 (0 kJ.mol⁻¹), C2 (16), C5 (23,3), C1 (25,3) et C3 (34). Il existe une interaction NH₃⁺/π dans C1 et C4.

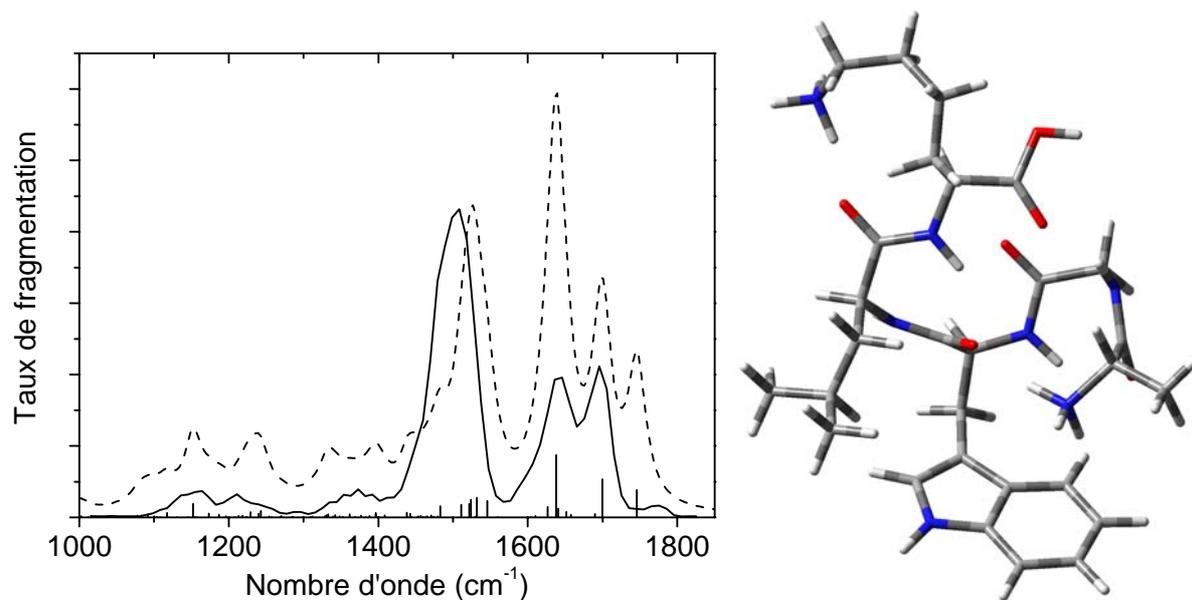


Figure 6: structure (à droite) et spectre IRMPD superposé au spectre simulé au niveau B3LYP/6-31g(d) (à gauche) du conformère C1 du peptide [AGWLK+2H⁺].

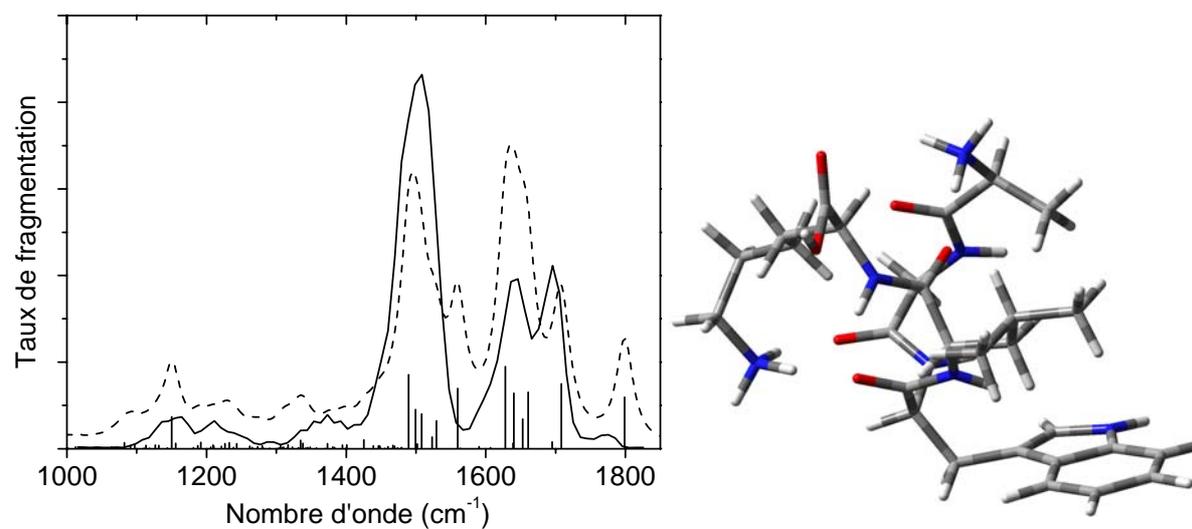


Figure 7: structure (à droite) et spectre IRMPD superposé au spectre simulé au niveau B3LYP/6-31g(d) (à gauche) du conformère C2 du peptide [AGWLK+2H⁺].

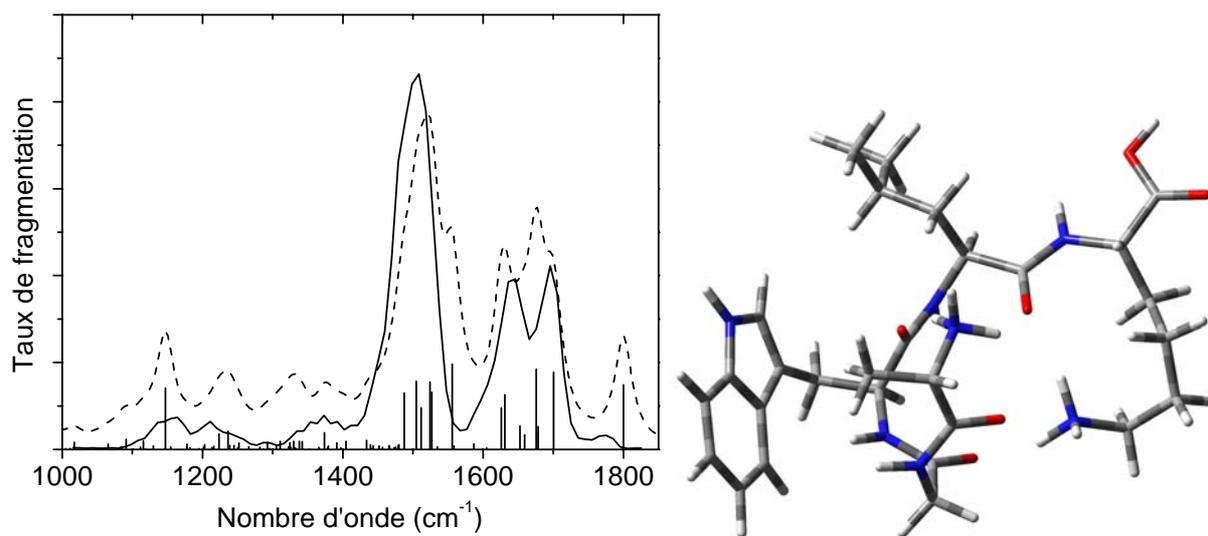


Figure 8: structure (à droite) et spectre IRMPD superposé au spectre simulé au niveau B3LYP/6-31g(d) (à gauche) du conformère C3 du peptide [AGWLK+2H⁺].

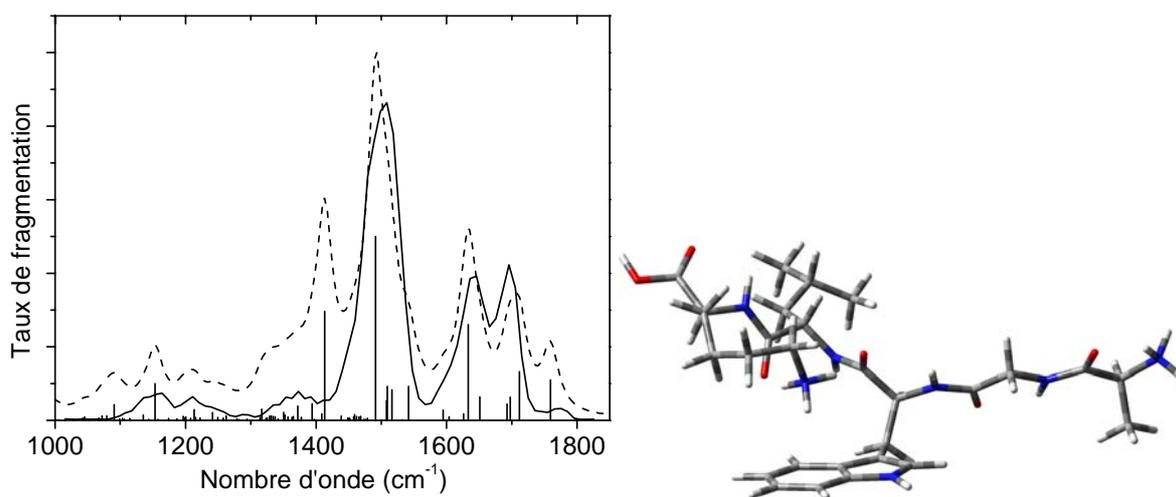


Figure 9: structure (à droite) et spectre IRMPD superposé au spectre simulé au niveau B3LYP/6-31g(d) (à gauche) du conformère C4 du peptide [AGWLK+2H⁺].

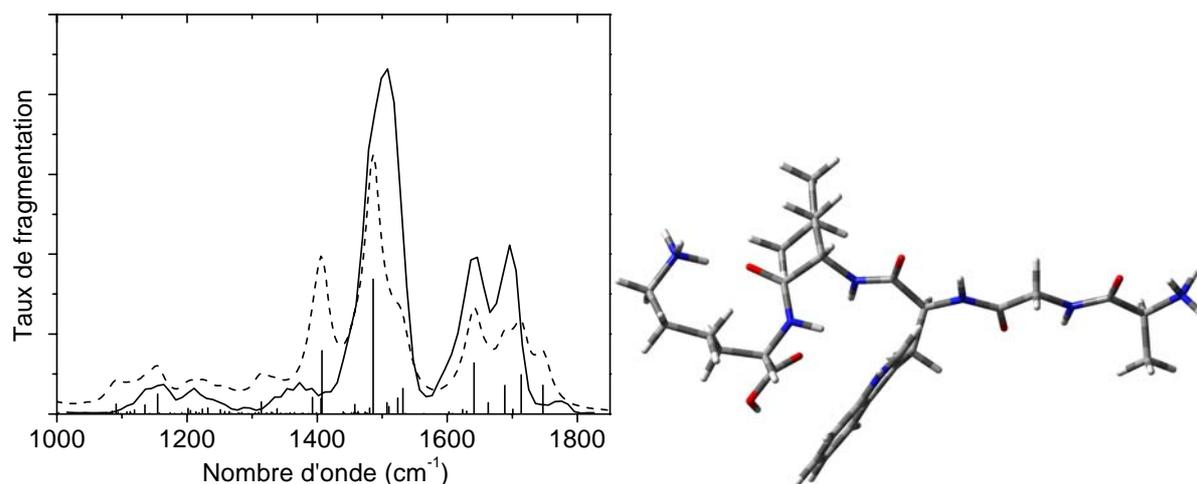


Figure 10: structure (à droite) et spectre IRMPD superposé au spectre simulé au niveau B3LYP/6-31g(d) (à gauche) du conformère C5 du peptide [AGWLK+2H⁺].

IV.3 Discussion

Les résultats de cette étude sont relativement clairs pour le monocation, où seule la conformation C3 reproduit correctement les deux bandes les plus intenses du spectre IRMPD, tout en décrivant de façon satisfaisante les autres bandes. On pourrait s'étonner des énergies potentielle et libre calculées au niveau MP2/6-31g(d), qui sont respectivement situées à 48,8 et 35,5 kJ.mol⁻¹ au-dessus du minimum trouvé, mais il faut garder en tête que l'énergie vibrationnelle interne contenue dans un ion de la taille de AGWLK est de l'ordre de 100 kJ.mol⁻¹ (calcul réalisé avec un modèle de répartition statistique ⁵), ce qui permet à celui-ci d'explorer la surface d'énergie potentielle. En ce qui concerne le peptide doublement protoné, des arguments spectroscopiques permettent d'éliminer les conformères C4 et C5, en raison de la bande du mode de pliage du groupement NH₃⁺ de l'azote terminal absente de l'expérience, et ce bien que leurs énergies libres soient parmi les trois plus basses des conformères étudiés. Ceci est dû à leur structure étendue qui abaisse l'entropie du système. Le conformère C3 possède un spectre en accord global avec l'expérience, comme les conformères C1 et C2, qui ont les deux plus basses énergies potentielles. Ce sont donc ces trois structures qui ont la plus grande probabilité d'être peuplées.

La question à laquelle il faut maintenant répondre est: ces résultats permettent-ils d'en savoir plus quand à l'absence de fragmentation des ions [AGWLK+2H⁺] en LID et d'ions c et z en ECD? Tout d'abord, on peut constater que le conformère reproduisant le mieux l'expérience en ce qui concerne le peptide une fois protoné possède une interaction charge-indole forte (distance 5,5 Å), ce qui est cohérent avec un couplage fort des deux états

impliqués dans le modèle proposé par notre équipe et nos collaborateurs ³. Lorsqu'on ajoute un second proton à ce peptide, la situation est moins nette mais deux structures (C2 et C3) sur les trois dont le spectre IR est compatible avec l'expérience ne présentent pas cette interaction, donc le couplage sera beaucoup plus faible et la fragmentation moins efficace, ce qui va également dans le sens du modèle... Ensuite, concernant les expériences d'ECD, les conclusions sont plus difficiles à tirer car il existe plusieurs modèles pour le mécanisme de fragmentation menant aux ions c et z. Le plus ancien a été proposé par Kruger *et al.* et consiste en une capture d'électron par un des groupements chargés suivi d'un transfert d'hydrogène vers l'oxygène d'une liaison amide induisant une rupture de la liaison N-C_α ⁶. Cependant, un mécanisme intéressant et abondamment étudié est celui de la capture directe de l'électron par l'oxygène d'une liaison amide suivie par un transfert de *proton*, proposé par F. Tureček dans la référence ⁷. Ce mécanisme permet notamment d'expliquer la production d'ions c et z dans les complexes de peptides avec une couronne d'éther où le transfert d'hydrogène est bloqué par gêne stérique. Dans les conformères C2 et C3, tous les groupements C=O des liaisons amides sont engagés dans des liaisons H fortes avec au moins un groupement chargé, l'électron est donc fortement attiré vers ces charges, la capture devenant coulombienne, et la voie de fragmentation privilégiée est la perte d'hydrogène, abaissant fortement la production d'ions c et z. La perte d'ammoniaque (NH₃) est une voie de fragmentation typique de l'ECD, mais elle n'est pas présente dans le cas de [AGWLK+2H⁺]. Dans une publication récente ⁸, J. Chamot-Rooke *et al.* observent le même phénomène dans des dipeptides doublement chargés mais une fois *protonés* sur la chaîne latérale d'une lysine, l'autre charge venant d'un groupe se fixant sur le N-terminal, et l'expliquent par des calculs ayant montré que l'énergie d'activation de la perte d'ammoniaque est plus grande pour la chaîne latérale que pour le N-terminal ⁹. Dans notre cas, les deux sites sont protonés, on ne peut donc pas avancer cet argument. Une étude de dipeptides doublement protonés en ECD montre que la perte d'ammoniaque provient presque exclusivement du N-terminal ¹⁰, ce qui corrobore les calculs en question, et amène à la conclusion suivante: dans le cas du peptide AGWLK, soit l'électron est capturé uniquement sur la chaîne latérale, ce qui paraît curieux, soit la structure inhibe cette voie de fragmentation. La dernière hypothèse semble plus plausible, car les dipeptides ont une structure plus dépliée car les groupements chargés ne peuvent pas former de nombreuses liaisons H donc les conformères où les deux charges sont proches possèdent une énergie potentielle très haute. L'équipe de G. Van der Rest, au Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, tente en ce moment de comprendre pourquoi la

fragmentation par absorption de photons ou capture d'électron est particulière dans le cas du peptide AGWLK.

- (1) Nolting, D.; Marian, C.; Weinkauff, R. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 2633.
- (2) Boyarkin, O. V.; Mercier, S. R.; Kamariotis, A.; Rizzo, T. R. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2816.
- (3) Antoine, R.; Broyer, M.; Chamot-Rooke, J.; Dedonder, C.; Desfrancois, C.; Dugourd, P.; Gregoire, G.; Juvet, C.; Onidas, D.; Poulain, P.; Tabarin, T.; van der Rest, G. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 1648.
- (4) Kang, H.; Juvet, C.; Dedonder-Lardeux, C.; Martrenchard, S.; Gregoire, G.; Desfrancois, C.; Schermann, J. P.; Barat, M.; Fayeton, J. A. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7*, 394.
- (5) Andersen, J. U.; Bonderup, E.; Hansen, K. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 6518.
- (6) Kruger, N. A.; Zubarev, R. A.; Horn, D. M.; McLafferty, F. W. *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *187*, 787.
- (7) Syrstad, E. A.; Turecek, F. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 208.
- (8) Chamot-Rooke, J.; Malosse, C.; Frison, G.; Turecek, F. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*, 2146.
- (9) Yao, C.; Syrstad, E. A.; Turecek, F. *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 4167.
- (10) Holm, A. I. S.; Hvelplund, P.; Kadhane, U.; Larsen, M. K.; Liu, B.; Nielsen, S. B.; Panja, S.; Pedersen, J. M.; Skrydstrup, T.; Stochkel, K.; Williams, E. R.; Worm, E. S. *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 9641.

Chapitre V: La vancomycine et ses complexes

V.1 Introduction

La vancomycine est un produit naturel qui est synthétisé par certains micro-organismes et qui fut découvert dans les années 1950. C'est depuis un médicament de dernier recours pour le traitement des maladies infectieuses dues aux bactéries Gram +, qui n'ont qu'une seule membrane cellulaire, comme par exemple un type particulier de *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) qui est résistant à la méthicilline. La vancomycine se fixe sur le précurseur d'un pentapeptide du type peptidoglycane qui constitue la membrane de la cellule bactérienne et inhibe sa synthèse, ce qui induit la rupture de la membrane et donc la mort de la bactérie ¹. L'usage de ce médicament induit une sélection naturelle des bactéries les plus résistantes à celui-ci, c'est pourquoi une compréhension accrue des mécanismes de fixation de la vancomycine à son récepteur peut aider à développer de nouveaux médicaments.

Dans les années 1980, des études de cristallographie confirmèrent que la partie réceptrice du peptidoglycane est composée de trois acides aminés, K^DA^DA, la lettre D désignant le diastéréoisomère R de l'acide aminé alanine par rapport au carbone asymétrique α , noté C α . Le diastéréoisomère S (celui présent dans la majorité des cas) est désigné par la lettre L. La vancomycine elle-même comporte 176 atomes et est composée d'une pseudo-chaîne peptidique dont les extrémités N-terminal et C-terminal sont reliées par un pont de trois cycles benzéniques dont deux possèdent un atome de chlore substituant un hydrogène. Le troisième cycle est pour sa part substitué par un groupement sucre. Deux groupes phénols sont également reliés entre eux et à la chaîne peptidique. La structure de Lewis de la vancomycine est dessinée dans la Figure 1 (dans la suite, V désignera la forme neutre non-zwitterionique de la vancomycine telle qu'elle apparaît dans cette figure). Les complexes non-covalents de la vancomycine avec divers récepteurs sont des systèmes modèles qui ont été étudiés par de nombreux groupes afin de mieux comprendre la reconnaissance moléculaire entre médicaments et récepteurs biologiques. Les constantes d'affinité de ces complexes ont été déterminées expérimentalement par RMN ², spectrophotométrie ³⁻⁶, et électrophorèse capillaire, grâce à laquelle la constante d'affinité de la vancomycine avec le précurseur dont j'ai parlé précédemment (appelé UDP-N-acetylmuramyl-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) a été mesurée à $1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ⁷. Ces constantes dépendent du solvant ⁸ et du pH ⁹. Il a également été montré que la reconnaissance de la vancomycine par le peptide KAA était fortement stéréospécifique. En effet, la séquence K^DA^DA possède une constante d'affinité en solution de

8.10^5 M^{-1} , alors que les peptides modèles se terminant par $\text{K}^{\text{L}}\text{A}^{\text{L}}\text{A}$ ne forment pas de complexes avec la vancomycine ³. L'attachement du récepteur à la vancomycine est assuré par un réseau de liaisons H, dont trois impliquent le groupement carboxylate du récepteur plus deux autres de type amide/amide, mais aussi par des interactions hydrophobes mettant en jeu les cycles benzéniques et les méthyles. D'après la structure PDB (code 1fvm), la poche de liaison semble indépendante du groupement disaccharide, bien que ce dernier joue un rôle dans l'attachement du récepteur car la constante d'affinité avec $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}$ (Le symbole Ac signifie « acétyle », c'est un groupement composé d'une liaison peptidique terminée par un groupement méthyle que l'on place par exemple au niveau du N ou C terminal d'un peptide pour empêcher sa protonation ou déprotonation en reproduisant la connexion avec un autre acide aminé) baisse d'un facteur trois lorsqu'on l'enlève ^{5,10}. L'atome de chlore, attaché au cycle proche du N terminal, n'est pas non plus spectateur dans cette reconnaissance moléculaire, comme le montre l'étude de Harris *et al.* qui constatent une réduction de 30% de l'activité *in vitro* de la vancomycine lorsqu'on l'enlève ¹¹. Le mécanisme et la cinétique de la reconnaissance ne sont pas encore totalement compris, mais le phénomène dépasse largement le cadre d'un simple réseau de liaisons H, bien que celui-ci soit essentiel.

En ce qui concerne la phase gazeuse, A. Heck *et al.* ont établi, par des études de CID, que les comportements des complexes protonés et déprotonés étaient radicalement différents; en effet, en mode positif, ils ont observé que le complexe $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}+2\text{H}^+]$ n'était pas stéréospécifique alors qu'en mode négatif, le récepteur $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{L}}\text{A}^{\text{L}}\text{A}$ se lie beaucoup moins fortement que $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}$ à la vancomycine ¹². Ils ont attribué cette différence à la protonation du groupe carboxylate du récepteur en mode positif qui perturbe probablement fortement le réseau de liaisons H dans la poche de liaison de la vancomycine, tel qu'il apparaît dans la structure tirée des mesures cristallographiques (*cf.* Figure 1 et fichier PDB 1fvm). Les complexes déprotonés sont donc sans doute plus voisins de la conformation donnée par la cristallographie, et donc plus intéressants du point de vue de la biologie. Une étude par ECD a également donné des indices structuraux sur les complexes de la vancomycine ¹³. Le groupe de J. Laskin à Richland (PNNL, USA) s'intéresse depuis longtemps à la vancomycine, et c'est d'ailleurs elle qui nous a suggéré de l'étudier par spectroscopie IR. Le peu de données structurales détaillées concernant cette molécule en phase gazeuse a été publié récemment par son groupe. Des mesures de dissociation induite par collisions avec une surface (SID) et des calculs RRKM (théorie de la redistribution statistique de l'énergie dans un système moléculaire) leur permettent de proposer des structures pour la vancomycine protonée et déprotonée, ainsi que pour les complexes $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}-\text{H}^+]$ et $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}+\text{H}^+]$.

Lorsqu'on observe, sur la Figure 2, les conformations cristallisées de la vancomycine seule et dans le complexe avec $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}$, on constate qu'un ajustement induit par la présence du récepteur modifie légèrement la structure. On peut penser que cet ajustement s'amplifie en phase gazeuse, lorsque les interactions électrostatiques ne sont plus écrantées par le solvant. Afin de compléter les études dont j'ai parlé dans ce paragraphe et tenter d'établir des signatures spectroscopiques caractéristiques des changements de conformation après fixation d'un ligand sur un récepteur, nous avons mesuré le spectre IRMPD des systèmes $[\text{V}+\text{H}^+]$, $[\text{V}-\text{H}^+]$, $[\text{V}+2\text{H}^+]$, $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}+\text{H}^+]$, $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}-\text{H}^+]$, $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}+2\text{H}^+]$, $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}-2\text{H}^+]$ et $[\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}-\text{H}^+]$.

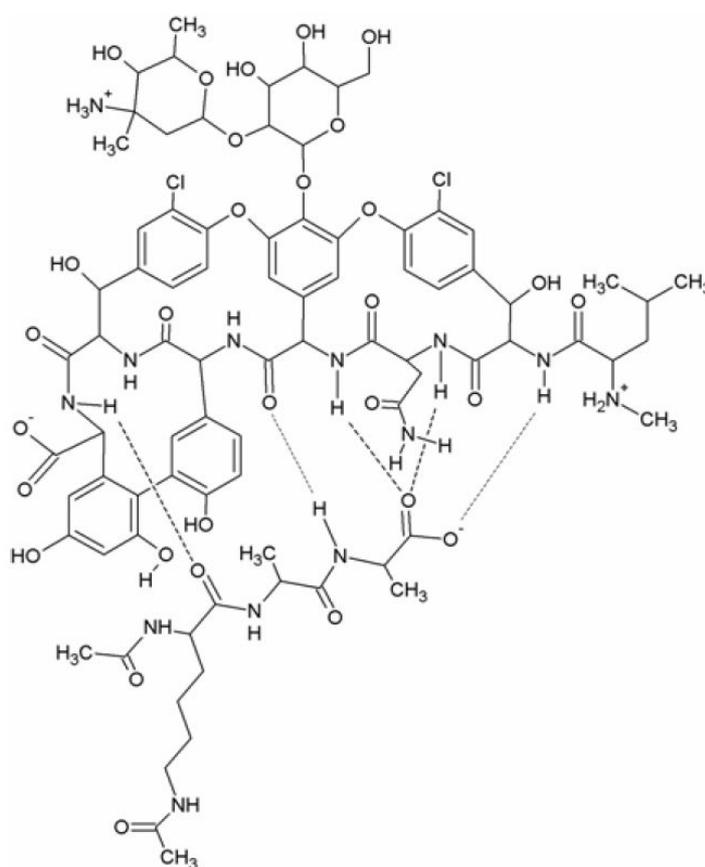


Figure 1: Structure de Lewis de la forme zwitterionique de la vancomycine protonée et du peptide $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}$ déprotoné. Les liaisons H révélées par la cristallographie sont dessinées en pointillés.

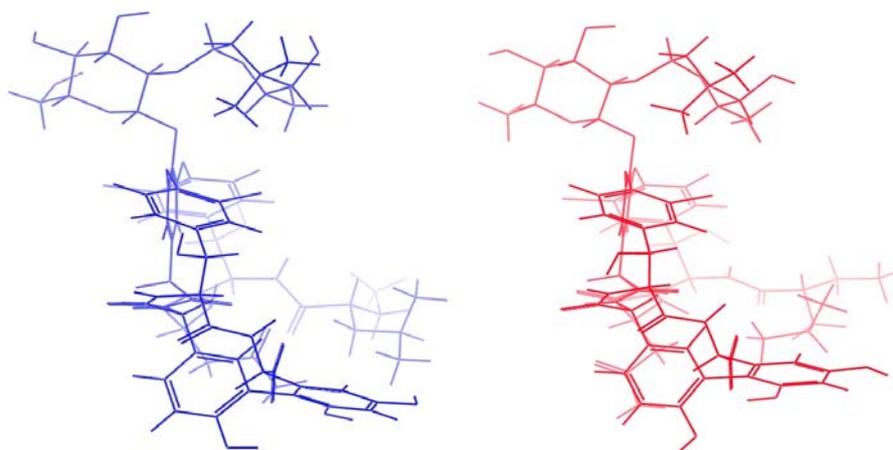


Figure 2: Structures cristallographiques de la vancomycine seule (à gauche) et de la vancomycine complexée avec le peptide Ac₂K^DA^DA (à droite ; le récepteur a été omis pour plus de clarté).

V.2 Mode positif

2.1 Vancomycine seule

a) Résultats expérimentaux

- *Attribution des bandes*

Tous les spectres IR expérimentaux ont été obtenus au centre laser infrarouge d'Orsay CLIO (LCP) sur l'expérience d'accueil du groupe de P. Maitre. La source ainsi que le dispositif expérimental sont détaillés dans le chapitre II de ce manuscrit. Les ions positifs de la vancomycine observés, et produits par électrospray, sont les espèces une et deux fois protonées. Les spectres IRMPD des ions $[V+H^+]$ et $[V+2H^+]$ sont donnés dans la Figure 3. La première caractéristique remarquable est que les bandes de ces spectres ont une largeur à mi-hauteur d'environ 40 cm^{-1} , et ceci est comparable au cas des espèces plus petites comme les dipeptides ou le glutathion. Comme la densité de conformations, dans un intervalle d'énergie potentielle donné, augmente avec le nombre d'angles de torsion, donc généralement avec la taille du système, et que des conformations coexistantes ajoutent leurs contributions au spectre, on pourrait logiquement attendre une multiplication et un élargissement des bandes lorsqu'on passe d'un dipeptide à la vancomycine, mais ce n'est pas le cas. On peut cependant avancer que l'hétérogénéité conformationnelle est en fait fortement limitée par la rigidification de la poche de liaison par les cinq cycles benzéniques. C'est une caractéristique qui est partagée par beaucoup de médicaments, parce-que ceux-ci doivent avoir une action

spécifique et ne se fixer qu'à un nombre très limité de récepteurs, un seul dans l'idéal, pour éviter au maximum les effets secondaires.

On peut noter la présence des deux bandes dues aux vibrations amide I et II, à environ 1700 et 1500 cm^{-1} . L'originalité du spectre réside dans le « peigne » de bandes de 1000 à 1400 cm^{-1} , qui est absent des spectres des peptides de taille similaire. On remarque également une bande autour de 1600 cm^{-1} qui est absente des spectres IRMPD des peptides protonés, mais qui pourrait correspondre à l'absorption du mode asymétrique d'un groupement COO^- . Cependant, les zwitterions en phase gazeuse sont hautement énergétiquement défavorisés et n'ont que très rarement été observés, dans des situations où ils sont stabilisés par complexation avec un cation métallique ou par une liaison du type « pont salin ». Etant donné que le groupement COOH de la vancomycine est trop loin des deux sites les plus basiques pour former un tel pont salin, nous avons exclu la possibilité d'avoir une structure zwitterionique en mode positif. Dans la Figure 3, à droite, un agrandissement de la région 1600-1850 cm^{-1} de la figure de gauche permet de voir la bande autour de 1800 cm^{-1} , due à l'absorption du mode C=O libre du groupement COOH . Cette bande constitue un argument de plus en faveur d'une structure canonique (non-zwitterionique). A l'aide de calculs de chimie quantiques que je détaillerai par la suite, nous avons pu attribuer les différentes bandes observées. Ces résultats sont regroupés dans le Tableau 1.

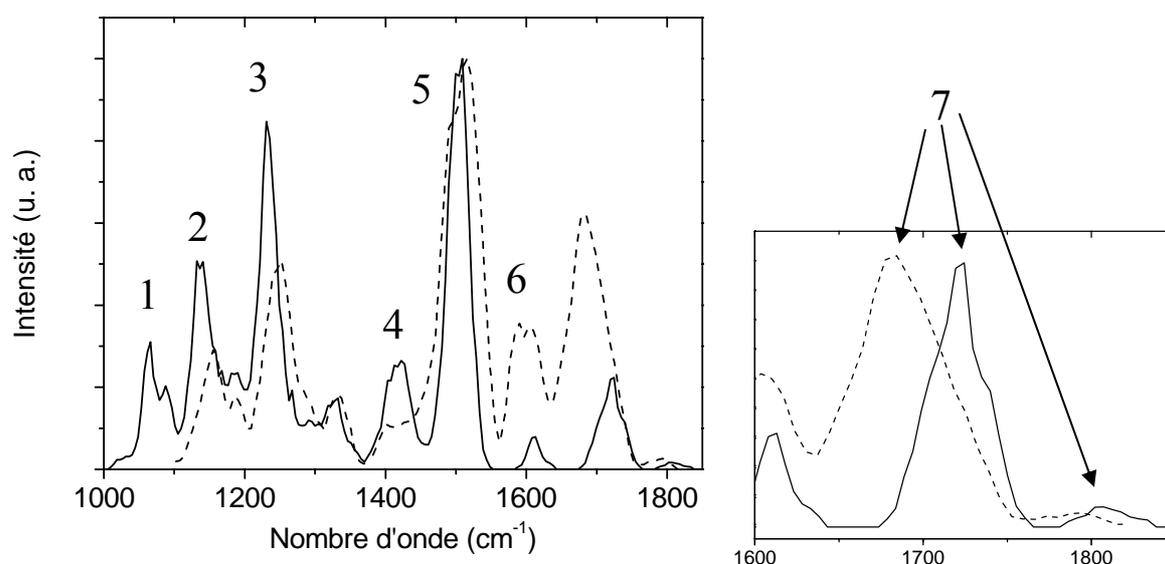


Figure 3: a) Comparaison des spectres IRMPD des ions Vancomycine une fois (tirets) et deux fois (trait plein) protonés ; b) Agrandissement de la zone 1600-1850 cm^{-1} (les intensités des bandes amide I ont été égalisées).

Tableau 1 : attribution des principales bandes apparaissant dans les spectres de la vancomycine une et deux fois protonée présentés dans la Figure 3.

Bande	1	2	3	4	5	6	7
Position (cm ⁻¹)	1080	1140	1240	1410	1500	1600	1700-1800
Attribution	ν (C-O) groupement disaccharide	γ (OH)	ν (C-O) pont de groupements chlorobenzènes	Modes des cycles benzéniques	γ (NH) (amide II)	Modes des cycles benzéniques	ν (C=O) (amide I)

• *Influence du second proton sur la structure*

Les deux spectres sont assez différents pour que l'on puisse en conclure que le second proton induit un changement de structure non-négligeable. D'abord, les bandes amide I et II de la vancomycine doublement protonée ont une largeur à mi-hauteur plus faible, ce qui peut être le signe d'une hétérogénéité conformationnelle réduite à cause de l'ajout du second proton. On peut également noter que les bandes amide I et II de la vancomycine doublement protonée sont déplacées respectivement vers le bleu et le rouge. Le déplacement est particulièrement marqué pour la bande amide I: 40 cm⁻¹. On s'attend donc à ce que les groupements C=O des ions une fois protonés soient en interaction forte avec une charge positive ou engagés dans des liaisons H, et que l'ajout d'un second proton empêche ces interactions, sans doute par répulsion coulombienne. Pour interpréter plus précisément ces effets, il faut connaître les sites de protonation de la vancomycine. Les deux groupements les plus basiques, d'après leurs pKa en solution, sont le groupement NH₂ du sucre (pKa = 8,89) et le N terminal (pKa = 7,75) (*cf.* Figure 4). Les pKa de la vancomycine en phase gazeuse ne sont pas connus, mais le choix de ces sites peut être justifié par un autre argument: ces deux groupes peuvent s'éloigner grâce à la flexibilité du sucre, diminuant ainsi la répulsion coulombienne en phase gazeuse. De plus, de nombreux travaux montrent que les groupes R-NH₂, où R est un groupement alkyle, sont plus acides que l'oxygène d'une liaison amide, notamment notre étude sur la dialanine¹⁴. On peut donc faire l'hypothèse que le premier proton se fixe sur le groupement disaccharide, et le second sur le N terminal. Or le disaccharide est la partie la plus mobile de la molécule puisqu'elle n'est pas contrainte par des ponts comme pour la chaîne peptidique. On peut donc penser que, dans la vancomycine une fois protonée, le groupement NH₃⁺ est en interaction avec des liaisons C=O de cette dernière, alors que le second proton sur le N terminal a des chances d'induire une énergie

électrostatique trop élevée due à la proximité des deux charges pour que ce type de structure survive.

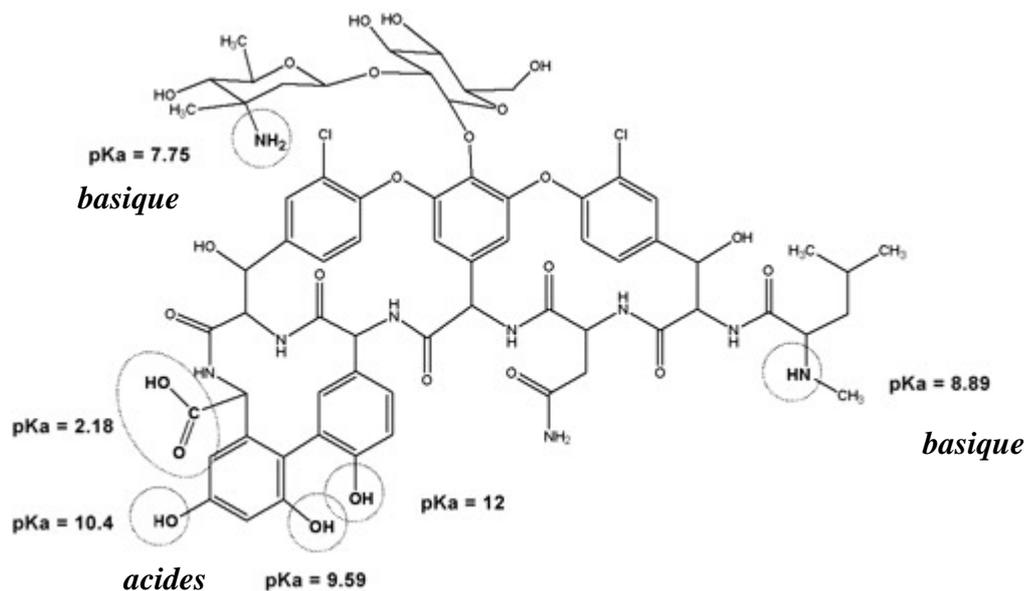


Figure 4: les 2 sites de protonation (basiques) et les 4 sites de déprotonation (acides) avec leurs pKa respectifs en solution aqueuse (Figure tirée de la référence ¹⁵).

Nous avons également étudié la vancomycine doublement protonée en spectrométrie de mobilité ionique au Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire (LASIM) à Lyon, en collaboration avec l'équipe de P. Dugourd. Le montage expérimental est décrit dans le chapitre II de ce manuscrit, et consiste en une source électrospray, un tube de mobilité maintenu à une pression de 10 mbar, et un TOF-MS. Comme on peut le voir dans le spectre présenté dans la Figure 5, une seule famille de conformations est principalement peuplée et contribue au spectre, et sa section efficace de collision est de 318 \AA^2 (la largeur du pic est de 20 \AA^2). Un autre pic de faible intensité est présent aux alentours de 390 \AA^2 , mais nous allons voir par la suite qu'il ne correspond pas à des ions vancomycine.

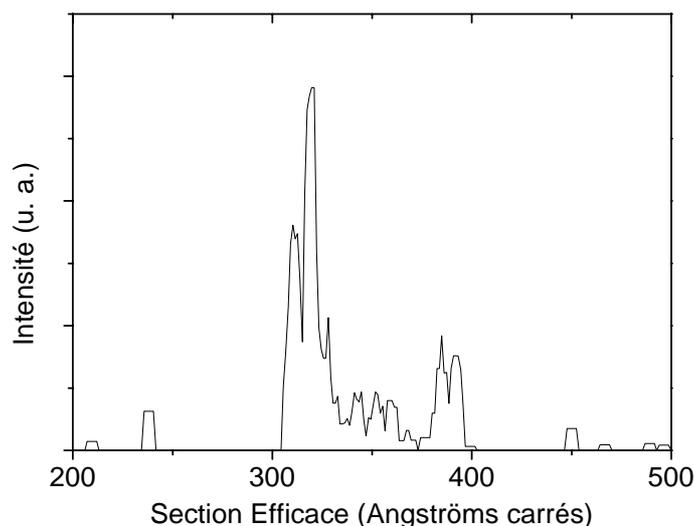


Figure 5: spectre de mobilité ionique de $[V+2H^+]$.

b) Apport des simulations

• Recherche des familles de conformères peuplée à 300 K

Afin d'interpréter les données de manière quantitative, des calculs de chimie quantique doivent être effectués. Auparavant, l'équipe s'intéressait à des systèmes de 50 atomes tout au plus, pour lesquels des spectres IR précis tirés de calculs de chimie quantiques avec des méthodes DFT, telles que B3LYP, peuvent être prédits. La vancomycine est une molécule trop grosse pour cela, la quantité de mémoire vive demandée excédant le maximum disponible. J'ai donc utilisé la méthode ONIOM, dont j'ai, au préalable, testé les performances en ce qui concerne la prédiction des spectres IR de molécules d'intérêt biologique (*cf.* chapitre III de ce travail), et qui demande moins de mémoire vive. La méthodologie suivie a été la suivante: pour une conformation donnée, le système est divisé en deux, au niveau des liaisons entre cycles chloro-substitués et chaîne peptidique, une moitié est la couche haute (CH) et l'autre la couche basse (CB). On en tire les fréquences et intensités des modes de vibration de la CH, donc simulés avec la méthode B3LYP. Un autre calcul ONIOM est fait en inversant CH et CB, et on réunit les fréquences et intensités des modes appartenant aux CH des deux calculs. Afin de clarifier les spectres et de faire ressortir les principales bandes, seules les transitions d'intensité supérieure à $100 \text{ km}\cdot\text{mol}^{-1}$ ont été gardées. Celles-ci ont été convoluées par une fonction de Lorentz de 15 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur.

Dans l'introduction, j'ai parlé des travaux du groupe de J. Laskin. Ils ont proposé une conformation pour la vancomycine protonée, dont j'ai donc commencé par calculer le spectre IR (conformère noté C1). Celui-ci est visible dans la Figure 7, en bas, où l'on peut le comparer avec le spectre expérimental. La première remarque qui peut être faite est que l'allure générale du spectre IRMPD est respectée, même si la forme des bandes et leur position n'est pas exactement reproduite. Le point négatif est que la bande expérimentale à 1250 cm^{-1} n'apparaît pas dans le spectre simulé, mais cela peut-être dû au fait que les transitions responsables de celle-ci ont une intensité inférieure à 100 km.mol^{-1} . Cependant, il est plus probable que le facteur d'échelle ne convienne pas à ces modes très délocalisés. Ceci est toutefois encourageant et permet d'attribuer précisément la majorité des bandes observées (cf. Tableau 1). Afin de savoir si d'autres familles de conformations peuvent être peuplées et tester les performances du logiciel Macromodel, j'ai mené une recherche de conformations sur cette espèce, en partant du conformère C1. La méthode choisie est une recherche par variation systématique des angles de torsion avec minimisation et calcul de l'énergie par le champ de force MMFF. Nous avons choisi cette méthode pour des raisons de moyens et de temps de calcul (cf. chapitre III). 40000 conformations ont été générées pour 586 trouvées entre 0 et 84 kJ.mol^{-1} . Les conformères les plus bas en énergie partagent le même réseau de liaisons H impliquant la poche de liaison et le groupement chargé. Ce réseau est légèrement différent de celui présent dans le conformère C1, et celui-ci se situe à une énergie de 45 kJ.mol^{-1} au-dessus du conformère d'énergie potentielle minimale, noté C2. J'ai également simulé son spectre IR avec la méthode ONIOM et au même niveau que pour le conformère C1, il est donné dans la Figure 7, au milieu. L'allure générale est, là aussi, respectée mais la forme des bandes est plus proche de l'expérience que pour le conformère C1. La bande amide II dans le spectre IRMPD est notamment clairement composée de plusieurs transitions, ceci étant le cas dans le spectre simulé du conformère C2 uniquement. Dans le chapitre III, je décris comment l'énergie potentielle d'un conformère est calculée avec la méthode ONIOM. On peut comparer cette énergie pour les deux conformères au niveau B3LYP/6-31g(d):AM1: celle du conformère C1 est plus basse que celle de l'autre, mais de 8 kJ.mol^{-1} seulement, ce qui veut dire que les deux conformères ont une probabilité similaire d'être peuplés à 300 K. On en déduit que les deux sont sûrement présents dans notre expérience, le conformère C2 donnant un meilleur accord avec le spectre expérimental.

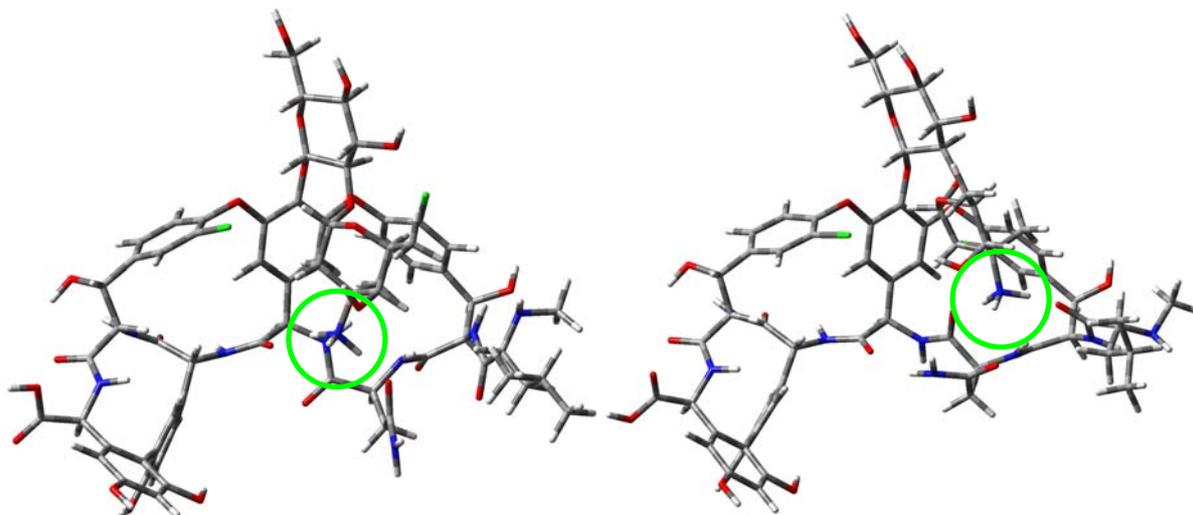


Figure 6: comparaison des structures des conformères C1 et C2 du cation $[V+H^+]$. Le groupement chargé est entouré.

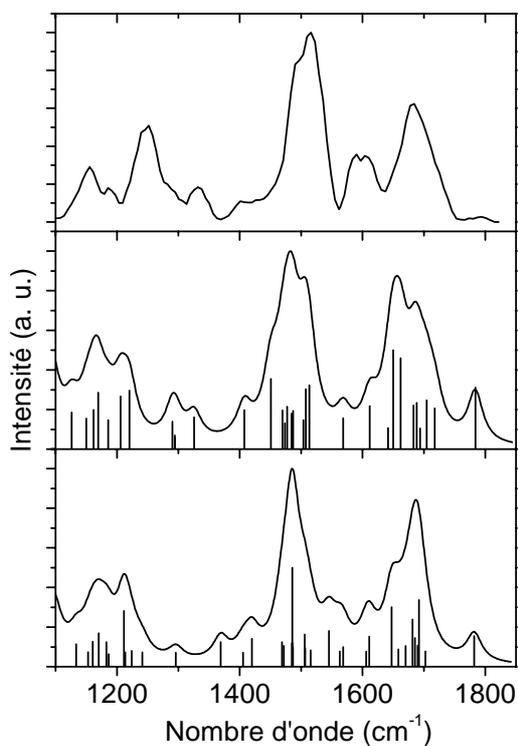


Figure 7: spectres IRMPD (en haut) et simulés au niveau ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1 des conformères C1 (au milieu) et C2 (en bas) de la vancomycine protonée. La convolution a été réalisée avec une fonction de Lorentz de largeur à mi-hauteur 30 cm^{-1} .

• *Le second proton induit un changement de famille de conformations*

Les conclusions du paragraphe précédent vont dans le sens d'une interaction entre le groupement NH_3^+ et la poche de liaison. Le second proton se fixe sur le second groupement basique qui est le N terminal, d'après les pKa en solution. Comme la distance entre celui-ci et le groupement NH_3^+ est, dans les conformères C1 et C2 de 6 et 9 Å, on peut s'attendre à une minimisation de la répulsion coulombienne par éloignement des deux groupes chargés, et donc une disparition de cette interaction présente dans la vancomycine une fois protonée. Pour tester cette hypothèse, j'ai simulé le spectre du conformère issu de la PDB (code 1aa5), noté PDB. Les deux groupements étant, cette fois, distants de 16 Å, la force électrostatique est donc réduite au moins d'un facteur 3. Les résultats sont donnés dans la Figure 8. On retrouve l'allure générale du spectre IRMPD dans la simulation, malgré de sérieuses différences, notamment en ce qui concerne la bande amide I, qui est trop basse en nombre d'onde, ou la partie due à l'absorption du groupement disaccharide, qui est mal reproduite. J'ai donc, là aussi, effectué une recherche de conformations: 40000 structures ont été générées, et 1508 conformations ont été trouvées entre 0 et 84 kJ.mol⁻¹. La plus basse est nommée C2 (cf. Figure 9). Deux familles principales émergent d'un regroupement par structure avec XCluster (logiciel Schrödinger, cf. chapitre III de cette thèse), appelées C1 et C4. Dans C1, C2 et C4, le N terminal protoné est en interaction avec la chaîne peptidique (cf. Figure 9), et dans C4 le NH_3^+ est solvato par deux groupes C=O de la chaîne derrière la poche (cf. Figure 10). Une structure de $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}+2\text{H}^+]^{2+}$ a été proposée par Yang *et al.*¹⁶ J'ai donc également simulé le spectre de la conformation de la vancomycine seule dans ce complexe, en enlevant le récepteur (conformère C3, cf. Figure 10). Les spectres calculés ainsi que l'expérience sont donnés dans la Figure 8. Leurs énergies ont été calculées au niveau B3LYP/6-31g(d) après optimisation.

Le programme de M. Jarrold, décrit dans le chapitre III de ce manuscrit, permet de calculer les sections efficaces à partir d'une ou plusieurs conformations d'un même système. Je l'ai donc utilisé pour interpréter les données obtenues en mobilité ionique. On obtient 334, 316, 316, 310, et 321 Å² pour les conformères PDB, C1, C2, C3 et C4. On peut en conclure que le conformère PDB, dont la section efficace est plus grande que l'expérience de 16 Å², fait sans doute partie des faibles pics entre les deux pics principaux. Par contre, les sections efficaces de collision des autres conformères sont toutes compatibles avec le pic majoritaire. Ils sont donc indiscernables du point de vue de la mobilité ionique, sans qu'on puisse en exclure aucun. Le petit pic autour de 390 Å² n'est probablement pas une deuxième famille de

conformations car l'augmentation en terme de section efficace comparée à 318 \AA^2 est trop grande compte tenu de la faible flexibilité de la vancomycine. Comme les mesures de temps de dérive ont été effectuées dans la même expérience pour la vancomycine seule et son complexe avec le modèle du récepteur, et que la section efficace de collision du complexe se situe autour de 355 \AA^2 , on peut penser que ce pic est dû aux complexes ayant fragmenté avant la détection par le TOF-MS et ayant donc gardé la « mémoire » de la section efficace de collision du complexe.

L'énergie potentielle du conformère C4, dans lequel le groupement NH_3^+ est engagé par liaison hydrogène, est plus haute que celle de C1 de 47 kJ.mol^{-1} . On peut donc être tenté de l'exclure par ce critère énergétique, mais il faut garder en tête l'ordre de grandeur de l'énergie interne vibrationnelle d'une molécule ayant un nombre élevé de degrés de liberté: un rapide calcul à partir d'un modèle statistique¹⁷ donne une valeur de 1 eV pour $[\text{AGWLK}+\text{H}^+]$ (239 modes de vibration) à 300 K. Comme le même type de calcul donne 0,6 eV pour $[\text{RGD}+\text{H}^+]$ (135 modes de vibration), et 0,2 eV pour $[\text{AA}+\text{H}^+]$ (66 modes de vibration), on voit que l'énergie interne augmente à peu près linéairement avec le nombre de modes de vibration, donc qu'elle atteint au moins 2 eV pour la vancomycine (528 modes de vibration), ou environ 200 kJ.mol^{-1} . C'est une valeur beaucoup plus élevée que 47 kJ.mol^{-1} , ce qui empêche d'exclure cette conformation C4.

Cependant, il ne peut être exclu que d'autres familles, n'ayant pas été trouvées par la recherche de conformations, soient elles aussi présentes. De toute façon, notre but n'est pas de trouver toutes les familles de conformations de la vancomycine, mais de déterminer les changements structuraux majeurs induits par l'attachement du récepteur. Je vais donc parler dans le prochain paragraphe des résultats concernant le complexe.

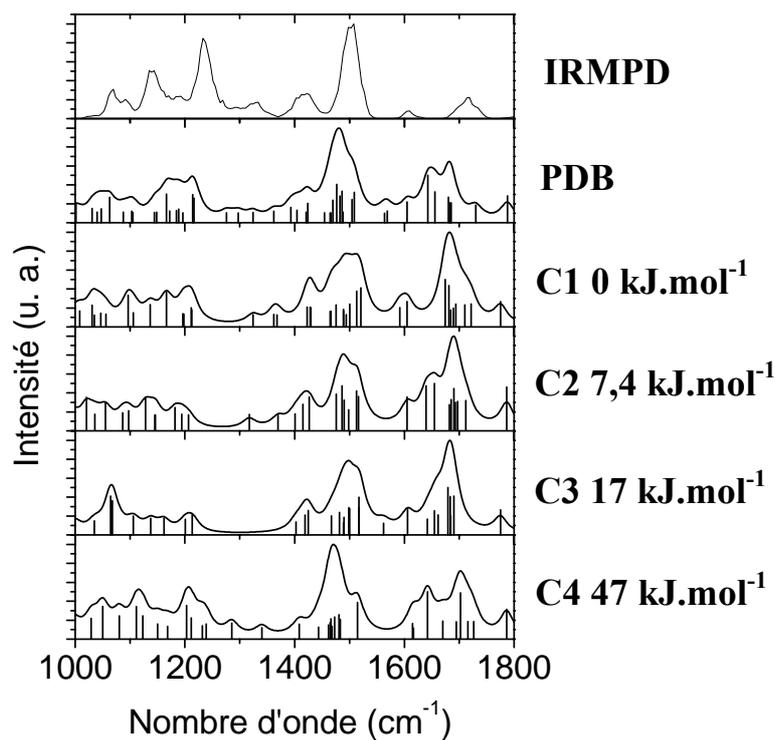


Figure 8: comparaison du spectre expérimental (en haut) et de ceux simulés par ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1 pour les conformations PDB, C1, C2, C3 et C4 du système $[V+2H^+]$ (respectivement de haut en bas). Les barres représentent les fréquences calculées, et les spectres sont obtenus par convolution avec une fonction de Lorentz de largeur à mi-hauteur 30 cm^{-1} .

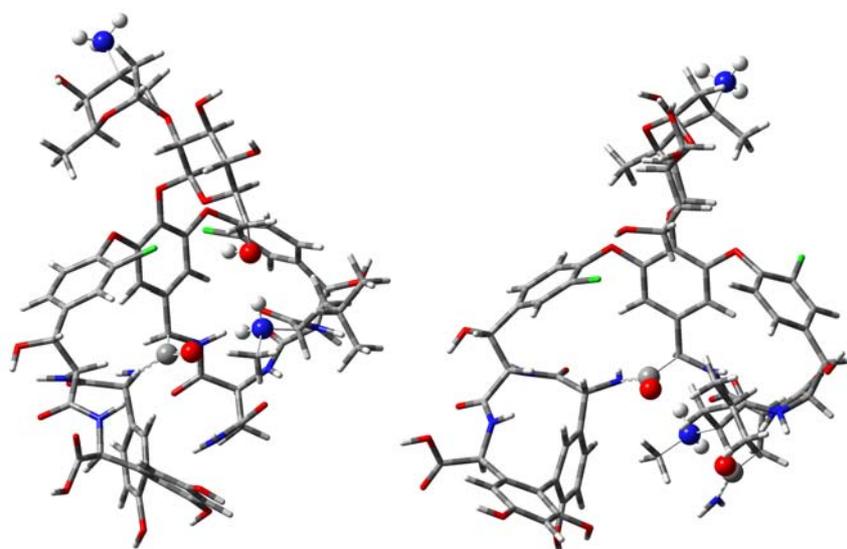


Figure 9: structures des conformères C1 et C2 (de gauche à droite) de la vancomycine doublement protonée. Les atomes des groupements chargés, ainsi que ceux avec lesquels ils sont en interaction, sont représentés par des boules.

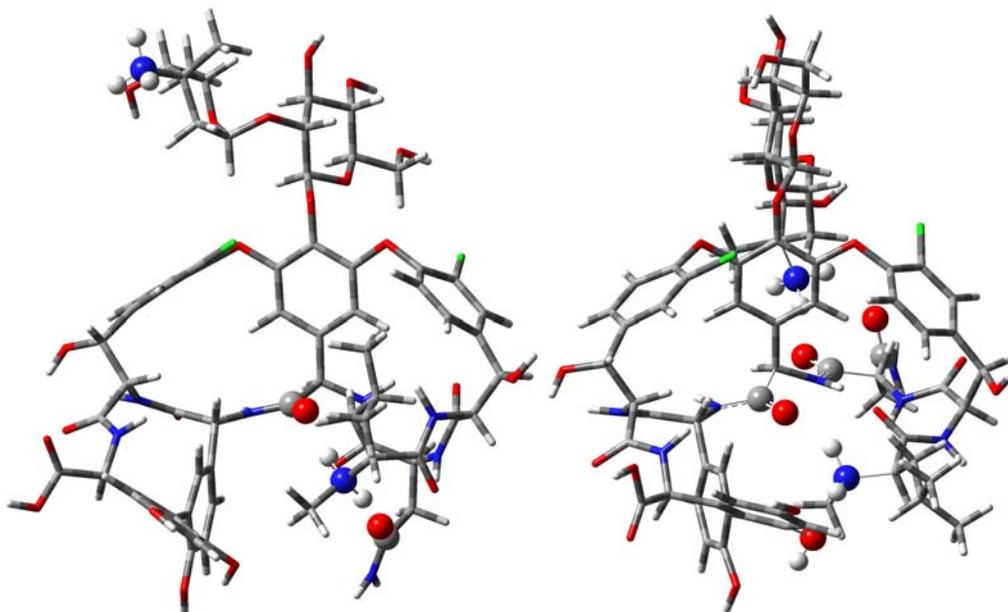


Figure 10: structures des conformères C3 (à gauche) et C4 (à droite) de la vancomycine doublement protonée. La représentation est similaire à celle de la Figure 9.

2.2 Vancomycine complexée

a) Résultats expérimentaux

Nous avons également étudié les états de charge 1+ et 2+ des complexes entre la vancomycine et le modèle du récepteur $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}$. Comme les deux sites du récepteur les plus basiques en solution, le N terminal et le N de la chaîne latérale de la lysine, sont protégés par des groupements acétyles, il est très probable que, en mode positif et en phase gazeuse, seul le groupement carboxylate du C terminal soit protoné et que le récepteur soit donc neutre. Le fragment majoritaire obtenu en CID et SID ¹⁶ à partir du complexe une fois protoné étant la vancomycine protonée, cette hypothèse est plausible. De plus, une expérience d'Haselmann *et al.* par ECD de $[\text{V}+2\text{H}^+]$ et $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}+2\text{H}^+]$ révèle la perte d'un fragment correspondant à NH_2CH_3 pour les deux systèmes ¹⁸. Dans les expériences d'ECD de peptides protonés sur le N terminal, on observe une perte de NH_3 (*cf.* référence ¹⁹). Or le N terminal de la vancomycine est substitué par un groupement CH_3 , donc le fragment NH_2CH_3 est la preuve que la vancomycine est protonée sur le N terminal, même dans le complexe. Comme l'autre groupement basique en solution est le NH_2 du sucre, et que les mêmes auteurs observent une perte d'un fragment de masse 341 comprenant le groupement disaccharide, ce groupement est probablement protoné également, ce qui implique que le récepteur est neutre. Enfin, Heck *et*

al. ont observé la production par électrospray des systèmes $[V+2H^+]$, $[V+Ac_2K^D A^D A+2H^+]$, $[V+AcGA+2H^+]$, $[V+AcAAA+2H^+]$ et $[V+AcAA+2H^+]$ ²⁰. Le fait que seul l'état de charge 2+ soit observé, quel que soit le récepteur, est cohérent avec la neutralité de celui-ci.

Il faut cependant noter qu'en CID le complexe doublement protoné se fragmente en donnant la vancomycine et le récepteur, chacun chargé 1+. Il est toutefois possible que l'apport d'énergie par collisions induise le détachement d'un proton mobile de la vancomycine, qui pourrait alors se fixer au récepteur lors de la dissociation²¹. C'est ce qu'observent H. Zhang *et al.* dans le cas de complexes doublement chargés entre un peptide $[K_5+CD+2H^+]$, où CD désigne la cyclodextrine, une molécule cyclique de type saccharide sans groupements basiques: la CID se traduit principalement par des fragments $[CD+H^+]$ et $[K_5+H^+]$ alors que le peptide K_5 possède 6 sites de protonation et est donc sûrement doublement protoné dans le complexe²².

Le spectre IRMPD du complexe doublement protoné a été mesuré dans les mêmes conditions que pour $[V+2H^+]$, et il est donné sur la Figure 11, superposé à celui-ci. On voit nettement que la complexation a un effet sur la bande amide I, qui est décalée vers le rouge de 30 cm^{-1} , la bande amide II ($+10\text{ cm}^{-1}$), la bande aux alentours de 1400 cm^{-1} (-10 cm^{-1}) et les trois bandes principales entre 1000 et 1300 cm^{-1} , décalées vers le bleu de 15 cm^{-1} environ. Nous avons également mesuré le temps de mobilité du complexe doublement protoné (*cf.* Figure 12), et déduit sa section efficace de collision du pic qui domine nettement le spectre: 355 \AA^2 , avec environ 20 \AA^2 de largeur à mi-hauteur.

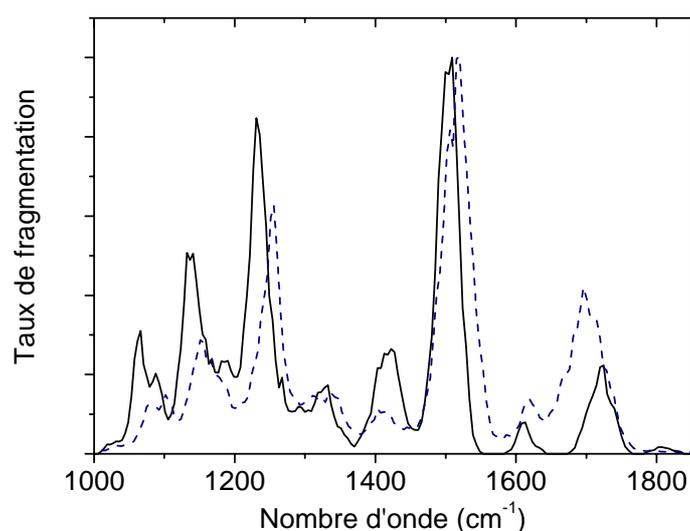


Figure 11: spectres IRMPD de $[V+2H^+]$ (trait plein) et de $[V+Ac_2K^D A^D A+2H^+]$ (tirets)

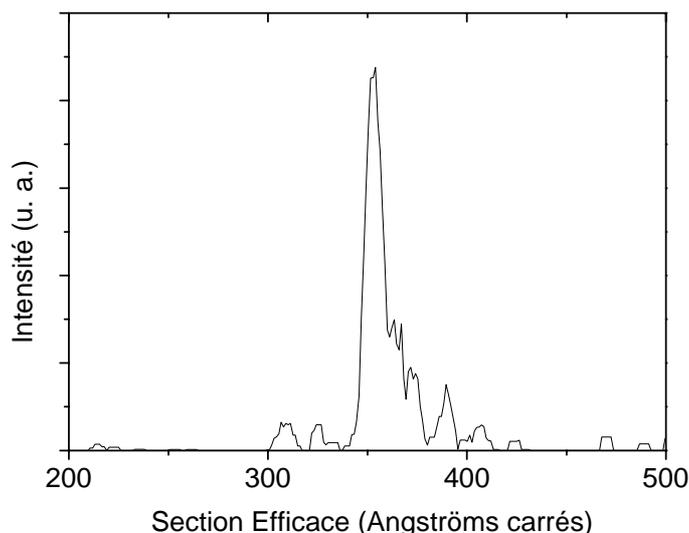


Figure 12: spectre de mobilité ionique du complexe [V+Ac2KDADA+2H+].

b) Apport des simulations

Là encore, des calculs de chimie quantique sont nécessaires pour en savoir plus sur les changements structuraux induits par la complexation. La méthode ONIOM a donc été utilisée d'une façon similaire à l'étude de la vancomycine seule, trois calculs différents étant cette fois nécessaires à la simulation du spectre IR d'un conformère: un dans lequel la chaîne peptidique constitue la couche haute, un autre pour la partie (cycles + groupement disaccharide), et un dernier pour le récepteur. Il faut également s'assurer que les différentes conformations optimisées sont structurellement proches. Ces calculs étant encore plus long que précédemment, j'ai utilisé la section efficace de collision expérimentale comme un filtre: ne sont retenus que les conformères dont la section efficace calculée est dans un intervalle de 30 \AA^2 autour de 355 \AA^2 .

Il est intéressant de chercher à savoir si la structure en phase liquide révélée par cristallographie (PDB 1fvm) se conserve après mise en phase gazeuse par électrospray. Je suis donc parti de cette structure, en protonant les deux groupements carboxylate de la vancomycine et du récepteur plus les deux sites basiques de la vancomycine comme dans le paragraphe précédent. Une première optimisation de géométrie a été faite au niveau AM1 car cette méthode semi-empirique est très rapide et demande peu de mémoire vive. J'ai alors constaté qu'après optimisation le groupement carboxyle du récepteur ne possède plus qu'une liaison H avec la poche de liaison et que, en revanche, une liaison H s'est formée entre le groupement acétyle de la chaîne latérale de la lysine et le groupement NH_3^+ du disaccharide, plus une autre entre le récepteur et la liaison amide du C-terminal de la vancomycine. Cette

structure sera notée conformère C1 et son spectre calculé au niveau ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1 est présenté dans la Figure 13. Sa section efficace de collision calculée est de 370 \AA^2 .

Afin de modéliser l'ajustement induit par l'attachement du récepteur à la vancomycine et la mise en phase gazeuse, j'ai utilisé un logiciel de « docking ». Les chercheurs en pharmacologie se servent souvent de ce genre de programmes spécialisés dans l'optimisation des interactions entre un récepteur donné et un certain nombre de ligands, afin de savoir lequel possède la plus haute constante d'affinité avec celui-ci. Bien que ces logiciels soient utilisés pour les interactions dans l'eau, j'en ai utilisé un pour simuler l'ajustement du récepteur à la vancomycine. Pour l'état de charge de celle-ci, j'ai procédé comme au paragraphe précédent, et j'ai attaché le récepteur neutre avec le logiciel Dock 6. Dans cette étape de « docking », le récepteur est flexible mais pas la vancomycine. Le meilleur site de fixation est bien la poche de liaison, et la conformation du récepteur donnant l'énergie potentielle minimale, telle qu'elle est calculée par Dock6, a été choisie et le conformère obtenu sera noté C2. Le spectre simulé au niveau ONIOM B3LYP/6-31g(d):AM1 est donné en Figure 13. Sa section efficace est de 363 \AA^2 .

Afin d'avoir un ordre de grandeur du décalage induit par une fixation sur un site radicalement différent de la poche de liaison, j'ai calculé la section efficace d'une conformation où le récepteur $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}$ neutre se fixe autour du groupement disaccharide de la vancomycine doublement protonée, mais sans interaction avec le groupement NH_3^+ : cela donne 377 \AA^2 , ce qui est trop élevé comparé à la valeur expérimentale.

La troisième structure (C3) vient d'une publication de J. Laskin²³ et elle a pour particularité de présenter le récepteur principalement en interaction avec le groupement NH_3^+ du groupe disaccharide, avec une seule liaison H avec la chaîne peptidique, à côté du C terminal. La poche de liaison est configurée à peu près de la même façon que pour le conformère C1 de $[\text{V}+2\text{H}^+]$, mais le groupement NH_3^+ est tourné du côté de celle-ci. La section efficace de collision devient égale à 370 \AA^2 . Le spectre IR simulé est également donné sur la Figure 13.

Le conformère C4 a été obtenu en prenant la conformation de plus basse énergie potentielle d'une simulation de dynamique moléculaire en champ de force AMBER par échange de répliques (REMD) en partant du conformère C3. Cette simulation était d'une durée de 1 ns et impliquait 30 répliques dont les températures s'échelonnaient entre 100 et 1000 K. Le site de liaison du conformère C4 est différent de ceux des conformères C1, C2 et C3: le groupement NH_3^+ vient solvater le C terminal du récepteur, mais « derrière » la poche

de liaison. Celle-ci a une conformation plus repliée que dans C1 à C3. Le spectre IR simulé est aussi montré sur la Figure 13, et la section efficace de collision calculée est 354 \AA^2 .

Afin de reproduire l'élargissement vers le rouge de la bande amide I sous l'influence du récepteur, j'ai modifié la structure du conformère C4 en impliquant le plus de liaisons C=O possible dans une liaison H. J'ai obtenu le conformère C5 qui ne possède pas d'interaction NH_3^+ /récepteur. Sa section efficace est de 366 \AA^2 et son spectre simulé est présenté sur la Figure 13.

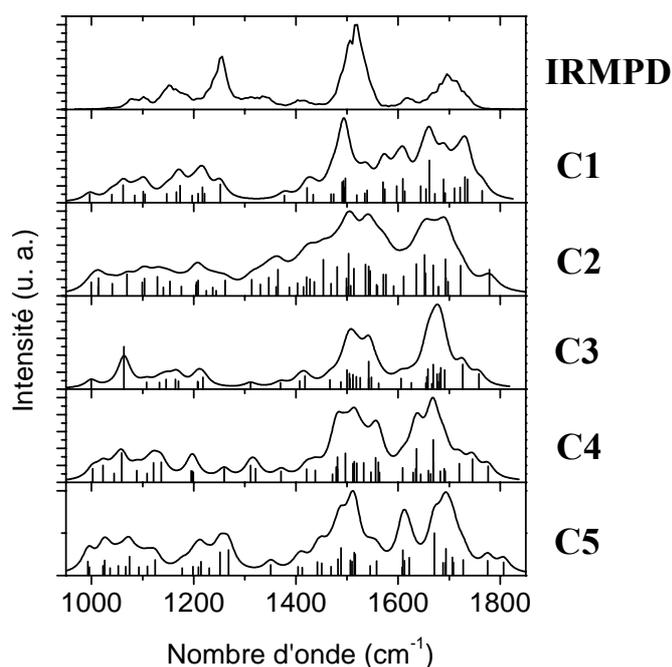


Figure 13: de haut en bas: spectres IRMPD et simulés au niveau ONIOM B3LYP6-31g(d):AM1 des conformations C1 à C5 de $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}+2\text{H}^+]$. La convolution a été réalisée avec une fonction de Lorentz de largeur à mi-hauteur 30 cm^{-1} .

On remarque tout d'abord que la partie des basses fréquences du spectre n'est pas bien reproduite quel que soit le conformère, comme dans le cas de la vancomycine seule. Ce n'est pas très gênant car l'information structurale contenue dans ces bandes, majoritairement dues au groupement disaccharide, est faible. En effet, la partie de ce groupement ayant la plus grande probabilité d'être en interaction avec le récepteur est le groupe NH_3^+ . Or ses modes de vibration absorbent à des nombres d'onde supérieurs à 1400 cm^{-1} . Le spectre du conformère C5 est celui qui paraît reproduire le plus fidèlement l'allure générale du spectre, notamment la bande amide I, mais le conformère C3 y contribue sans doute également, quoique de façon moindre. Par contre, les conformations proches de celle ayant été révélée par cristallographie

(conformère C1) sont sans doute à exclure. Il en est de même pour les familles de conformations issues du docking (C2) et de la dynamique moléculaire REMD (C4). Il est intéressant de remarquer que les prédictions de section efficace de collision semblent surestimer légèrement les valeurs expérimentales, puisque la moyenne des valeurs trouvées pour C3 et C5 est de 368 \AA^2 .

Dans la Figure 14, je présente les spectres expérimentaux superposés de la vancomycine et son complexe avec $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}$, tous deux une fois protonés. Il est frappant de constater la similitude de ceux-ci, surtout en ce qui concerne les positions des bandes. Le récepteur doit perturber seulement très légèrement la structure de la vancomycine et a donc peu de chance d'être situé dans la poche de liaison de celle-ci. La bande amide II devrait notamment être décalée vers les hautes fréquences, si les liaisons NH étaient engagées d'une manière similaire à la structure cristallographique.

Ces conclusions pour le complexe entre la vancomycine et le modèle de récepteur sont en accord avec celles de A. Heck *et al.*, qui ont constaté une absence de stéréosélectivité dans la fixation de ce même récepteur à la vancomycine. Ceci est dû, selon eux, à la protonation du groupement carboxylate du récepteur empêchant l'interaction spécifique entre celui-ci et les groupes NH de la poche de liaison de la vancomycine ²⁴.

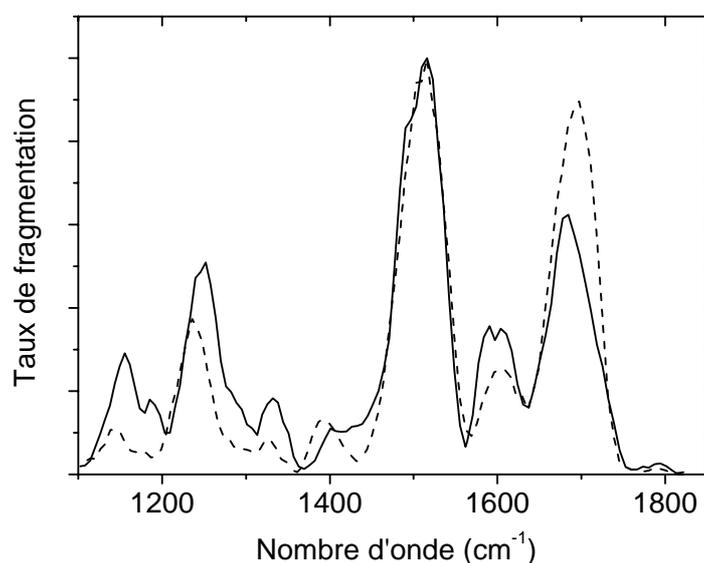


Figure 14: spectres IRMPD des systèmes $[\text{V}+\text{H}^+]$ (trait plein) et $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}+\text{H}^+]$ (tirets)

V.3 Mode négatif

3.1 Discussion des résultats expérimentaux

a) Recherche des sites de déprotonation

Comme je l'ai dit dans l'introduction, les ions déprotonés sont ceux qui ont la plus grande chance d'être proches des molécules en phase condensée du point de vue de la structure. Nous avons donc obtenu les spectres IRMPD des systèmes $[V-H^+]$, $[V-2H^+]$, $[V+Ac_2K^D A^D A-H^+]$, $[V+Ac_2K^D A^D A-2H^+]$ et $[Ac_2K^D A^D A-H^+]$. Pour pouvoir tirer des informations de ces données, il faut connaître le ou les sites de déprotonation des molécules étudiées. Les sites acides et basiques de la vancomycine en solution aqueuse²⁵ sont indiqués dans la Figure 4. Le site le plus acide est, de loin, l'acide carboxylique du C terminal, mais les sites de déprotonation en phase gazeuse ne sont *a priori* pas connus. Cependant, les travaux de l'équipe de J. Oomens montrent que le groupe carboxylate est stable en phase gazeuse, en particulier plus stable que le phénolate dans le cas de la tyrosine déprotonée, suivant ainsi la tendance existant en solution aqueuse²⁶. J'ai donc fait l'hypothèse que ceci est également valable pour la vancomycine, qui possède un groupement carboxyle et deux phénols, dont un di-substitué. Par conséquent, la vancomycine est déprotonée en priorité sur le groupement carboxyle du C terminal. Si tel est le cas, le spectre IRMPD devrait porter la signature de ce dernier car il absorbe fortement le rayonnement IR aux environs de 1300 et 1600 cm^{-1} à cause de la résonance de ses modes d'élongation symétrique et asymétrique. J. Oomens *et al.* ont en effet observé ces modes à 1330 et 1640 cm^{-1} pour l'acide aminé phénylalanine déprotoné dont la structure présente le groupement carboxylate en interaction avec le groupe NH_2 terminal²⁶.

b) Influence du récepteur sur la structure de la vancomycine déprotonée

Le spectre expérimental de $[V - H^+]$ est donné sur la Figure 15. On peut y remarquer la présence d'une bande peu intense autour de 1315 cm^{-1} et d'une très intense et large bande commençant à 1550 et chutant vers 1700 cm^{-1} . Cette dernière contient les transitions des modes d'élongation C=O, mais le fait qu'elle s'étale autant vers les basses fréquences est sûrement le signe d'une ou plusieurs bandes supplémentaire. Ceci n'est en tout cas pas en contradiction avec notre hypothèse d'une déprotonation de l'acide carboxylique. D'après notre étude sur les cations, on sait que certains modes de vibration des cycles benzéniques absorbent le rayonnement autour de 1600 cm^{-1} , mais l'intensité de la bande en résultant est moins forte dans le spectre de $[V+H^+]$ que dans celui de $[V-H^+]$. On peut également

distinguer, dans ce spectre, une bande vers 1490 cm^{-1} qui est sans doute due aux modes de pliage des liaisons NH (amide II). Une attribution des principales bandes de ce spectre, réalisée grâce à des calculs dont je parlerai par la suite, est donnée dans le Tableau 2. Observons à présent le spectre du complexe déprotoné, qui est tracé avec des tirets, superposé au précédent. Les deux molécules du complexe possédant un groupement carboxyle, il faut déterminer lequel est déprotoné, ou si les deux formes peuvent être présentes à 300 K. Si l'on part de l'hypothèse que la structure du complexe en solution est telle qu'elle est représentée dans la Figure 1, le groupement carboxyle le plus susceptible d'être conservé lors du processus d'électrospray est celui qui est stabilisé par trois liaisons H, c'est-à-dire celui du récepteur. De plus, cette interaction est indispensable à la cohésion du complexe en phase liquide ¹⁰. Or d'après la Figure 16, le signal dû aux fragments ioniques issus de la dissociation, après absorption de photons IR, et mesuré dans les mêmes conditions, est similaire dans le cas du complexe déprotoné et protoné. Mais le nombre d'ions parents, c'est-à-dire de complexe intact, est de l'ordre de $1,7 \cdot 10^6$ pour le premier et $3 \cdot 10^4$ pour le second. Le taux de fragmentation du complexe déprotoné est donc environ 50 fois plus faible que celui du complexe protoné. Comme la durée de l'IVR est probablement similaire pour les deux complexes, cette nette différence doit être due à une barrière de dissociation et/ou une énergie de liaison beaucoup plus grande dans le complexe déprotoné. Ces arguments sont en faveur d'une déprotonation du récepteur, la vancomycine restant neutre.

Confrontons cette hypothèse aux différences entre les spectres de la Figure 15: l'intensité de la bande n° 2 s'est effondrée, alors que la bande n° 3, située vers 1400 cm^{-1} , est toujours présente. Il est important d'avoir en tête le fait que la fréquence de résonance du mode d'élongation symétrique d'un groupement carboxylate augmente lorsque celui-ci est engagé dans des liaisons H ou lorsqu'il est situé en face d'un groupement portant une charge positive. C'est l'inverse pour le mode asymétrique. Pour avoir un ordre de grandeur du décalage subi, il faut savoir que, pour le tryptophane, ces modes de vibration sont observés à 1411 et 1559 cm^{-1} dans l'eau à $\text{pH} = 11$ ²⁷, alors que leurs fréquences en phase gazeuse sont égales à 1337 et 1628 cm^{-1} ²⁶. Les observations faites sont donc cohérentes avec l'hypothèse d'un récepteur déprotoné fortement engagé et d'une vancomycine neutre dans le complexe. De plus, la partie basses fréquences de la bande autour de 1500 cm^{-1} , attribuable aux modes de pliage NH, a disparu, ce qui est cohérent avec un engagement des trois groupements NH de la poche de liaison de la vancomycine avec le groupe carboxylate du récepteur. Toutefois, il est curieux que la bande large, incluant les modes d'élongation C=O, reste globalement la même

sous l'influence de la complexation: la position du maximum d'intensité est inchangé (1683 cm^{-1}) et on a un léger affinement de la partie hauts nombres d'onde. On peut cependant noter que la bande située autour de 1625 cm^{-1} semble être décalée vers le rouge de 15 cm^{-1} sous l'influence de la complexation. D'après les travaux de J. Oomens sur les acides aminés déprotonés en phase gazeuse ²⁶, cette bande dans la vancomycine peut être la signature d'un groupement carboxylate peu engagé. Le décalage qu'elle subit dans le complexe serait alors la conséquence de l'engagement du groupement carboxylate du récepteur.

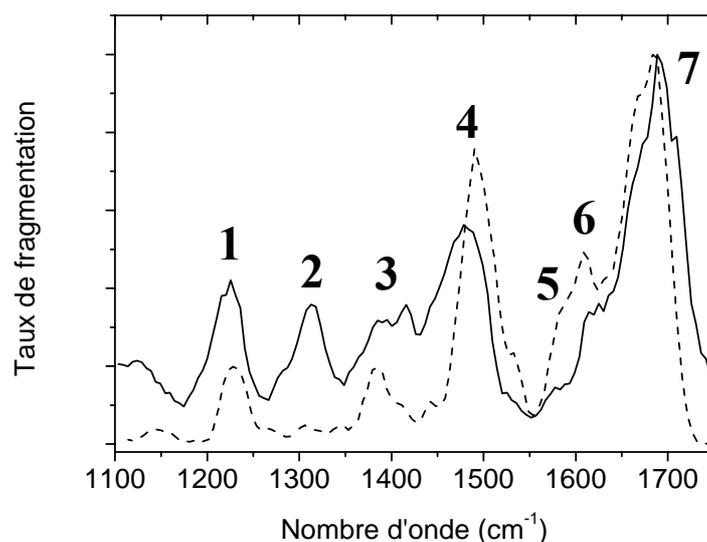


Figure 15: spectres IRMPD des systèmes $[V-H^+]$ (trait plein) et $[V+Ac_2K^D A^D A-H^+]$ (tirets).

Tableau 2 : attribution des bandes du spectre IRMPD de l'ion $[V-H^+]$ montré dans la Figure 15.

Bande	1	2	3	4	5	6	7
Position (cm-1)	1225	1310	1400	1490	1590	1625	1700
Attribution	ν (C-O) pont de groupements chlorobenzènes	$\nu(COO^-)$ s	Modes des cycles benzéniques	$\gamma(NH)$	Modes des cycles benzéniques	$\nu(COO^-)$ as	$\nu(CO)$

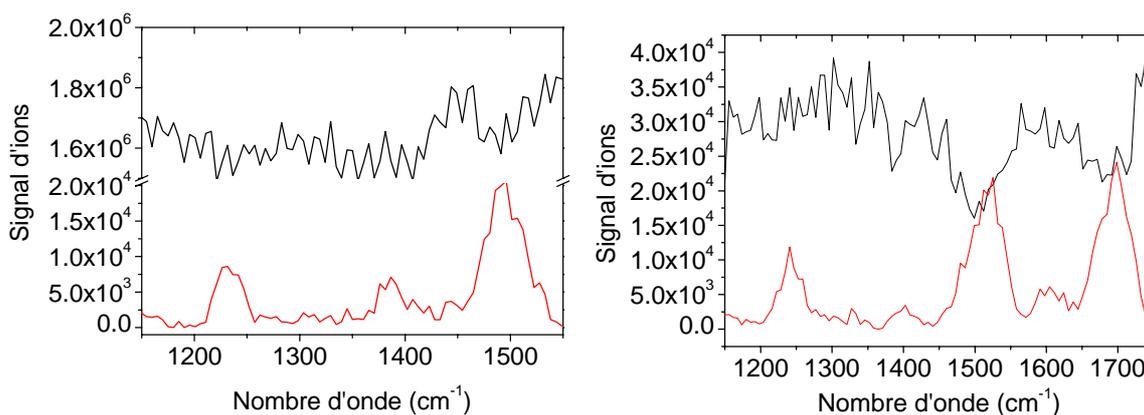


Figure 16: signaux des ions parent (en haut) et fragments (en bas) en fonction du nombre d'onde du laser dans le cas des complexes $[V+Ac_2K^D A^D A-H^+]$ (à gauche) et $[V+Ac_2K^D A^D A+H^+]$ (à droite).

c) La vancomycine complexée peut-elle avoir une structure zwitterionique ?

Au paragraphe précédent, après examen des spectres expérimentaux des ions déprotonés de la vancomycine et son complexe avec le récepteur $Ac_2K^D A^D A$, nous sommes arrivés à la conclusion suivante: le récepteur est déprotoné et la vancomycine est neutre. Il faut cependant noter que le groupe de J. Laskin a proposé, en 2008, une structure de type zwitterionique pour la vancomycine dans ce complexe¹⁶. Cependant, les zwitterions n'ont été observés que rarement en phase gazeuse, lorsqu'ils sont stabilisés par une interaction avec un cation métallique ou par un pont salin^{28,29}. De plus, dans la structure proposée par J. Laskin, le groupement NH_2 du disaccharide est protoné et en interaction directe avec le groupe carboxylate ; or d'après la structure tirée des mesures par RMN (entrée PDB 1fvm) il est exposé au solvant. Il est donc peu probable que le processus d'électrospray en mode négatif conserve ce proton non stabilisé par un pont salin en solution. Enfin, si ce conformère était peuplé, une transition intense due au mode de pliage symétrique du groupe NH_3^+ serait observée autour de 1550 cm^{-1} , comme par exemple dans le conformère C3 de $[V+Ac_2K^D A^D A+2H^+]$, où elle est prédite à 1542 cm^{-1} . Pour toutes ces raisons, nous avons exclu ce genre de conformation.

d) Influence de l'état de charge du complexe

Nous avons de nouveau mesuré le spectre IRMPD du complexe $[V+Ac_2K^D A^D A]$, mais cette fois doublement déprotoné, dans les mêmes conditions que les spectres de la Figure 15.

Les résultats sont donnés dans la Figure 17. On remarque tout de suite qu'une bande à 1325 cm^{-1} est apparue avec la seconde déprotonation. Cette valeur est proche de celle observée dans le spectre de la vancomycine déprotonée, et on est donc tenté d'en conclure que c'est effectivement le groupement carboxyle de la vancomycine neutre dans le complexe $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}-\text{H}^+]$ qui a perdu un proton pour former l'ion $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}-2\text{H}^+]$. Comme la bande autour de 1390 cm^{-1} est quasiment inchangée, on peut penser que le groupement carboxylate du récepteur est toujours engagé dans la poche de liaison. Est-ce que l'examen des bandes dues au mode d'élongation asymétrique du COO^- confirme ces hypothèses? On observe, après perte du second proton, l'augmentation d'intensité de la bande à 1635 cm^{-1} ainsi qu'une diminution d'intensité de la bande située à 1590 cm^{-1} due à des modes de vibration de cycles benzéniques. Comme nous l'avons dit précédemment, la première correspond à un groupement carboxylate engagé dans une liaison H faible, son apparition correspondrait donc à l'apparition d'un groupement carboxylate dans la vancomycine, celui-ci étant libre ou peu engagé avec le récepteur dans le complexe. Cependant, nous devrions observer la bande située à 1610 cm^{-1} due au mode d'élongation asymétrique du groupement carboxylate du récepteur, or celle-ci n'apparaît pas clairement, mais c'est probablement parce qu'elle est située dans la partie basses fréquences de la bande située à 1635 cm^{-1} .

Afin de confirmer l'attribution de la bande observée à 1635 cm^{-1} , j'ai superposé les spectres des systèmes $[\text{V}+\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}-2\text{H}^+]$ et $[\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}-\text{H}^+]$ dans la Figure 18. On peut constater que la bande en question est commune aux deux spectres, alors que dans le spectre du récepteur isolé le groupement carboxylate est le seul à pouvoir être responsable de cette bande. De plus, l'absence de pics autour de 1550 cm^{-1} , dans ce même spectre, prouve que les groupements NH ne sont pas en interaction forte avec le groupe carboxylate et que celui-ci est donc libre. On en déduit que la même bande dans le spectre du complexe est la signature de la vancomycine déprotonée sur le groupement carboxyle, le groupe carboxylate ainsi formé étant libre. De plus, la bande située à 1590 cm^{-1} ne figure pas dans le spectre IRMPD de $[\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}-\text{H}^+]$, ce qui est cohérent avec l'attribution faite précédemment. Un résumé de l'attribution des différentes bandes des complexes de la vancomycine et du modèle du récepteur est donné dans le Tableau 3.

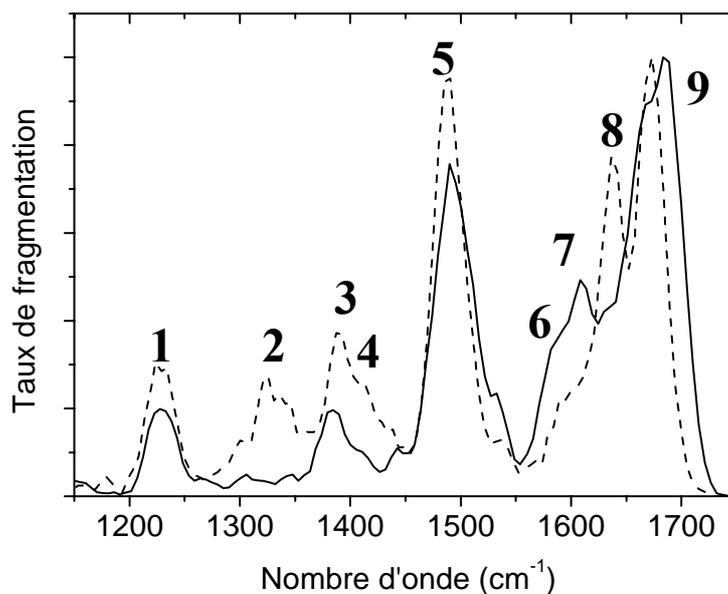


Figure 17: spectres IRMPD des systèmes $[V+Ac_2K^D A^D A-H^+]$ (trait plein) et $[V+Ac_2K^D A^D A-2H^+]$ (tirets).

Tableau 3 : attribution des bandes du spectre IRMPD de l'ion $[V+Ac_2K^D A^D A-2H^+]$ montré dans la Figure 17.

Bande	1	2	3	4	5
Position (cm ⁻¹)	1225	1310	1390	1400	1490
Attribution	ν (C-O) pont de groupements chlorobenzènes	$\nu(COO^-)$ s vancomycine	$\nu(COO^-)$ s récepteur	Modes des cycles benzéniques	$\gamma(NH)$
Bande	6	7	8	9	
Position (cm ⁻¹)	1590	1608	1635	1700	
Attribution	Modes des cycles benzéniques	$\nu(COO^-)$ as récepteur	$\nu(COO^-)$ as vancomycine	$\nu(C=O)$	

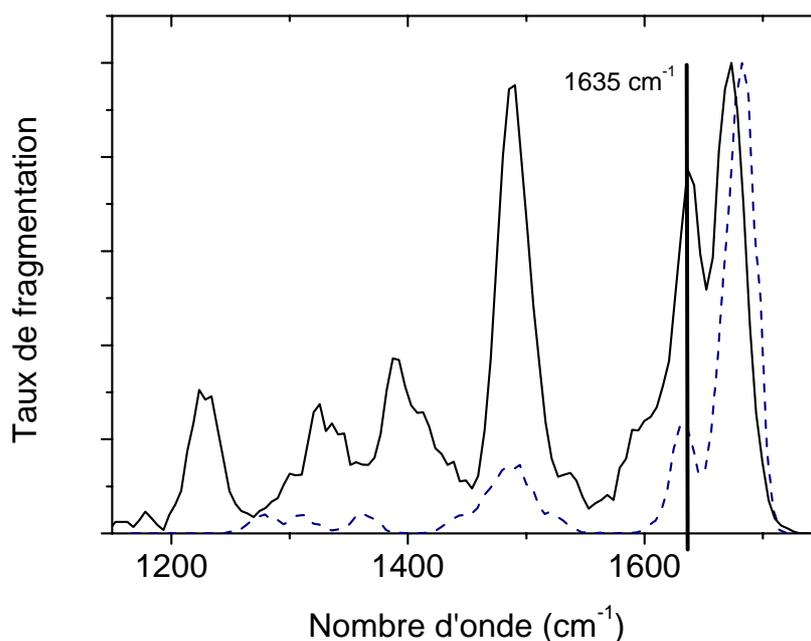


Figure 18: spectres des systèmes $[V+Ac_2K^D A^D A-2H^+]$ (trait plein) et $[Ac_2K^D A^D A-H^+]$ (tirets). La position de la barre verticale est notée sur la figure.

3.2 Apports des simulations de chimie quantique

a) Etude du récepteur $Ac_2K^D A^D A$ déprotoné

Nous avons mesuré le spectre IRMPD (visible dans la Figure 19) du récepteur $Ac_2K^D A^D A$ isolé, afin d'en savoir plus sur la prédiction des bandes attribuées aux modes d'élongation du groupe COO^- qui sont cruciales pour l'interprétation des spectres IRMPD. Dans l'Annexe 2 de cette thèse, j'ai étudié le brin 16-22 de la protéine amyloïde β ($A\beta_{16-22}$) en mode négatif. Son spectre IRMPD est montré dans la Figure 19, superposé à celui du récepteur. Ils sont tous deux une fois déprotonés et n'ont qu'un site fortement acide: le groupement carboxyle. Or leurs spectres sont composés des trois mêmes bandes mais dont les positions changent: dans le brin de protéine, les bandes amide I et II sont décalées vers le bleu et la bande située entre les deux, attribuée au mode asymétrique du groupement COO^- , vers le rouge. Les conclusions de notre étude sur ce brin sont que la structure la plus probable est celle dans laquelle la charge négative est solvatée par la majorité des groupements NH des liaisons amides. Ceci implique donc que le groupe carboxylate est très peu engagé dans le récepteur, vu le décalage important vers le bleu de la fréquence de son mode d'élongation. C'est parfaitement cohérent avec le décalage commun des bandes amide I et II, car les

groupements NH du brin d'amyloïde en interaction avec une charge négative *devant* eux se décalent vers le bleu, et les groupements C=O des *mêmes* liaisons amides voient la charge *derrière* eux, ce qui augmente également leur fréquence (voir chapitre II). Les conformères de $[\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A} - \text{H}^+]$ présents à 300 K doivent donc comporter un groupe carboxylate peu lié. Les résultats du groupe de J. Oomens sur les acides aminés déprotonés vont également dans ce sens: ils observent une bande autour de 1630 cm^{-1} , et les conformères peuplés ont un groupement COO^- uniquement en interaction C_5 avec le groupement NH_2 terminal ²⁶.

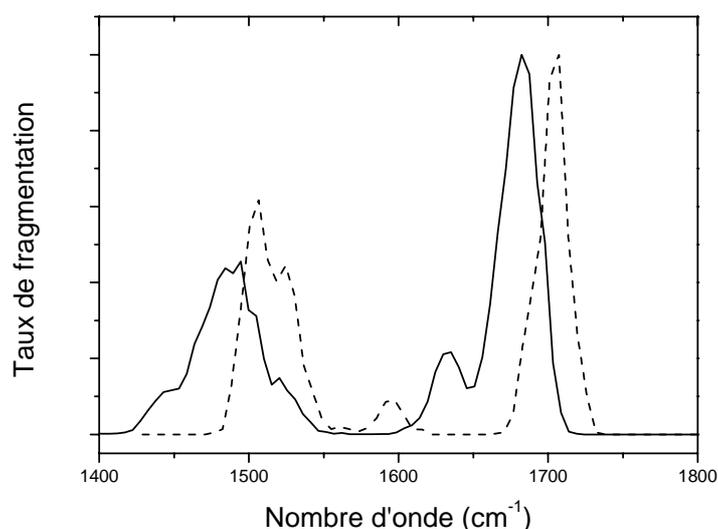


Figure 19: comparaison des spectres IRMPD des peptides $\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}$ (trait plein) et $\text{A}\beta_{16-22}$ (tirets), tous deux une fois déprotonés.

Une étude « classique » de recherche de conformations et de simulation du spectre IR de $[\text{Ac}_2\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A} - \text{H}]^-$ a été menée afin de vérifier ces hypothèses. Une recherche, via la variation systématique des angles de torsion, avec le champ de force MMFF, a donc été effectuée: 10000 structures ont été générées et 489 trouvées entre 0 et $84\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les conformères de plus basses énergies potentielles possèdent un point commun: le groupe carboxylate est en interaction forte avec trois groupements NH. Ceci est en contradiction avec les conclusions précédentes, mais j'ai tout de même simulé au niveau B3LYP/6-31+g(d) le spectre du conformère de plus basse énergie, noté C1. Comme tous les conformères trouvés par la recherche de conformation ont un groupe carboxylate engagé dans au moins deux liaisons H, j'ai créé un conformère (C3) dont la chaîne peptidique est totalement dépliée, sous forme de feuillet β , et dans lequel le groupement COO^- possède une seule liaison H, celle-ci

étant de type C₅. Enfin, un conformère intermédiaire (C2) a également été considéré. Les spectres simulés sont présentés sur la Figure 20 et leurs structures dans la Figure 21. Leurs énergies libres relatives à 300 K sont notées à droite des simulations.

Le spectre IR simulé du conformère de plus basse énergie comporte trois transitions intenses, entre 1525 et 1600 cm⁻¹, formant une bande qui est absente du spectre IRMPD. Les groupements NH sont donc probablement moins liés, ce qui est le cas du conformère C2, dans lequel le groupe carboxylate n'est lié qu'à deux d'entre eux. On constate effectivement dans son spectre simulé que l'intensité de la bande autour de 1575 cm⁻¹ a baissé, mais pas encore assez, et l'ensemble du spectre reste encore trop éloigné de l'expérience. Par contre, ce n'est pas le cas du conformère C3: les bandes amide I et II ainsi que la partie basse du spectre reproduisent correctement l'expérience. La bande située à 1310 cm⁻¹ est attribuée au mode symétrique du groupe carboxylate, très bien reproduit par le calcul (1318 cm⁻¹) dans le conformère C3. On remarque cependant que le pic dû à l'absorption du mode asymétrique du groupement COO⁻ semble être absent du spectre simulé du conformère C3. En fait, la fréquence prédite par B3LYP/6-31+g(d) est de 1664 cm⁻¹, soit 29 cm⁻¹ de plus que l'expérience, cette transition se fond donc dans la bande des modes d'élongation C=O. Cet écart de fréquence est trois fois plus grand que l'erreur moyenne entre prédictions et expérience pour ce mode (voir chapitre III). On pourrait donc penser *a priori* à un problème de structure. Cependant, un décalage vers le rouge de cette fréquence s'obtiendrait au prix d'un engagement plus fort du groupement COO⁻, comme dans le conformère C1, dont le spectre n'est pas en accord avec l'expérience. De plus, dans leur publication sur l'ion benzoate, pour lequel la structure est parfaitement connue, J. Oomens et J. Steill constatent une erreur de 27 cm⁻¹ entre expérience et calcul anharmonique pour ce mode au niveau B3LYP/6-31+g(d), alors que l'écart se réduit à 3 cm⁻¹ lorsqu'ils utilisent une base beaucoup plus grande (aug-cc-pVDZ)³⁰. Nous faisons donc l'hypothèse que, pour cet ion, la famille de structures peuplée à 300 K est représentée par le conformère C3.

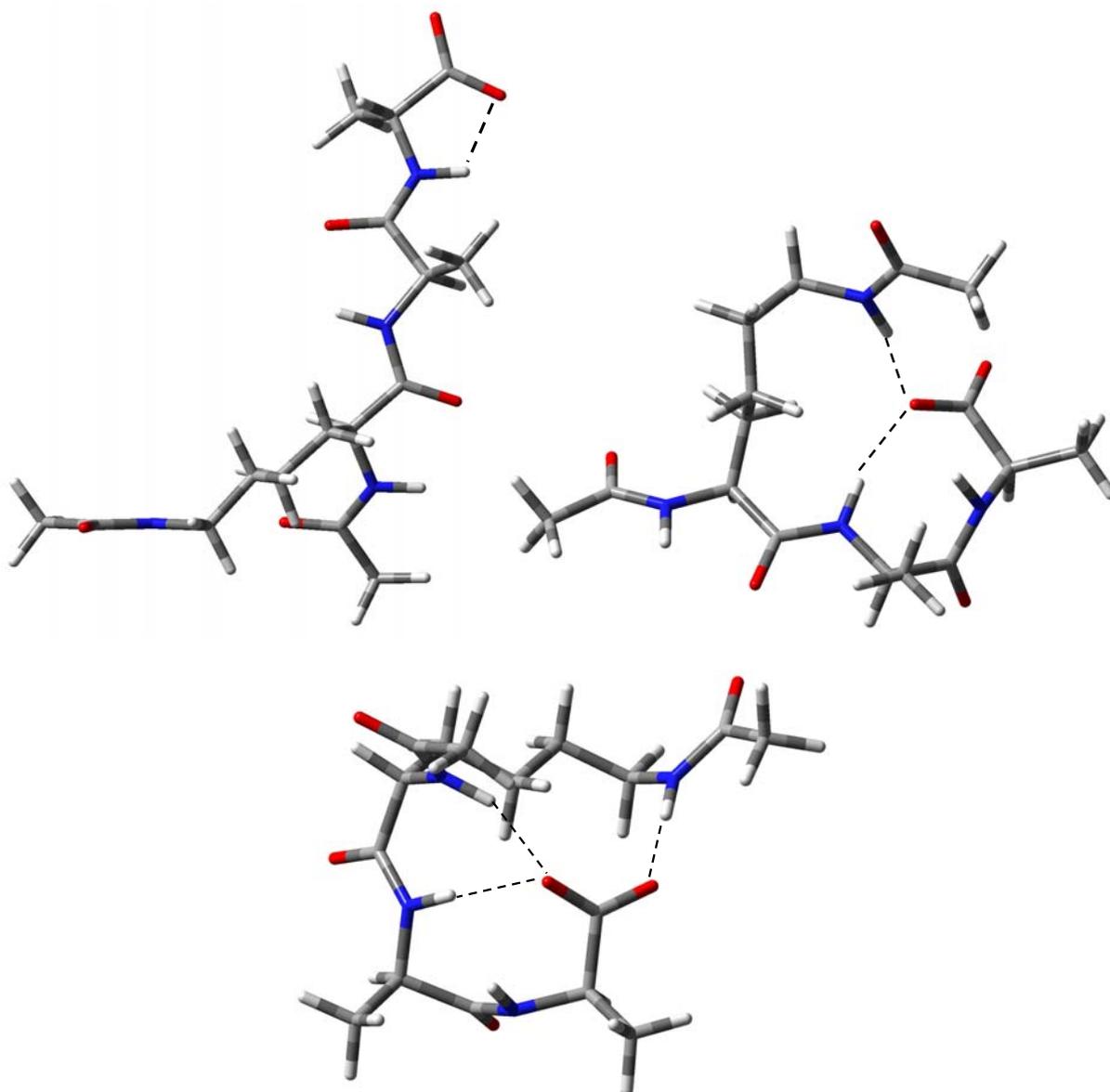


Figure 20: structures optimisées au niveau B3LYP/6-31+g(d) des conformères C1 (en bas), C2 (en haut, à droite) et C3 (en haut, à gauche) du peptide Ac₂K^DA^D déprotoné. Les liaisons H impliquant le groupe COO⁻ sont notées par des tirets.

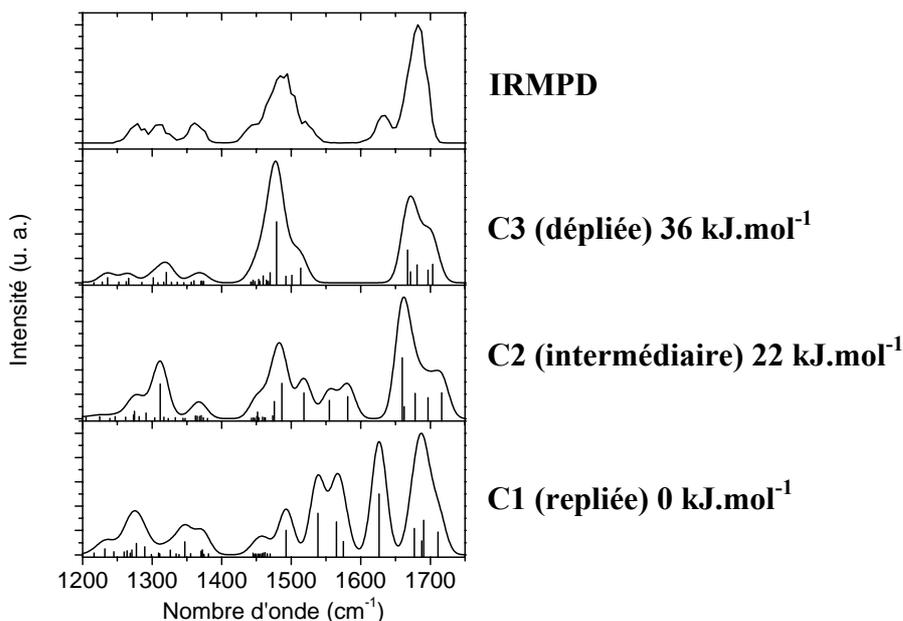


Figure 21: spectres IRMPD (en haut) et simulés au niveau B3LYP/6-31+g(d) des conformations C1, C2 et C3 (de bas en haut) du récepteur Ac₂K^DA^DA déprotoné. Les fréquences sont multipliées par les facteurs d'échelle spécifiques. Les transitions non-convoluées sont indiquées par des barres, et la convolution a été réalisée avec une fonction gaussienne de largeur à mi-hauteur 25 cm⁻¹. L'énergie libre relative au conformère C1 est indiquée en kJ.mol⁻¹.

b) La vancomycine déprotonée isolée garde-t-elle sa forme native ?

Nous avons utilisé une solution d'acétate d'ammonium pour les mesures des spectres des espèces déprotonées. Le pH de cette solution est de 7. A ce pH, la vancomycine se trouve en solution sous forme zwitterionique: d'après les pKa indiqués dans la Figure 4, le groupement carboxylate est déprotoné et les deux sites basiques sont protonés, on a donc une charge nette de +1. Lors de la mise en phase gazeuse, les sites chargés positivement ont une faible probabilité de survivre. On obtient donc naturellement la vancomycine une fois déprotonée. D'après la structure issue de la PDB, les deux groupes protonés sont fortement solvatés en solution. On peut donc s'attendre à une faible perturbation de cette structure une fois isolée. C'est pourquoi j'ai simulé le spectre IR de la vancomycine déprotonée au niveau du groupe carboxyle, après optimisation préalable au niveau AM1 puis ré-optimisation et calcul des fréquences au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1. Comme dans l'étude en mode positif, il faut effectuer deux calculs ONIOM, et rassembler les fréquences uniquement décrites par la méthode B3LYP, pour obtenir le spectre IR simulé. Dans un souci de clarté et

afin de donner plus de poids aux bandes intenses, seules les transitions dépassant 100 km.mol^{-1} ont été retenues. Les facteurs d'échelle spécifiques utilisés sont ceux que j'ai déterminés dans le chapitre III de cette thèse. Pour les modes de vibration autres que l'élongation des groupes C=O et COO⁻, ainsi que le pliage des groupes NH et NH₂, j'ai multiplié leur fréquence par la moyenne de tous les facteurs d'échelle spécifiques de la méthode ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1. Ce spectre simulé est superposé à l'expérience dans la Figure 22. L'ensemble du spectre IRMPD est très bien reproduit, en particulier les bandes amide I et II. La position de la bande expérimentale à 1313 cm^{-1} , attribuée au mode symétrique du groupement COO⁻, est prédite à une fréquence plus basse de 9 cm^{-1} , ce qui est acceptable, mais le nombre d'onde du mode asymétrique est calculé à 1678 cm^{-1} , alors que la bande expérimentale attribuée à ce mode apparaît à 1625 cm^{-1} et qu'aucune transition n'est prédite autour de cette valeur... Il est probable que le problème soit similaire à celui rencontré dans le cas du récepteur Ac₂K^DA^DA déprotoné (cf. Chapitre V:3.2 a). Nous pouvons donc ici conclure que le conformère dont le spectre est montré dans la Figure 22 est majoritairement peuplé à 300 K. Comme la RMSD entre les deux structures issues des calculs ONIOM n'est que de 1 \AA , on peut superposer celles-ci à celle de la vancomycine en phase condensée, comme présenté sur la Figure 23. La RMSD est alors de $4,5 \text{ \AA}$.

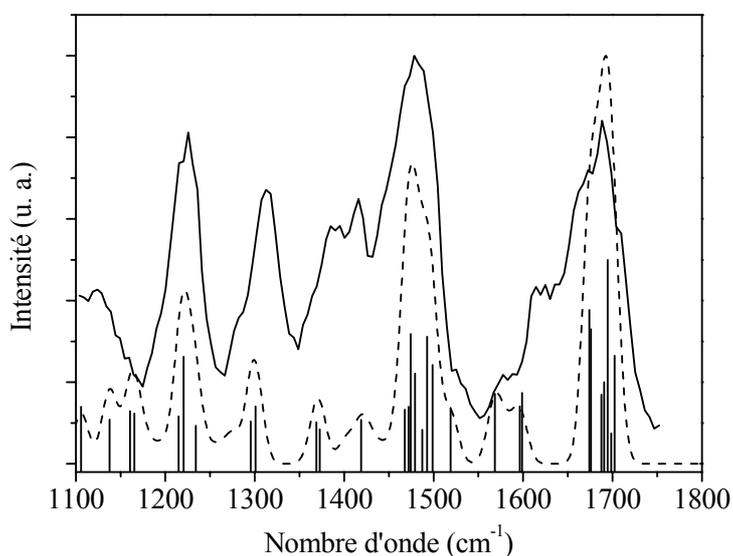


Figure 22: spectres IRMPD (trait plein) et simulé au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1 (tirets) de l'ion [V - H⁺] dont la structure apparaît sur la Figure 23. La convolution a été réalisée avec une fonction gaussienne de 25 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur.

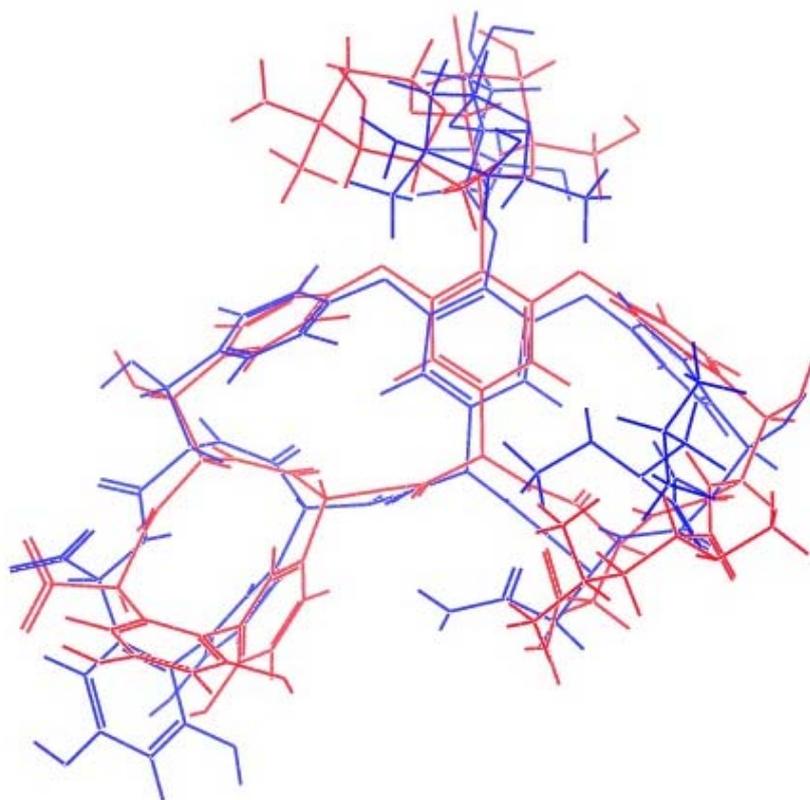


Figure 23: superposition des structures PDB (en rouge) et optimisée au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1 (en bleu) du système $[V - H^+]$. Le RMSD entre les deux est de 4,5 Å.

c) La complexation « fige » la structure de la vancomycine isolée

Afin d'en savoir plus sur les changements structuraux induits par le récepteur sur la vancomycine isolée, j'ai simulé les spectres IR des complexes $[V+Ac_2K^D A^D A-H^+]$ et $[V+Ac_2K^D A^D A-2H^+]$ au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1. Comme les conclusions de la partie précédente vont dans le sens d'une structure du complexe proche de celle révélée par la cristallographie, j'ai tiré les coordonnées atomiques directement de la PDB et ai ajouté les atomes d'hydrogènes manquants pour neutraliser la vancomycine sans créer de zwitterion, tout en gardant le groupement carboxylate du récepteur. La comparaison simulation/expérience pour le complexe une fois déprotoné est donnée dans la Figure 24. On constate immédiatement que la majorité des bandes expérimentales sont bien reproduites par la simulation. Des différences notables existent toutefois: par exemple, l'absorption du groupe C=O du C terminal est prédite à 1759 cm^{-1} mais absente du spectre IRMPD, pour la simple et bonne raison que celui-ci s'arrête à 1748 cm^{-1} . La partie basses fréquences de la bande amide

Il est bien reproduite, mais la bande simulée s'élargit trop vers les hautes fréquences, notamment à cause d'une transition intense à 1537 cm^{-1} . Celle-ci est due à l'excitation du mode de pliage de la liaison NH du groupement acétyle situé sur la chaîne latérale de la lysine du récepteur. Ce groupement est entouré sur la Figure 25, et on peut alors voir qu'il existe une liaison H forte entre les groupes NH et C=O des deux groupements acétyles, ce qui explique le fort décalage vers les hautes fréquences du mode de pliage du groupement NH. Le fait que l'intensité de la bande expérimentale soit bien plus faible est peut-être le signe que ce groupement acétyle est libre, ce qui ramènerait sa fréquence de vibration aux alentours de 1500 cm^{-1} . Les deux transitions responsables de la bande autour de 1225 cm^{-1} sont les modes d'élongation C-O des ponts esters situés entre chaque cycle substitué par un atome de chlore et le cycle benzénique substitué par le groupement disaccharide.

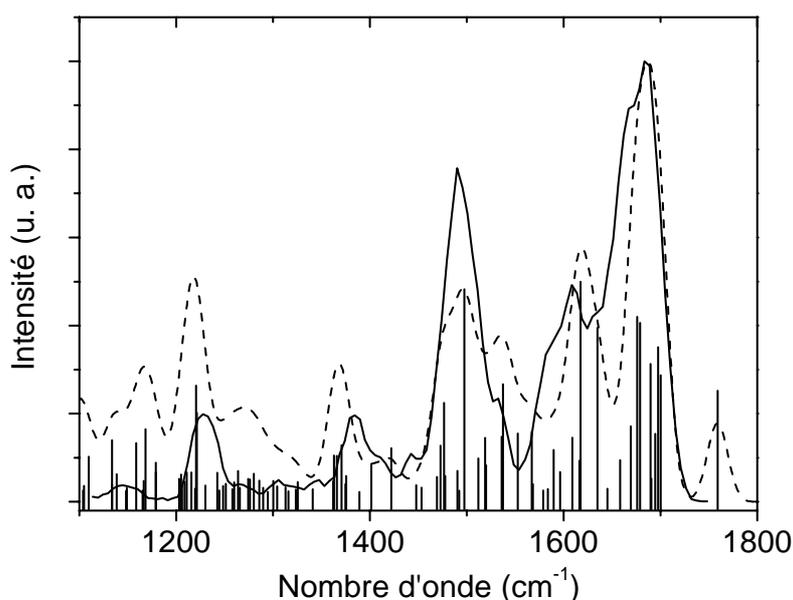


Figure 24: comparaison des spectres IRMPD (en trait plein) et simulé (en tirets) au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1 du complexe $[V+Ac_2K^D A^D A - H^+]^-$ dont la structure apparaît dans la Figure 25. La convolution a été réalisée avec une fonction gaussienne de 25 cm^{-1} de largeur à mi-hauteur.

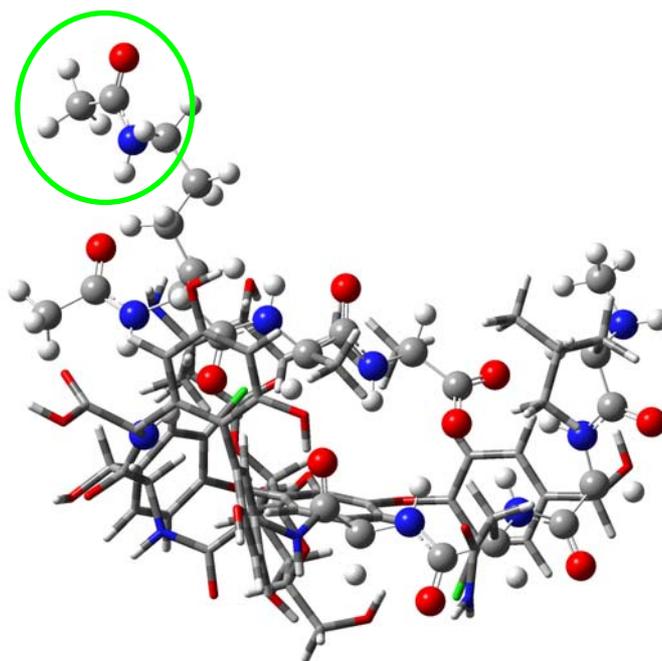


Figure 25: structure du conformère du complexe $[V+Ac_2K^D A^D A-H^+]$ dont le spectre est présenté dans la Figure 24. Les atomes du récepteur et ceux de la vancomycine qui sont interaction avec celui-ci sont représentés par des boules. Le groupement acétyle de la chaîne latérale de la lysine est entouré.

En ce qui concerne le groupe carboxylate, la fréquence du mode d'élongation symétrique est calculée par la méthode ONIOM à 1371 cm^{-1} , contre 1384 cm^{-1} pour l'IRMPD, soit -13 cm^{-1} d'écart absolu, ou 1 % en relatif, ce qui paraît raisonnable. La fréquence de son mode asymétrique est, quand à elle, prédite à 1618 cm^{-1} , alors que le maximum de la bande expérimentale se situe à 1608 cm^{-1} , soit un écart de $+10\text{ cm}^{-1}$. C'est très proche, mais cela paraît curieux vis-à-vis des problèmes rencontrés dans les paragraphes précédents pour ce mode. Pour tester les prédictions de l'effet de l'interaction entre la vancomycine et le groupe COO^- du récepteur sur la fréquence de son mode asymétrique, j'ai calculé cette fréquence pour un modèle de cette interaction au niveau B3LYP/6-31+g(d). Sa structure est donnée dans la Figure 26. Les modes asymétriques et symétriques sont prédits à 1634 et 1379 cm^{-1} . Comme les structures du modèle isolé et de celui-ci dans la vancomycine sont proches, comme illustré sur la Figure 26, les différences de prédiction ne viennent que du changement de méthode de calcul. On constate que l'écart se réduit pour le mode symétrique, ce qui est bon signe, mais il est plus élevé dans le cas du mode asymétrique, ce qui est plus logique au vu des résultats précédents. J'ai aussi simulé le spectre IR du modèle en enlevant la partie modélisant la vancomycine: l'écart entre la fréquence du mode asymétrique du groupe COO^- et celle dans le modèle complet est de 21 cm^{-1} . Or la différence de fréquence expérimentale,

entre la bande du spectre du récepteur isolé et dans le complexe avec la vancomycine, est de $1635 - 1608 = 27 \text{ cm}^{-1}$, ce qui est proche. Ces bandes expérimentales à 1608 et 1384 cm^{-1} sont donc sûrement la signature de l'interaction entre le groupe carboxylate et la poche de liaison de la vancomycine, ce qui prouve qu'elle survit en phase gazeuse. Un récapitulatif des fréquences calculées et expérimentales concernant les modes de vibration du groupe carboxylate peut être trouvé dans le Tableau 4.

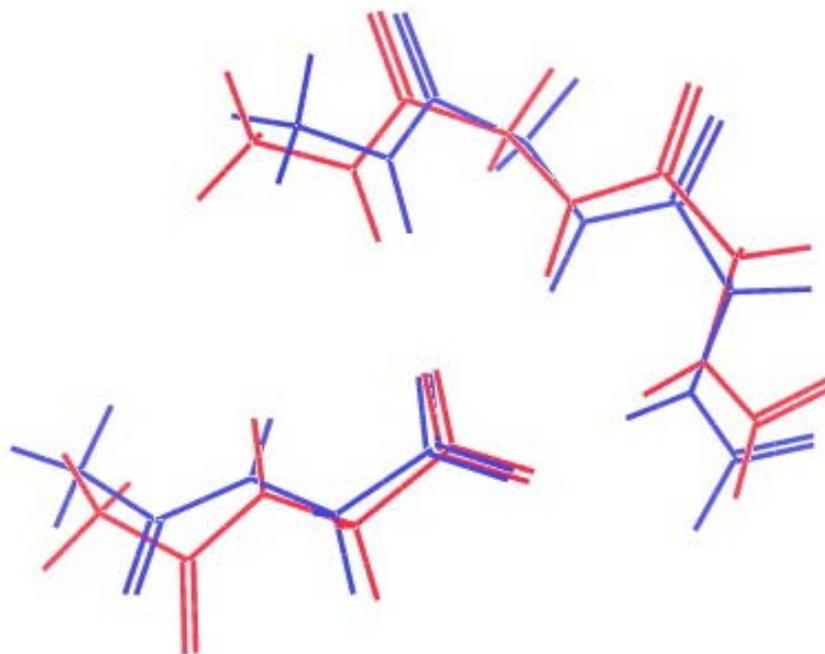


Figure 26: superposition des structures du modèle utilisé pour valider les calculs ONIOM des fréquences des modes d'élongation du groupement carboxylate. Le RMSD entre ce modèle isolé et dans la vancomycine est de $3,9 \text{ \AA}$.

Tableau 4 : résumé des valeurs des positions des bandes des modes de vibration d'élongation des groupements carboxylates mesurées et calculées au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1 (sauf pour le modèle où les simulations sont réalisées au niveau B3LYP/6-31+g(d)) dans les divers systèmes abordés.

Bande	$\nu(\text{COO}^-)_s$ [V-H ⁺]	$\nu(\text{COO}^-)_{as}$ [V-H ⁺]	$\nu(\text{COO}^-)_s$ [Ac ₂ K ^D A ^D A-H ⁺]	$\nu(\text{COO}^-)_{as}$ [Ac ₂ K ^D A ^D A-H ⁺]
Position expérimentale (cm ⁻¹)	1313	1625	1310	1635
Position calculée (cm ⁻¹)	1304	1678	1318	1664
Bande	$\nu(\text{COO}^-)_s$ [V+Ac ₂ K ^D A ^D A-H ⁺]	$\nu(\text{COO}^-)_{as}$ [V+Ac ₂ K ^D A ^D A-H ⁺]	$\nu(\text{COO}^-)_s$ modèle de l'interaction récepteur/ vancomycine	$\nu(\text{COO}^-)_{as}$ modèle de l'interaction récepteur/ vancomycine
Position expérimentale (cm ⁻¹)	1384	1608	X	X
Position calculée (cm ⁻¹)	1371	1618	libre: 1330; lié: 1379	libre: 1655; lié: 1634

Le degré de similitude entre la structure du complexe dans le cristal et celle du conformère donnant le spectre de la Figure 24 peut être mesuré par l'écart quadratique moyen (RMSD) minimal des distances entre paires d'atomes, c'est-à-dire lorsqu'on superpose les deux structures (on peut prendre la structure optimisée par la méthode ONIOM car les structures optimisées dans les trois calculs sont très proches). Il est de 1,2 Å et une représentation de la superposition est donnée sur la Figure 27. On peut constater que les structures sont très voisines, les différences majeures se situant dans le groupement disaccharide et la chaîne latérale de la lysine du récepteur.

Une autre comparaison intéressante peut être faite: dans la Figure 28 sont présentées les structures issues de la PDB, et optimisées au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1, de la vancomycine déprotonée isolée et de la vancomycine dans le complexe déprotoné. Nous avons vu que ces deux conformères font partie des familles qui sont majoritairement peuplées en phase gazeuse. Cette figure est donc l'équivalent de la Figure 2, qui montrait l'effet d'ajustement induit par le récepteur sur la structure de la vancomycine dans un cristal. On constate qu'en phase gazeuse, cet ajustement a une amplitude plus grande qu'en phase condensée.

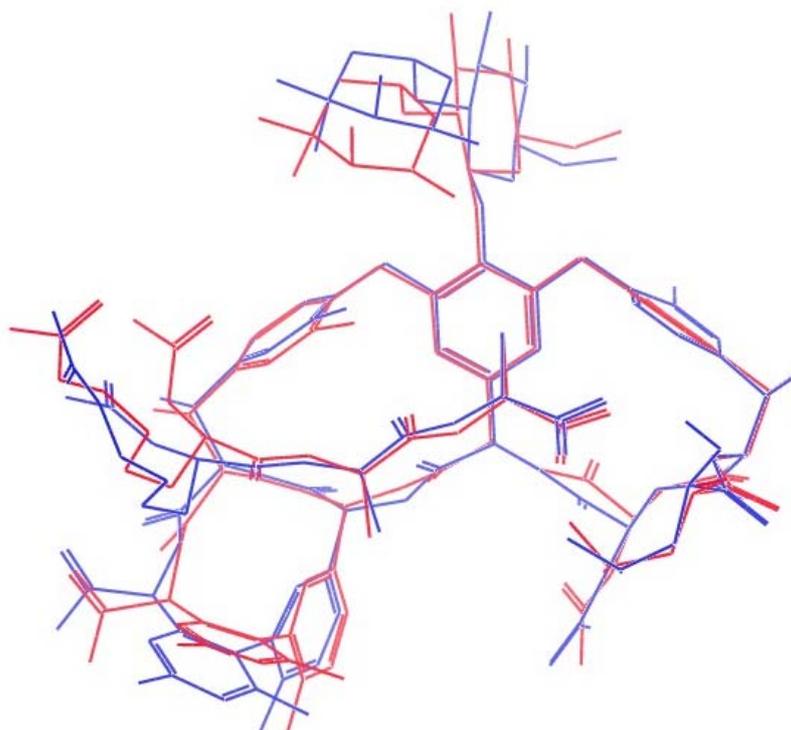


Figure 27: superposition des structures PDB et optimisée au niveau ONIOM/6-31+g(d):AM1 du complexe $[V+Ac_2K^D A^D A-H^+]$. Le RMSD entre les deux est de 1,2 Å.

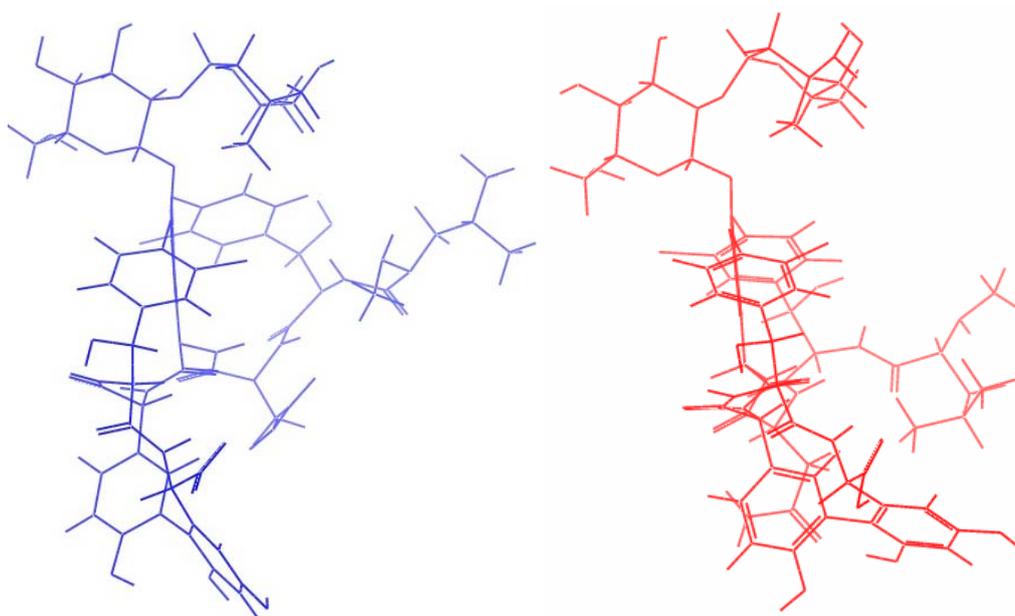


Figure 28: comparaison des structures optimisées au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1 de la vancomycine déprotonée isolée (à gauche) et neutre dans le complexe $[V+Ac_2K^D A^D A-H^+]$ (à droite).

V.4 Conclusion du chapitre

Pour résumer les résultats obtenus dans ce chapitre, on peut dire que des expériences de spectrométrie de mobilité ionique et de spectroscopie IRMPD, couplées à des simulations, ont permis d'obtenir des informations sur les familles de conformations peuplées à 300 K, après mise en phase gazeuse par électrospray, de la vancomycine protonée et déprotonée, ainsi que de ses complexes avec un modèle de la partie de son récepteur reconnue spécifiquement. Nous en avons également déduit le site de fixation et les changements majeurs de structure induits par la complexation. Ce travail montre le potentiel de l'approche incluant ces deux techniques expérimentales complémentaires et des simulations qui permettent une interprétation fine des résultats bruts.

- (1) Williams, D. H. *Natural Products Reports* **1996**, *13*, 469.
- (2) Pearce, C. M.; Gerhard, U.; Williams, D. H. *Journal of the Chemical Society - Perkins Transactions 2* **1995**, 159.
- (3) Nieto, M.; Perkins, H. R. *Biochemical Journal* **1971**, *123*, 789.
- (4) Nieto, M.; Perkins, H. R. *Biochemical Journal* **1971**, *124*, 845.
- (5) Kannan, R.; Harris, C. M.; Harris, T. M.; Waltho, J. P.; Skelton, N. J.; Williams, D. H. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *110*, 2946.
- (6) Rajagopalan, J. S.; Harris, C. M.; Harris, T. M. *Bioorganic Chemistry* **1995**, *23*, 54.
- (7) Liu, J.; Volk, K. J.; Lee, M. S.; Pucci, M.; Handwerker, S. *Analytical Chemistry* **2002**, *66*, 2412.
- (8) Popieniek, P. H.; Pratt, R. F. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *113*, 2264.
- (9) Nieto, M.; Perkins, H. R. *Biochemical Journal* **1971**, *123*, 773.
- (10) Williams, D. H.; Waltho, J. P. *Biochemical Pharmacology* **1988**, *37*, 133.
- (11) Harris, C. M.; Kannan, R.; Kopecka, H.; Harris, T. M. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *107*, 6652.
- (12) Jørgensen, T. J. D.; Delforge, D.; Remacle, J.; Bojesen, G.; Roepstorff, P. *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *188*, 63.
- (13) Kim F. Haselmann; Thomas J. D. Jørgensen; Bogdan A. Budnik; Frank Jensen; Roman A. Zubarev. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 2260.
- (14) Gregoire, G.; Gaigeot, M. P.; Marinica, D. C.; Lemaire, J.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, *9*, 3082.
- (15) Johnson, J. L. H.; Yalkowsky, S. H. *Aaps Pharmscitech* **2006**, 7.
- (16) Yang, Z.; Vorpapel, E. R.; Laskin, J. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 13013.
- (17) Andersen, J. U.; Bonderup, E.; Hansen, K. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 6518.
- (18) Haselmann, K. F.; Jørgensen, T. J. D.; Budnik, B. A.; Jensen, F.; Zubarev, R. A. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 2260.
- (19) Kruger, N. A.; Zubarev, R. A.; Horn, D. M.; McLafferty, F. W. *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *187*, 787.
- (20) Heck, A. J. R.; Jørgensen, T. J. D.; O'Sullivan, M.; von Raumer, M.; Derrick, P. J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 1255.
- (21) Harrison, A. G.; Young, A. B.; Bleiholder, C.; Suhai, S.; Paizs, B. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 10364.
- (22) Zhang, H.; Grabenauer, M.; Bowers, M. T.; Dearden, D. V. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 1508.
- (23) Yang, E. R. V., Julia Laskin,. *Chemistry - a European Journal* **2009**, *15*, 2081.
- (24) Heck, A. J. R.; Jørgensen, T. J. D. *International Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *236*, 11.
- (25) Takács-Novák, K.; Noszál, B.; Tokes-Kovesdi, M.; Szasz, G. *Journal of Computational Chemistry* **1990**, *11*, 440.
- (26) Oomens, J.; Steill, J. D.; Redlich, B. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 4310.
- (27) Wolpert, M.; Hellwig, P. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2006**, *64*, 987.
- (28) Kapota, C.; Lemaire, J.; Maitre, P.; Ohanessian, G. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 1836.
- (29) Prell, J. S.; O'Brien, J. T.; Steill, J. D.; Oomens, J.; Williams, E. R. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 11442.
- (30) Oomens, J.; Steill, J. D. *The Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 3281.

s

Chapitre VI: Brins de la protéine Amyloïde β en phase gazeuse

VI.1 Introduction

Après avoir évalué, dans le chapitre précédent, les possibilités et performances de la technique expérimentale IRMPD couplée aux calculs de chimie quantique poussés sur la prédiction des caractéristiques structurales du pentapeptide AGWLK en phase gazeuse, je vais présenter mes travaux sur des systèmes plus gros : les brins 12-28 (acides aminés 12 à 28 inclus) et 1-28 de la protéine amyloïde β (celle-ci sera notée $A\beta$ dans la suite de ce chapitre). Leur flexibilité à 300 K, et donc leur diversité conformationnelle, rendent irréalisable une étude similaire à celle réalisée pour le peptide AGWLK. Une approche pluri-expérimentale, combinant spectrométrie de mobilité ionique et spectroscopie IRMPD, a donc été choisie. Le brin 12-28 contient 276 atomes, et son spectre IR peut être simulé avec la méthode ONIOM. L'analyse des résultats de la spectroscopie IRMPD pourra donc s'appuyer sur des calculs de structures modèles. Par contre, ce ne sera pas possible pour le brin 1-28 et je me suis donc basé principalement sur des comparaisons entre spectres IRMPD et sur les données de la mobilité ionique. Décrite dans le chapitre II de ce manuscrit, celle-ci a le pouvoir de séparer les différentes familles de conformations d'un même ion moléculaire par la mesure indirecte de leurs sections efficaces. Cependant, ces sections efficaces ne sont bien distinctes que pour les systèmes assez gros et flexibles. La raison en est que le système doit pouvoir se replier assez sur lui-même pour que la différence de section efficace entre les conformations soit conséquente, en tout cas plus grande que la résolution de la mesure. Lorsqu'un peptide est totalement replié, la conformation compacte qu'il prend est appelée « globulaire » (petite section efficace), mais il peut également se trouver sous des formes plus dépliées, comme les structures secondaires feuillet β et hélice α , qui ont de plus grandes sections efficaces. Or la chaîne peptidique doit être assez longue pour autoriser le repliement, c'est pourquoi la spectrométrie de mobilité ionique n'est vraiment intéressante que pour des peptides assez gros. Dans une publication récente, R. Wu et T. McMahon montrent que les polyglycines protonés $[G_n+H^+]$ se replient à partir de $n = 4$ ¹ mais, la glycine étant le plus flexible des acides aminés étant donné son absence de chaîne latérale, on peut faire l'hypothèse qu'au moins 5 acides aminés quelconques sont nécessaires pour espérer observer une différence de section efficace. Le but de l'étude est également différent de celui du chapitre précédent : il ne s'agit pas de trouver les quelques conformations peuplées, il en existe au moins plusieurs

dizaines dans nos expériences à température ambiante, mais plutôt les *familles* de structures secondaires, caractérisées par la forme de leur chaîne peptidique. Je parlerai surtout de structures globulaires (sans ordre régulier) et d'hélice α (illustrée dans la Figure 1). En plus des expériences de mobilité, je m'aiderai de logiciels de recherche de conformations et de dynamique moléculaire, ainsi que d'un programme de calcul de section efficace : Mobcal. Pour plus d'informations, se reporter au chapitre III de ce travail.

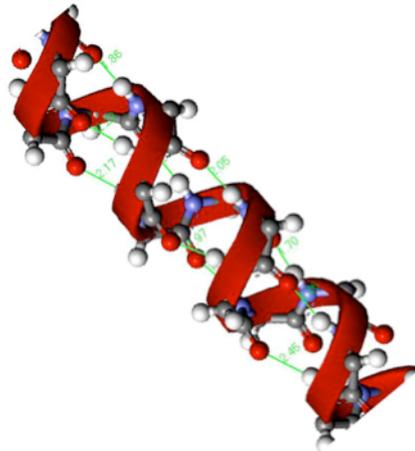


Figure 1 : illustration de la structure secondaire hélice α
(<http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Slides/Protein%20Structure/>).

La protéine amyloïde β ($A\beta$) est une forme anormale d'une protéine membranaire que l'on trouve sur les cellules du corps humain, et qui est impliquée dans plusieurs maladies neuro-dégénératives comme celle d'Alzheimer. En effet, on retrouve dans le cerveau des patients atteints des plaques composées en majorité des brins 1-40 (acides aminés n°1 à 40) et 1-42 de l' $A\beta$. Le brin 1-42 est beaucoup plus neurotoxique que le brin 1-40, ce qui montre qu'une petite différence de séquence dans une protéine peut induire de grands changements de comportement. Dans ces plaques, leur structure secondaire est en feuillet β , alors que les mesures RMN montrent qu'en solution le brin 1-42 est composé de domaines en hélice α séparés par des jonctions flexibles déstructurées (code PDB 1z0q, voir Figure 2). Un mauvais repliement est à l'origine de ce changement de conformation qui autorise la protéine à s'agréger, et les études actuelles tendent à montrer que ce sont les petits oligomères solubles qui sont toxiques². Un des axes de recherche de la lutte contre ces maladies est la fabrication de médicaments capables d'inhiber ce changement de conformation en se fixant sur la protéine. L'équipe de D. Weaver à Halifax (Canada) s'est engagée dans cette voie et a conçu

des molécules dont la cible privilégiée est la séquence H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆ de la protéine A β . En effet, la séquence BBXB (avec B basique et X un acide aminé quelconque) est commune à 43 protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer, le but serait donc de cibler toutes ces protéines avec un seul médicament afin d'optimiser son efficacité ³.

Un nombre conséquent d'études des divers brins en solution a été mené, mais les études en phase gazeuse restent peu nombreuses. Le groupe de M. T. Bowers à l'Université de Santa Barbara (USA) a cependant, depuis quelques années, fourni un travail important sur les caractéristiques structurales des différents brins de cette protéine et de leurs oligomères isolés par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse. Ils ont ainsi étudié l'agrégation du brin entier ⁴ et l'effet de diverses mutations d'acides aminés sur le repliement et la complexation du brin 21-30 ^{5,6}. Ce groupe a également montré que le brin 1-40 se fixe sur le brin 1-42 et empêche son agrégation ⁷, et même que le dodécamère de ce brin est particulièrement toxique ⁸. D'autres études ont été menées par dissociation par capture d'électron (ECD) ⁹ ou spectrométrie de masse ^{10,11}. Une approche par spectroscopie IR-REMPI couplée à la spectrométrie de masse a été récemment appliquée à la recherche des structures secondaires des formes neutre et protonée du peptide protégé Ac-VQIVYK-NHCH₃ ¹². Ce peptide est un fragment de la protéine tau (également impliquée dans la maladie d'Alzheimer) et est indispensable à son agrégation sous forme de fibres analogues à celles formées par l'A β ¹³. Cette séquence s'agrège d'ailleurs spontanément en solution. Les résultats de cette étude semblent indiquer qu'en phase gazeuse, ce peptide neutre adopte la forme d'une épingle à cheveux avec un réseau de liaisons H comparable à celui d'un feuillet β , mais que la protonation détruit cette structure en induisant un repliement ayant pour but de solvater la charge par des groupements C=O.

En plus de leur intérêt intrinsèque, les différents brins de l'A β peuvent constituer des systèmes modèles de structures secondaires typiques de celles rencontrées dans les protéines. En effet, la détermination des signatures spectroscopiques des structures régulières du type feuillet β et hélice α est un but recherché activement par diverses équipes. La série de publications récentes du groupe de T. Rizzo constitue le travail le plus abouti dans cette voie: celui-ci tend à prouver que les hélices α peuvent survivre en l'absence de solvant ¹⁴⁻¹⁶. Pour notre part, nous avons décidé d'étudier des brins d'A β en utilisant la spectroscopie IRMPD (voir chapitre II). A notre connaissance, aucune mesure de spectre IR de brins d'A β en phase gazeuse n'a été publiée et c'est pourquoi nous avons décidé de mener des recherches sur les

caractéristiques conformationnelles intrinsèques de deux systèmes déjà étudiés en solution ou par cristallographie : les brins 1-28 et 12-28.

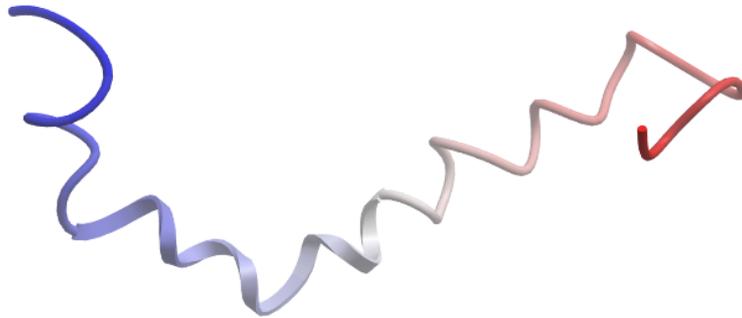


Figure 2 : structure en solution de la protéine Amyloïde β 1-42 révélée par RMN.

VI.2 Les spectres IRMPD des grosses molécules sont-ils exploitables?

Nous avons mesuré les spectres IRMPD des différents états de charge du brin $A\beta_{1-28}$. Comme ce peptide est le plus gros jamais étudié par notre équipe, il est intéressant de comparer les résultats obtenus avec les spectres de peptides beaucoup plus petits : les séquences RGD et AA protonées. Comme beaucoup plus de groupements absorbent le rayonnement IR dans le brin du peptide $A\beta_{1-28}$, et que sa diversité conformationnelle à température ambiante risque d'être plus grande à cause des écarts d'énergie potentielle plus petits séparant les différents conformères existants, on s'attend à un élargissement des bandes dans les spectres IRMPD. Pour tester cette hypothèse, je compare les spectres des peptides $[AA+H^+]$ et $[RGD+H^+]$ à celui du peptide $[A\beta_{1-28}+3H^+]$ dans la Figure 3 et la Figure 4. Il est très surprenant de constater que même pour le dipeptide $[AA+H^+]$ les bandes présentes ont des largeurs similaires. Par exemple, la bande amide I à 1700 cm^{-1} correspond à l'excitation des modes C=O avec une largeur à mi-hauteur d'environ 100 cm^{-1} pour $[AA+H^+]$ et le brin d'amyloïde, et même de 180 cm^{-1} pour $[RGD+H^+]$! Il semble donc que notre hypothèse soit erronée, ce qui implique que les spectres de l'amyloïde sont exploitables. A partir des positions et des intensités relatives des bandes des spectres des différents peptides, on peut obtenir des informations qualitatives sur la famille de structures du brin $[A\beta_{1-28}+3H^+]$ peuplée à 300 K. Le maximum de la bande amide I est situé à 1640 cm^{-1} , ce qui correspond à des groupements C=O engagés fortement dans des liaisons H. Ce n'est pas étonnant au vu de la

grande taille du brin, une structure repliée est attendue. Cette valeur est notamment plus faible que celle des fréquences de vibration des groupements C=O du peptide $[AA+H^+]$, pour lequel une étude de l'équipe a montré que les conformères les plus peuplés possèdent des liaisons H de type C5. La majorité des groupements amide, dans le brin d'amyloïde, sont donc vraisemblablement engagés plus fortement dans des liaisons C_n avec $n > 5$.

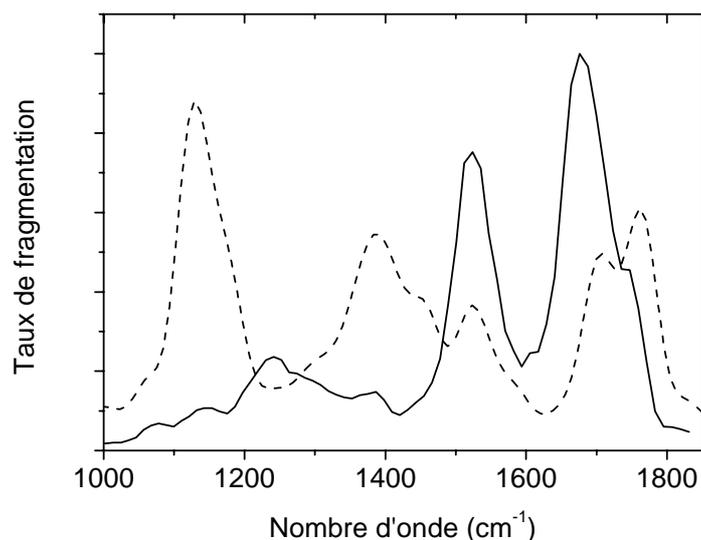


Figure 3 : comparaison entre les spectres IRMPD des peptides $[AA+H^+]$ (tirets) et $[A\beta_{1-28}+3H^+]$ (trait plein).

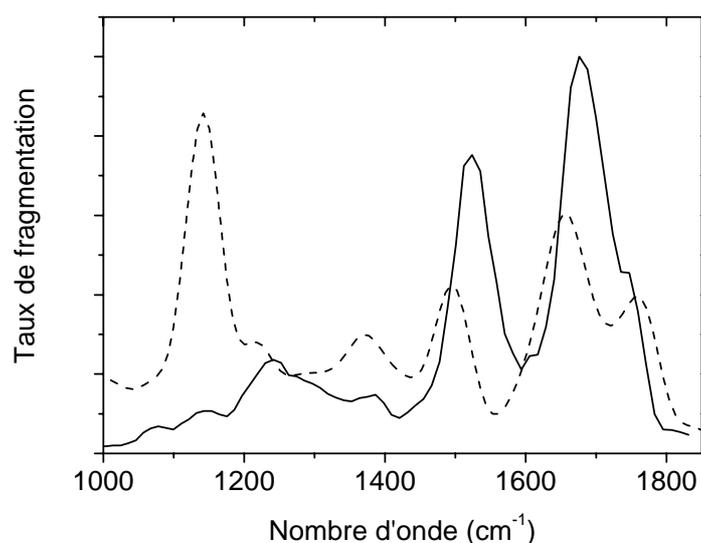


Figure 4 : superposition des spectres IRMPD des peptides $[RGD+H^+]$ (tirets) et $[A\beta_{1-28}+3H^+]$ (trait plein).

VI.3 Le TFE favorise la conservation de l'hélice α dans les brins d'amyloïde beta en phase gazeuse

3.1 Le cas du brin 12-28

a) Influence de l'état de charge

Le brin $A\beta_{12-28}$ (dans tout ce chapitre, $A\beta_X$ désignera la forme neutre non-zwitterionique du brin X de l'amyloïde β) a été étudié en solution par RMN et dichroïsme circulaire (CD). Un équilibre entre une conformation globulaire, favorisée à haute température (60 °C), et une conformation en hélice 3_1 a été trouvé¹⁷. Ce type d'hélice est celui qui est adopté par un peptide du type polyproline : elle tourne à gauche et les angles de Ramachandran (voir Figure 5) sont égaux à $\varphi = -75^\circ$ et $\psi = 150^\circ$. La Figure 6 illustre l'absence de liaisons H dans cette structure, qui est plus dépliée qu'une hélice α .

Nous avons utilisé une source électrospray pour mettre les brins d'amyloïde β en phase gazeuse. Ce type de source est décrit dans le chapitre II de ce manuscrit. Les molécules sont dissoutes dans une solution avant d'être injectées dans la source. Souvent, un mélange d'eau et de méthanol, donc un environnement polaire, est utilisé. Comme un solvant apolaire ne favorise pas la création de liaisons H entre le solvant et les molécules dissoutes, une structure différente de celle observée après dissolution dans un solvant polaire peut être présente en phase gazeuse. L'influence du solvant sur la structure des molécules d'intérêt biologique a été étudiée par de nombreuses équipes^{18,19}. Il est clairement établi que les alcools, et en particulier le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE), stabilisent fortement la structure secondaire en hélice α des protéines. Nous avons donc dissout le brin $A\beta_{12-28}$ dans un mélange de TFE et de méthanol (1/1 en volume), dont les constantes diélectriques sont similaires (autour de 30).

Les spectres de mobilité ionique des états de protonation $2H^+$ et $3H^+$ sont visibles sur la Figure 7. Le plus bas état de charge possède un spectre composé d'un seul pic centré sur 426 \AA^2 , ayant une largeur à mi-hauteur d'environ 25 \AA^2 . La largeur théorique pour une conformation unique étant de 8 \AA^2 , on peut en conclure qu'une seule famille de conformations est présente en phase gazeuse. L'ajout d'un proton décale légèrement ce pic de 10 \AA^2 vers les hautes sections efficaces, et fait apparaître plusieurs pics supplémentaires mais d'intensité plus faible autour de 475 \AA^2 . Le pic principal est sûrement le signe d'une famille de conformations similaires à celles du pic du peptide deux fois protoné, mais un peu plus déplié, et les pics supplémentaires sont peut-être de nouvelles familles. Examinons maintenant les spectres

IRMPD de ces deux états de protonation : ils sont présentés sur la Figure 7. On peut constater qu'ils se ressemblent beaucoup, ce qui est cohérent avec une absence de changement structural conséquent après l'ajout d'un troisième proton. On observe également que la largeur des deux bandes amide I et II n'est que d'environ 60 cm^{-1} , ce qui est bien plus faible que dans les cas rencontrés au paragraphe VI.2 . Ceci peut être dû à une réduction de l'hétérogénéité conformationnelle, ou à une conformation ayant cette signature spécifique. Nous allons voir dans le paragraphe suivant que la seconde hypothèse est plus probable.

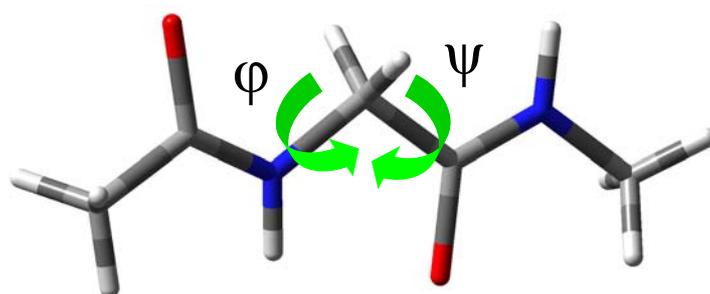


Figure 5 : illustration des angles de Ramachandran sur un modèle de deux liaisons peptidiques.

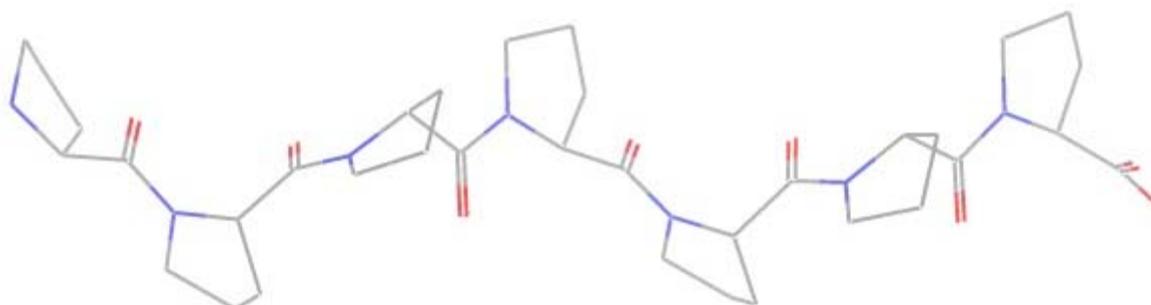


Figure 6 : un peptide composé de 7 prolines dont la structure secondaire est une hélice 3_1 . Les hydrogènes ont été omis pour des raisons de clarté.

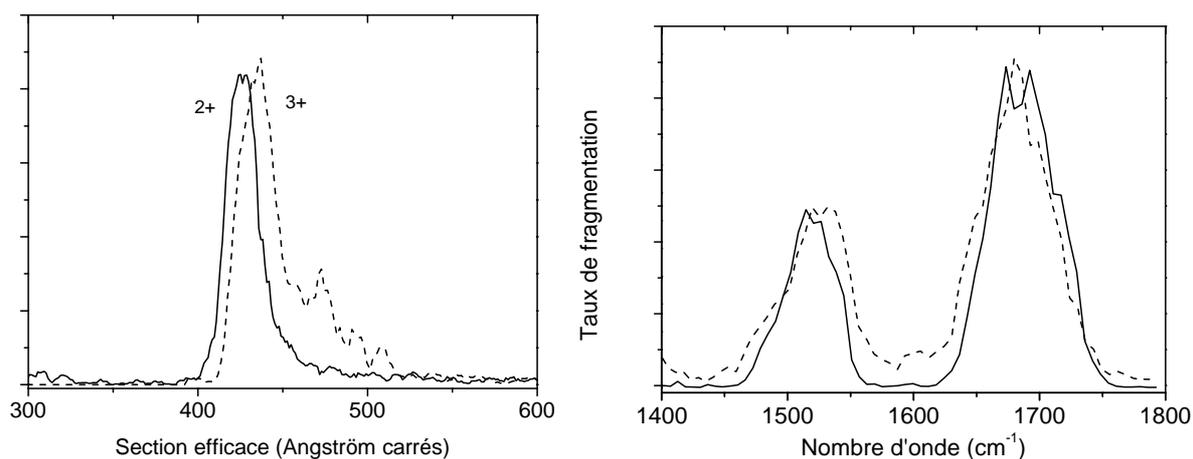


Figure 7 : spectres de mobilité ionique (à gauche) et spectres IRMPD (à droite) des états de charge 2+ (trait plein) et 3+ (tirets) du brin A β ₁₂₋₂₈.

b) L'hélice α est favorisée en phase gazeuse

Une recherche de conformations, par variation systématique des angles de torsion, a été menée en partant d'une conformation totalement dépliée. Le brin A β ₁₂₋₂₈ possède quatre acides aminés basiques (deux lysines et deux histidines) et le N terminal n'est pas protégé. On a donc cinq sites de protonation potentiels. J'ai protoné ceux ayant les plus grands pKa en solution d'après le Tableau 1, c'est-à-dire les chaînes latérales des deux lysines pour le brin [A β ₁₂₋₂₈ + 2H⁺], et ai ajouté un troisième proton sur le N terminal pour former l'autre état de charge. 32000 conformères du peptide doublement protoné ont été générés et 419 ont été trouvés entre 0 et 20 kcal.mol⁻¹. Les conformères de plus basse énergie potentielle font partie de deux familles principales : l'une possède une structure globulaire et l'autre est caractérisée par une forme proche de celle d'une hélice α . La section efficace moyenne des 15 conformères ayant l'énergie potentielle la plus basse, pour chacune des familles, est de 384 et 421 Å² respectivement. L'absence de signal expérimental en-dessous de 400 Å² permet d'exclure les conformères globulaires, et le bon accord entre calcul et expérience pour l'hélice α est un argument en faveur de la prédominance d'une telle structure secondaire. On peut imaginer que l'ajout du troisième proton, qui se fixe sur le N terminal d'après les pKa en phase aqueuse, ne perturbe pas trop la structure en hélice α car la distance moyenne entre ce proton et le plus proche des deux autres groupements chargés est, dans les 15 conformères de plus basse énergie issus de la recherche de conformation, de 10 Å. Il faut cependant garder à l'esprit que l'interaction entre les protons et le dipôle de l'hélice résultant de l'alignement des

liaisons amides polarisées est importante pour la stabilité de la structure: d'après une contribution de Kohtani *et al.* sur les peptides $[\text{AcKA}_{15}+\text{H}^+]$ et $[\text{AcA}_{15}\text{K}+\text{H}^+]$, ce dernier adopte une structure secondaire en hélice α , alors que la présence d'une lysine protonée sur le N terminal déstabilise l'hélice et induit une structure globulaire²⁰. Même si la situation est ici différente à cause des deux protons déjà présents, le troisième proton ne se fixe sans doute pas sur le N terminal mais sur une des chaînes latérales des deux histidines.

Les données issues des expériences de mobilité ionique sont donc assez clairement en faveur d'une famille de conformères ayant pour point commun une structure secondaire plutôt en forme d'hélice α . Afin de savoir si les conclusions d'une étude de spectroscopie IR sont similaires, j'ai utilisé la méthode ONIOM au niveau B3LYP/6-31g(d):AM1 pour simuler les spectres de trois conformères : celui de plus basse énergie potentielle issu de la recherche de conformations (noté C1, il possède une forme globulaire, et fait donc partie de la première famille), un conformère noté C2 et représentatif de la seconde famille (celle en forme d'hélice α), et une hélice α « parfaite » construite avec le logiciel Hyperchem, notée C3. Ces structures ont été optimisées au niveau AM1 puis ré-optimisées avec la méthode ONIOM.

Lorsqu'on examine les résultats, on constate qu'aucune des trois simulations ne reproduit l'expérience de façon satisfaisante. En effet, celle du conformère C1 est correcte au niveau des positions des bandes, mais les intensités relatives ne correspondent pas, et la bande amide I est trop large dans les bas nombres d'onde. Pour le conformère C2, c'est dans la partie hautes fréquences que la bande amide II est trop large, et la simulation prédit une bande autour de 1770 cm^{-1} qui n'est pas vue expérimentalement. La bande amide I est, par contre, très bien simulée et les intensités relatives également, ce dernier point étant partagé avec le spectre du conformère C3. Celui-ci prédit correctement la bande amide II, mais l'amide I est décalée vers le rouge d'environ 30 cm^{-1} . L'examen de ces simulations, sur des conformères ayant des structures modèles, montre que celles-ci ne correspondent pas strictement aux conformères présents en phase gazeuse à 300 K. La spectroscopie IRMPD étant plus sensible aux changements fins de structure, l'interprétation des données visant à tirer une information de structure secondaire est donc plus délicate.

Toutefois, on peut remarquer un point commun aux conformères C2 et C3, qui sont proches de ceux peuplés en phase gazeuse d'après l'étude de mobilité ionique : l'intensité relative des bandes amide I et II est très bien respectée, contrairement au cas du conformère C1. Comme ces deux bandes sont corrélées car elles proviennent de l'absorption des mêmes groupes chimiques, les caractéristiques de la redistribution de l'énergie par IVR doivent être

similaires, donc l'intensité relative expérimentale a un sens. Il semble donc pertinent de prendre ce critère comme signature spectroscopique par IRMPD de structures secondaires.

Pour conclure, on peut dire que l'absence de solvant semble favoriser, dans le cas de ce brin $A\beta_{12-28}$, une structure secondaire proche d'une hélice α , et donc différente de celle présente dans la solution de TFE/méthanol à température ambiante.

Tableau 1 : pKa des chaînes latérales des acides aminés acides (A) et basiques (B) isolés composant le brin $A\beta_{12-28}$ ainsi que des groupes amine et carboxyle des N et C terminaux.

N terminal	V	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	C terminal
9,7 (B)		6,0 (B)	6,0 (B)		10,5 (B)						4,1 (A)	3,9 (A)					10,5 (B)	2,2 (A)

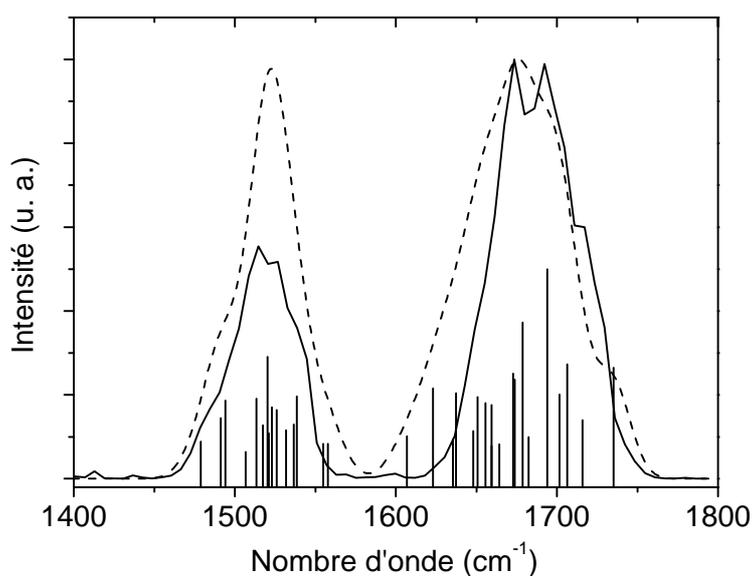


Figure 8 : superposition du spectre IRMPD (trait plein) et simulé (tirets) au niveau ONIOM B3LYP/6-31gd:AM1 du conformère C1 de l'ion $[A\beta_{12-28} + 2H^+]$, dont la structure est visible dans la Figure 9.

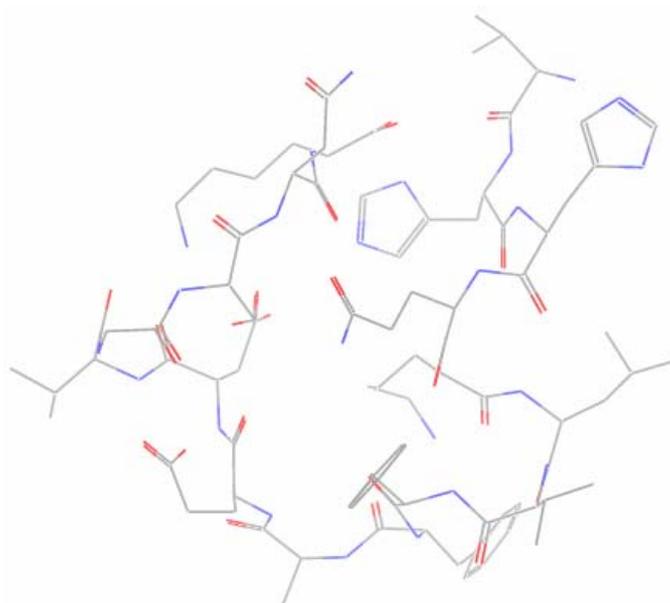


Figure 9 : structure du conformère C1 du système $[A\beta_{12-28} + 2H^+]$ dont les spectres IRMPD et simulés sont présentés dans la Figure 8.

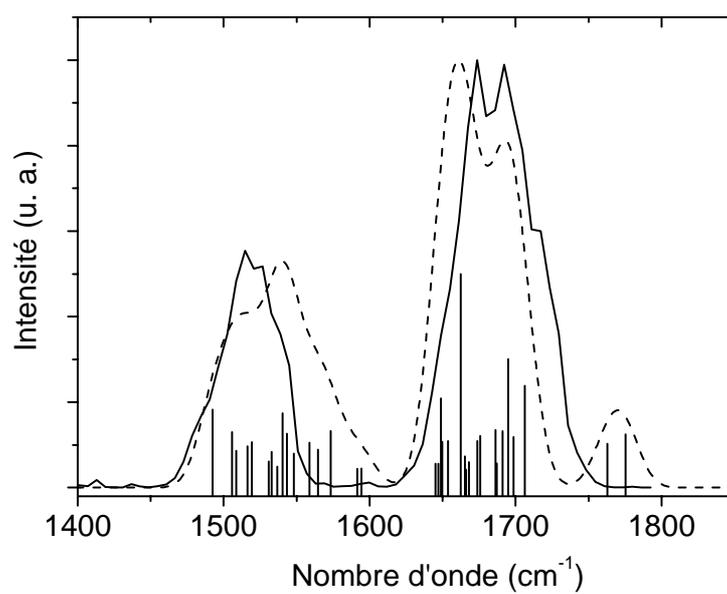


Figure 10 : spectres IRMPD (trait plein) et simulé au niveau ONIOM B3LYP/6-31gd:AM1 du conformère C2, dont la structure est présentée dans la Figure 11.

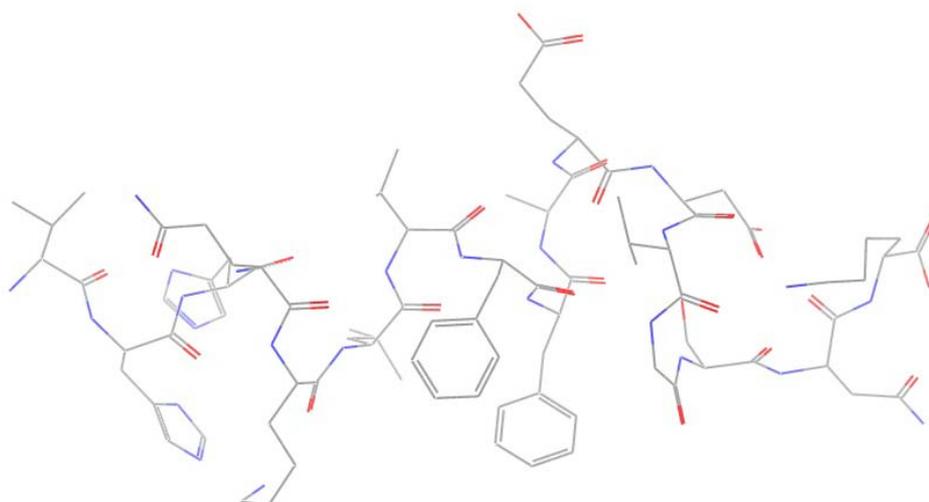


Figure 11 : conformère C2 de l'ion $[A\beta_{12-28} + 2H^+]$ décrit dans le texte. Son spectre simulé est montré dans la Figure 10.

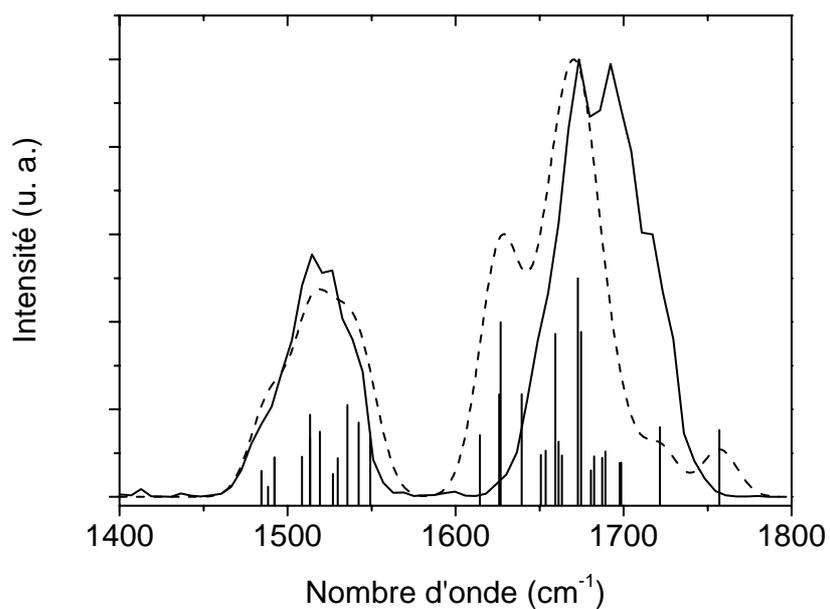


Figure 12 : superposition du spectre IRMPD (trait plein) et simulé (tirets) au niveau ONIOM B3LYP/6-31gd:AM1 du conformère C3 de l'ion $[A\beta_{12-28} + 2H^+]$ (voir sa structure dans la Figure 13).

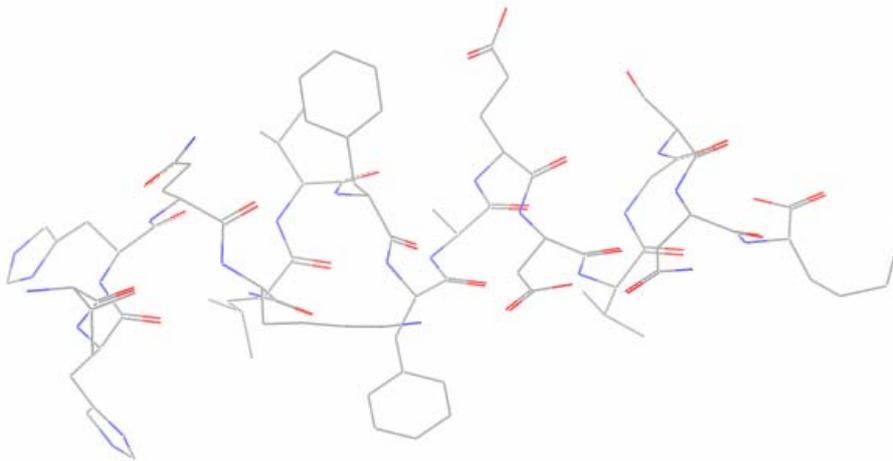


Figure 13 : structure du conformère C3 du système $[A\beta_{12-28} + 2H^+]$ dont les spectres IRMPD et simulés sont présentés dans la Figure 12.

3.2 Influence de la longueur du brin

Afin d'évaluer l'influence de la longueur des brins sur leur structure en phase gazeuse à partir d'une solution composée d'un mélange TFE/méthanol, nous avons mesuré le spectre IRMPD des ions $[A\beta_{1-28} + 2H^+]$ et $[A\beta_{1-28} + 4H^+]$ (cf. Figure 14). Les spectres des deux états de charge du même brin sont proches, surtout en ce qui concerne la bande amide I qui est légèrement affinée dans l'état de charge le plus haut, l'amide II se décalant de 20 cm^{-1} vers le rouge. Sur la Figure 15, une comparaison entre les spectres IRMPD des brins $A\beta_{1-28}$ et $A\beta_{12-28}$ dans le même état de protonation ($2H^+$) est donnée. On peut alors constater la similitude entre les spectres des deux brins dont la longueur diffère de 12 acides aminés: ils partagent probablement la même structure secondaire, celle-ci devant être une hélice α d'après les conclusions du paragraphe précédent. Ces résultats vont dans le sens d'une présence majoritaire des brins $A\beta_{1-28}$ sous forme d'hélice α en phase gazeuse lorsqu'ils sont dissout dans une solution formée d'un mélange TFE/méthanol.

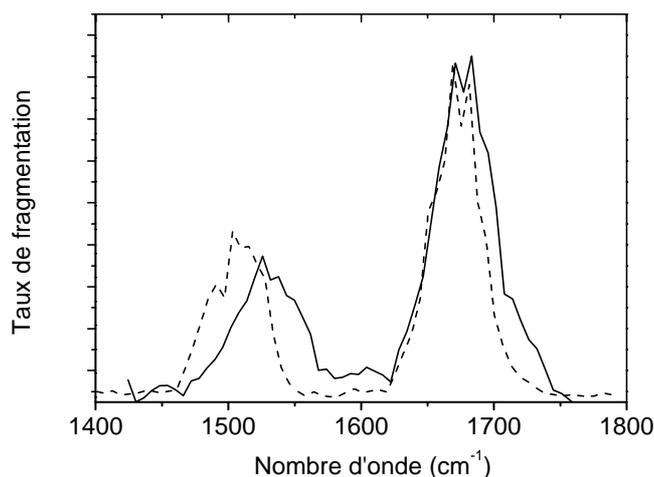


Figure 14 : comparaison des spectres IRMPD des brins $[A\beta_{1-28} + 2H^+]$ (trait plein) et $[A\beta_{1-28} + 4H^+]$ (pointillés) dissous dans une solution de TFE/MeOH.

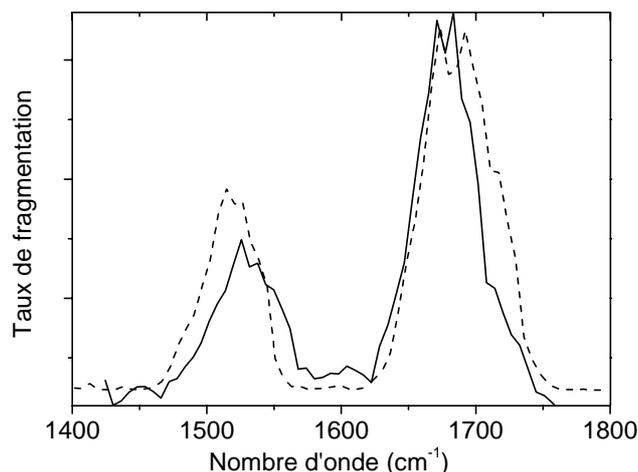


Figure 15 : comparaison des spectres IRMPD des brins $A\beta_{1-28}$ (trait plein) et $A\beta_{12-28}$ (tirets) dans le même état de charge (2+) et le même solvant (TFE/méthanol).

VI.4 Un environnement polaire favorise les structures globulaires

4.1 Résultats issus de la mobilité ionique

La séquence d'acides aminés du brin 1-28 de la protéine amyloïde β ($A\beta_{1-28}$) est, en utilisant la notation par lettres : DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK. La structure en solution aqueuse révélée par la RMN (code PDB 1amb) est une hélice α . Cependant, la majorité des publications récentes sur le sujet s'accordent à dire que cette structure secondaire

n'apparaît qu'à très bas pH, et qu'à des valeurs plus proches de celles de nos solutions, cette séquence n'a pas d'ordre particulier²¹. En phase gazeuse, Li *et al.* ont analysé la fragmentation après collision de ce brin par spectrométrie de masse, et ont proposé la séquence 17-23 comme noyau hydrophobe de la protéine¹⁰. Par contre, aucune étude de spectroscopie IR ni de spectrométrie de mobilité ionique n'a à ce jour et à notre connaissance été menée.

Les spectres de mobilité ionique du brin A β_{1-28} , dissout dans de l'eau distillée et passé en électrospray sans ajout d'acide, sont donnés dans la Figure 16 pour les états de protonation [A β_{1-28} + 3H⁺], [A β_{1-28} + 4H⁺] et [A β_{1-28} + 5H⁺]. Ils représentent l'intensité du signal d'ions en fonction de leur section efficace. Pour le cation cinq fois protoné, on observe un seul pic de largeur à mi-hauteur 25 Å². La largeur théorique pour une seule conformation étant deux fois inférieure (*cf.* Figure 17), on peut en conclure qu'une seule famille de conformations très proches existe. Dans la Figure 18, je donne deux structures dépliées du brin [A β_{1-28} + 5H⁺] dont les sections efficaces sont séparées de 25 Å². Cela illustre clairement la diversité conformationnelle à température ambiante au sein d'une seule famille caractérisée par une structure de la chaîne peptidique. Le point crucial est que les principales variations responsables de la différence de section efficace résident dans les chaînes latérales. Lorsque l'état de protonation diminue jusqu'à 3H⁺, on observe trois choses : d'abord, on a toujours un seul pic principal, ensuite, sa largeur passe de 25 à 35 Å², mais la section efficace moyenne diminue régulièrement, de 650 Å² pour les ions [A β_{1-28} + 5H⁺] à 575 Å² pour [A β_{1-28} + 4H⁺] puis 525 Å² pour [A β_{1-28} + 3H⁺]. La baisse de la largeur traduit une hétérogénéité conformationnelle encore plus faible pour l'état de charge 4+ que pour le 5+. Le brin [A β_{1-28} + 3H⁺] semble être le moins contraint des trois, ce qui peut s'expliquer par une chute des forces de répulsion coulombiennes lorsque le nombre de protons diminue. Ceci est également cohérent avec la baisse de la section efficace moyenne. Ce comportement est donc très différent du brin 12-28 dilué dans un mélange TFE/Méthanol dont j'ai présenté les résultats précédemment. Afin de pouvoir tirer une information structurale précise des spectres expérimentaux, j'ai donc fait des calculs avec le logiciel Mobcal mis au point par l'équipe de M. Jarrold et détaillé dans le chapitre III de ce manuscrit.

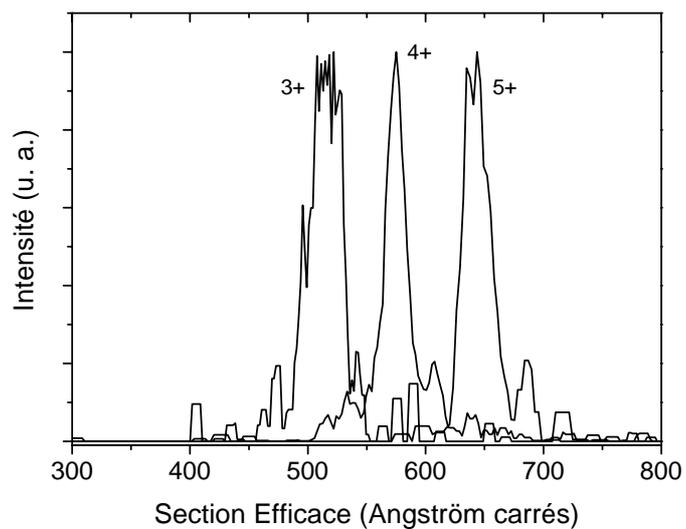


Figure 16 : spectres de mobilité ionique des états de protonation $3H^+$, $4H^+$ et $5H^+$ (de gauche à droite) du brin amyloïde β 1-28 issu d'une solution d'eau.

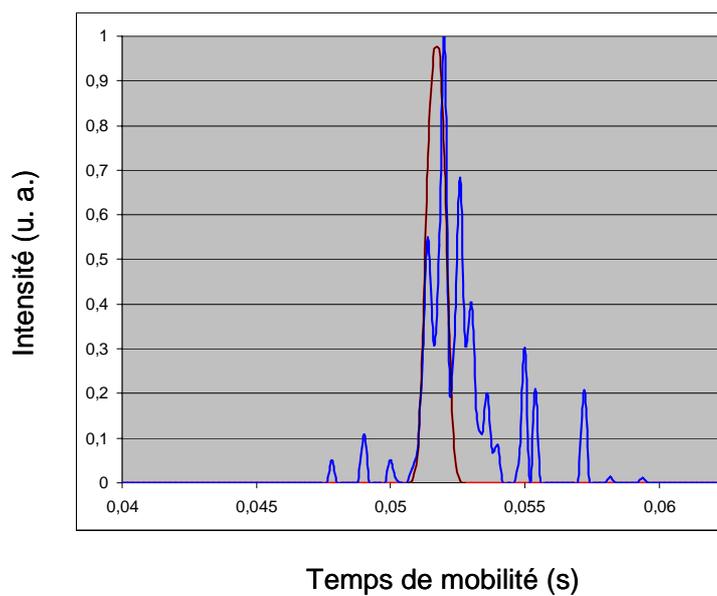


Figure 17 : comparaison des spectres de mobilité expérimental et théorique (dans l'hypothèse où un seul conformère est peuplé) de l'ion $[A\beta_{1-28} + 5H^+]$.

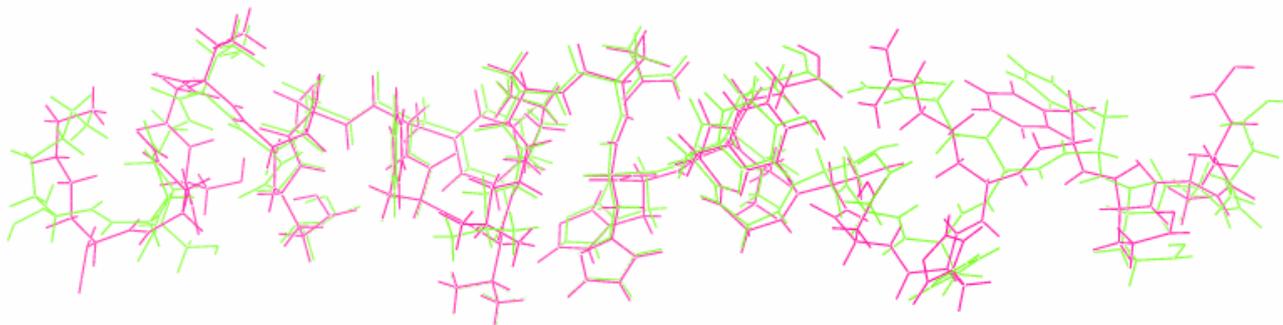


Figure 18 : superposition de deux conformères de $[A\beta_{1-28} + 4H^+]$ dont la différence de section efficace est de 20 \AA^2 , les valeurs absolues se situant autour de 650 \AA^2 .

Les premiers conformères à tester sont, d'une part, celui tiré de la PDB (code 1amb) en hélice α et, d'autre part, un conformère totalement déplié (en feuillet β , construit avec le logiciel Hyperchem). Le brin $A\beta_{1-28}$ possède cinq acides aminés basiques (deux lysines, une arginine et deux histidines) et le N-terminal n'est pas protégé, on a donc en tout six sites de protonation privilégiés. L'ordre des basicités croissantes en phase aqueuse (histidine ($pK_a = 6$), N-terminal ($pK_a = 9-10$), lysine ($pK_a = 10,5$), et arginine ($pK_a = 12,5$)) prédit que c'est la chaîne latérale de l'arginine qui se protonne en priorité (voir Tableau 2). Si on fait l'hypothèse que les groupements carboxylates ne survivent pas en phase gazeuse en mode positif (sans cation métallique ou pont salin pour stabiliser la structure), on obtient un état de charge $1+$. La chaîne latérale de la lysine possède le pK_a le plus élevé après l'arginine, j'ai donc protoné les deux pour obtenir le système $[A\beta_{1-28} + 3H^+]$. Sa section efficace calculée pour une conformation en hélice α est de 700 \AA^2 , alors que celle du conformère en feuillet β est de 951 \AA^2 . Cette dernière valeur est bien supérieure à celles mesurées et ce conformère n'est donc pas peuplé. On pourrait avancer que le pic expérimental de l'ion $[A\beta_{1-28} + 5H^+]$ est proche de la section efficace de l'hélice α et qu'une conformation similaire peut donc être présente. Toutefois, le fait que la section efficace augmente avec la charge ne penche pas pour cette hypothèse, car une hélice serait plutôt favorisée par un bas état de charge, l'ajout de protons la déstabilisant²⁰.

J'ai effectué une recherche de conformations avec le logiciel MacroModel (Schrödinger) en employant la variation systématique des angles de torsion avec le champ de force MMFF pour chacun des états de protonation du brin 1-28. Pour le système $[A\beta_{1-28} + 3H^+]$, 40000 structures ont été générées, et 1327 conformères uniques ont été trouvés entre 0 et 84 kJ.mol^{-1} . La moyenne des sections efficaces de collision des 15 structures de plus basse

énergie potentielle (conformères plutôt dépliés) est de 654 \AA^2 . C'est une valeur beaucoup trop grande par rapport à l'expérience. Une recherche de conformations identique a été menée pour l'état de charge 4+, le quatrième proton ayant été ajouté sur le N terminal parce que son pKa en phase liquide est plus élevé que celui de l'histidine. La moyenne des 15 conformères de plus basses énergies est cette fois de 709 \AA^2 . Ceux-ci sont plus dépliés que pour l'état de charge 3+, et l'élévation de la section efficace est cohérente avec les données de mobilité ionique mais la valeur absolue est fautive. Une simulation de dynamique moléculaire par échange de réplique a été faite pour l'état de charge 4+. Les conformères de plus basse énergie sont alors un peu plus repliés (voir Figure 18) mais leur section efficace moyenne calculée comme précédemment est de 645 \AA^2 , une valeur toujours trop élevée par rapport à nos données. Par contre, cela pourrait correspondre à la famille de structures peuplées dans le cas de l'état de charge 5+, puisque le pic de mobilité se situe à 644 \AA^2 .

Tableau 2 : pKa des chaînes latérales des acides aminés acides (A) et basiques (B) isolés composant le brin $A\beta_{1-28}$ ainsi que des groupes amine et carboxyle des N et C terminaux.

N terminal	D	A	E	F	R	H	D	S	G	Y	E	V	H	H
9,9 (B)	3,9 (A)		4,1 (A)		12,5 (B)	6,0 (B)	3,9 (A)				4,1 (A)		6,0 (B)	6,0 (B)
Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	C terminal
	10,5 (B)						4,1 (A)	3,9 (A)					10,5 (B)	2,2 (A)

La recherche de conformations ainsi que la dynamique moléculaire par échange de réplique n'ayant donné que des conformations trop étendues par rapport à nos résultats expérimentaux pour l'état de charge 3+, j'ai utilisé une astuce pour obtenir des structures plus repliées. Le brin $A\beta_{1-28}$ possède 7 sites acides et 6 basiques. Partant d'une structure où tous les sites acides sont déprotonés et les sites basiques neutres, le brin ayant alors une charge globale de -6, j'ai protoné les sites par ordre de pKa jusqu'à arriver à une charge nette de +3. Ainsi, seuls les acides aspartiques et le groupement carboxylate du C terminal sont déprotonés, et tous les sites basiques sont protonés. Les interactions électrostatiques doivent contraindre fortement le système à se replier en l'absence de solvant. Le même type de recherche de conformations que précédemment a été mené, mais seulement 38 conformères entre 0 et 84

$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ont été trouvés. Ceux-ci sont globulaires et tendent à minimiser les distances entre groupements protonés et déprotonés, comme le montre la Figure 19 sur laquelle la conformation de plus basse énergie est montrée. Pour calculer la section efficace de ce système, il faut revenir à l'état de protonation ayant un sens physique du point de vue de la phase gazeuse, c'est-à-dire celui du paragraphe précédent, où les sites acides sont tous neutres et seuls les sites les plus basiques sont chargés. Après une optimisation de géométrie avec le champ de force MMFF, pour minimiser l'énergie potentielle du conformère obtenu, j'ai constaté que seuls des changements mineurs de conformation se sont produits et le calcul de section efficace sur la structure obtenue donne 550 \AA^2 . Cette valeur est bien inférieure à celle de l'hélice α et de l'ordre de celle tirée de la mesure de mobilité. Le Tableau 3 résume les différentes sections efficaces calculées et expérimentales.

On peut donc en conclure que la famille de conformations du peptide $[\text{A}\beta_{1-28} + 3\text{H}^+]$, peuplée à 300 K dans notre expérience, est globulaire avec une structure compacte et que l'ajout de deux protons induit un changement de conformation tendant à déplier le brin et à peupler une famille de conformation proche de celle montrée sur la Figure 18. D'après les spectres expérimentaux, le cas du système $[\text{A}\beta_{1-28} + 4\text{H}^+]$ est intermédiaire entre cette famille dépliée et la structure globulaire compacte, mais les recherches de conformations ne permettent pas de retrouver ce résultat.

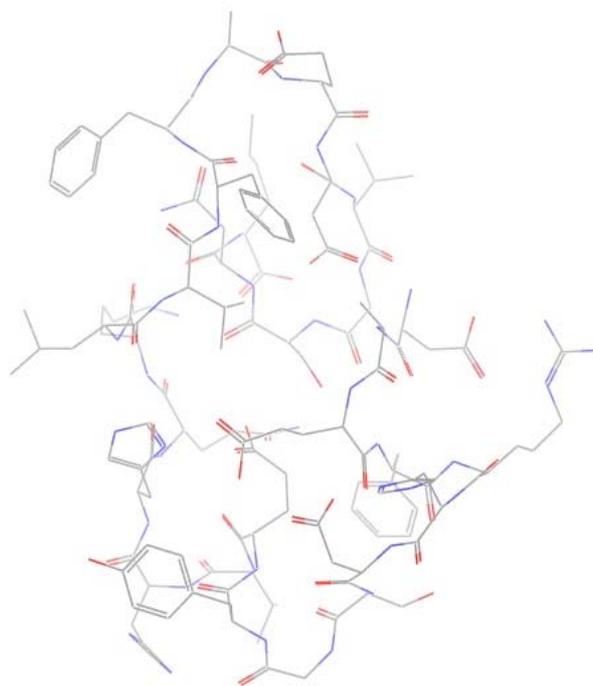


Figure 19 : structure de plus basse énergie issue de la recherche de conformation sur le brin $\text{A}\beta_{1-28}$ zwitterionique. Les hydrogènes ne sont pas représentés pour des raisons de clarté.

Tableau 3 : sections efficaces expérimentales des ions $[A\beta_{1-28} + 3H^+]$, $[A\beta_{1-28} + 4H^+]$ et $[A\beta_{1-28} + 5H^+]$, ainsi que des structures modèles globulaire, hélice α ainsi que feuillet β .

Type de structure	$[A\beta_{1-28} + 3H^+]$	Globulaire	$[A\beta_{1-28} + 4H^+]$	$[A\beta_{1-28} + 5H^+]$	Hélice α	Feuillet β
Section efficace (Å^2)	525	550	575	650	700	951

4.2 Résultats issus de la spectroscopie IRMPD

a) Influence de l'état de charge

Afin d'obtenir des informations complémentaires aux résultats issus des expériences de mobilité ionique, nous avons mesuré les spectres IRMPD des mêmes états de charge du brin $A\beta_{1-28}$. Les résultats sont donnés sur la Figure 20. La partie basses fréquences des spectres ne présente pas de raies bien distinctes et c'est pourquoi je n'en parlerai pas. Les changements les plus importants se situent dans la bande amide I : son intensité par rapport à celle de la bande amide II décroît avec le nombre de protons, et sa largeur à mi-hauteur augmente également. Comme c'est la partie basses fréquences qui baisse en intensité, on peut en déduire que le nombre de groupements C=O fortement liés a diminué. La bande amide II est légèrement décalée vers les basses fréquences dans le brin 5 fois protoné, ce qui implique qu'une partie des groupements NH liés dans les états de charge moindres sont libres. Ces changements sont donc cohérents avec un dépliement, sans doute partiel, dû à la répulsion coulombienne entre charges positives, ce qui rejoint les conclusions du paragraphe précédent. La comparaison entre les spectres IRMPD du même état de protonation ($4H^+$) dans les solutions $H_2O/MeOH$ et $TFE/MeOH$ est également donnée sur la Figure 20 : celle-ci est frappante quand à la différence de largeur de la bande amide I, au moins deux fois supérieure dans le cas de la solution contenant de l'eau. L'élargissement peut être dû à une hétérogénéité conformationnelle plus élevée, et/ou un changement de structure par rapport au cas du mélange TFE/méthanol. Comme la largeur des pics de mobilité ionique est comparable dans les cas des brins 1-28 et 12-28, la seconde hypothèse est la plus probable, ce qui est cohérent avec les conclusions issues des simulations de sections efficaces. Pour cette même solution, les intensités relatives des bandes amide I et II sont devenues comparables, or ce critère est celui que j'ai avancé pour distinguer les signatures spectroscopiques des structures hélice α et globulaires. Cela semble donc confirmé par ces analyses.

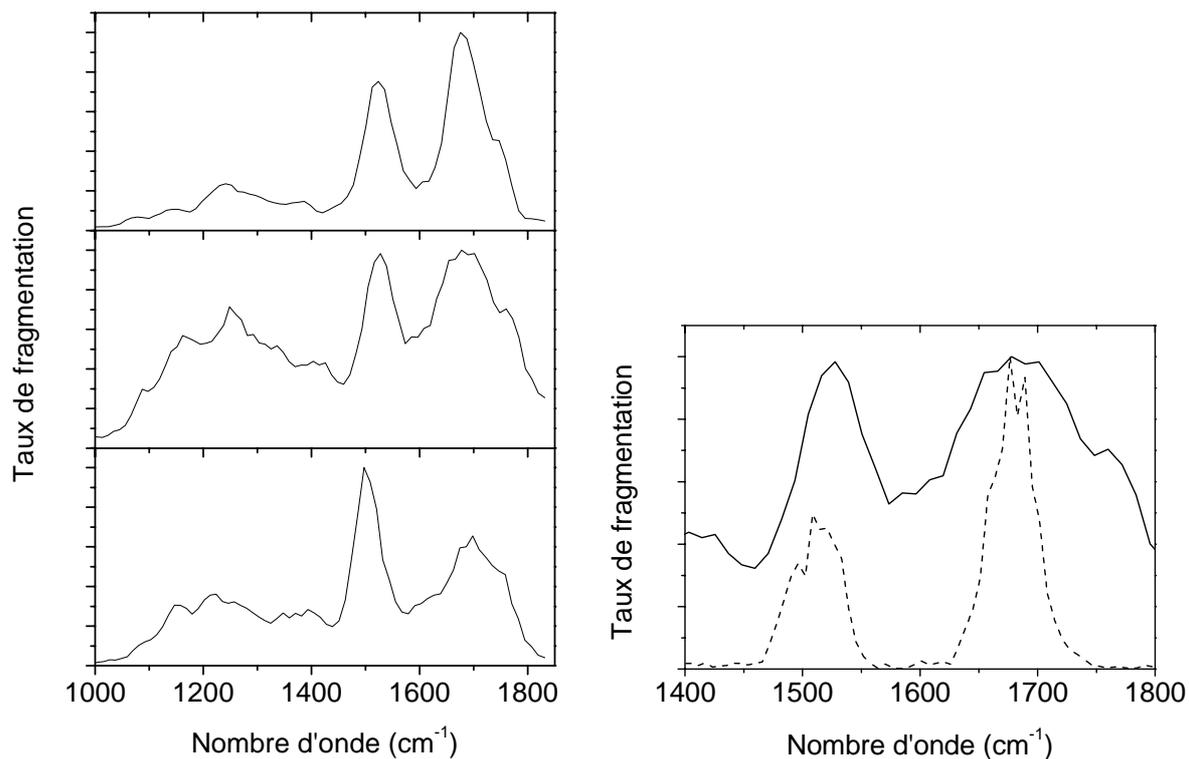


Figure 20 : à gauche : spectres IRMPD des états de protonation $3H^+$, $4H^+$ et $5H^+$ (de haut en bas) du brin $A\beta_{1-28}$; à droite : superposition des spectres IRMPD des brins $[A\beta_{1-28} + 4H^+]$ issus d'une solution de TFE/MeOH (tirets) et d'un mélange $H_2O/MeOH$ (trait plein).

VI.5 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence l'influence du solvant, dans lequel sont dissous les brins d'amyloïde β , sur les caractéristiques structurales de ces ions après mise en phase gazeuse par électrospray. Les expériences de spectrométrie de mobilité ionique et de spectroscopie IRMPD couplées à des simulations nous ont appris qu'un mélange de TFE et de méthanol favorise les familles de conformères ayant une structure secondaire en hélice α pour les brins 12-28 et 1-28, alors que dilué dans un mélange eau/méthanol, ce dernier adopte une conformation globulaire compacte lorsque le nombre de protons est faible ($3H^+$) et se déplie après addition d'un ou deux protons. Ces résultats suivent la tendance observée dans les solvants en question.

- (1) Wu, R.; McMahon, T. B. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 8767.
- (2) Murphy, R. M. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2007**, *1768*, 1923.
- (3) Stephenson, V. C.; Heyding, R. A.; Weaver, D. F. *FEBS Letters* **2005**, *579*, 1338.
- (4) Bernstein, S. L.; Wyttenbach, T.; Baumketner, A.; Shea, J. E.; Bitan, G.; Teplow, D. B.; Bowers, M. T. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2075.
- (5) Murray, M. M.; Krone, M. G.; Bernstein, S. L.; Baumketner, A.; Condrón, M. M.; Lazo, N. D.; Teplow, D. B.; Wyttenbach, T.; Shea, J.-E.; Bowers, M. T. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 6041.
- (6) Krone, M. G.; Baumketner, A.; Bernstein, S. L.; Wyttenbach, T.; Lazo, N. D.; Teplow, D. B.; Bowers, M. T.; Shea, J.-E. *Journal of Molecular Biology* **2008**, *381*, 221.
- (7) Murray, M. M.; Bernstein, S. L.; Nyugen, V.; Condrón, M. M.; Teplow, D. B.; Bowers, M. T. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 6316.
- (8) Bernstein, S. L.; Dupuis, N. F.; Lazo, N. D.; Wyttenbach, T.; Condrón, M. M.; Bitan, G.; Teplow, D. B.; Shea, J.-E.; Ruotolo, B. T.; Robinson, C. V.; Bowers, M. T. *Nature Chemistry* **2009**, *1*, 326.
- (9) Li, X. J.; Cournoyer, J. J.; Lin, C.; O'Connor, P. B. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19*, 1514.
- (10) Li, A. Q.; Fenselau, C. *European Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *10*, 309.
- (11) Verdier, Y.; Huszar, E.; Penke, B.; Penke, Z.; Woffendin, G.; Scigelova, M.; Fulop, L.; Szucs, M.; Medzihradzky, K.; Janaky, T. *Journal of Neurochemistry* **2005**, *94*, 617.
- (12) Vaden, T. D.; Gowers, S. A. N.; de Boer, T. S. J. A.; Steill, J. D.; Oomens, J.; Snoek, L. C. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 14640.
- (13) Perez, M.; Santa-María, I.; Tortosa, E.; Cuadros, R.; Valle, M. d.; Hernández, F.; Moreno, F. J.; Avila, J. *Journal of Neurochemistry* **2007**, *103*, 1447.
- (14) Stearns, J. A.; Seaiby, C.; Boyarkin, O. V.; Rizzo, T. R. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11*, 125.
- (15) Stearns, J. A.; Boyarkin, O. V.; Rizzo, T. R. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 13820.
- (16) Guidi, M.; Lorenz, U. J.; Papadopoulos, G.; Boyarkin, O. V.; Rizzo, T. R. *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 797.
- (17) Jarvet, J.; Damberg, P.; Danielsson, J.; Johansson, I.; Eriksson, L. E. G.; Gräslund, A. *FEBS Letters* **2003**, *555*, 371.
- (18) Vila, J. A.; Ripoll, D. R.; Scheraga, H. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 13075.
- (19) Hong, D.-P.; Hoshino, M.; Kuboi, R.; Goto, Y. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 8427.
- (20) Kohtani, M.; Jones, T. C.; Schneider, J. E.; Jarrold, M. F. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 7420.
- (21) Dong, X.; Chen, W.; Mousseau, N.; Derreumaux, P. *The Journal of Chemical Physics* **2008**, *128*, 125108.

Chapitre VII: Mise en phase gazeuse de systèmes d'intérêt biologique et pharmaceutique

VII.1 Introduction

Les premières études de systèmes physiques isolés et guidés par des champs électriques (en l'occurrence des électrons) remontent au début du siècle précédent, avec les travaux de J. J. Thomson sur les rayons cathodiques qui nécessitaient l'utilisation de tubes à vide. Dans la première moitié du 20^e siècle, la spectrométrie de masse a été développée dans le but de mesurer précisément la masse et l'abondance des isotopes naturels ¹. Pendant la seconde guerre mondiale, les américains utilisaient abondamment cette technique pour enrichir l'uranium et mettre au point la première bombe atomique. Par la suite, les applications se sont énormément diversifiées, pour toucher des domaines à première vue très éloignés du champ de la spectrométrie, comme la biologie ou la médecine. La première condition pour étudier des objets physiques en phase gazeuse est de les isoler de leur milieu s'ils sont présents en phase condensée dans les conditions standard de température et de pression ($T = 300 \text{ K}$, $P = 1 \text{ atm}$). Au début, ce sont les jets atomiques qui ont été développés en utilisant la plus simple des techniques, l'ionisation thermique ². Un ou plusieurs filaments recouverts des atomes sous forme de poudre sont chauffés par effet Joule, et cet apport d'énergie permet d'évaporer et d'ioniser les atomes. Le jet produit est stable, durable et intense. Malheureusement, cette technique convient aux atomes à faible potentiel d'ionisation (IP) uniquement. Pour les autres, des méthodes avec arcs électriques ³ ou plasmas couplés par induction ⁴ furent inventées. Par la suite, on voulut se pencher sur les propriétés des molécules isolées, et pour cela de nouvelles techniques virent le jour.

VII.2 Les principales méthodes de mise en phase gazeuse de systèmes moléculaires

2.1 Le four

Tout d'abord, quand on se place dans les conditions standards de température et de pression, un échantillon liquide ou solide présente toujours une pression de vapeur, c'est-à-dire qu'il existe un équilibre à la surface de l'échantillon entre les atomes ou molécules qui sont désorbées par agitation thermique et celles qui sont adsorbées. Cet équilibre est gouverné par les lois de la thermodynamique, et la valeur de la pression de vapeur dépend uniquement de ΔH_{vap} l'enthalpie molaire de vaporisation de l'échantillon et de sa température.

L'équation de Clausius-Clapeyron donne le rapport des pressions $\frac{P_2}{P_1}$ pour une augmentation de température ΔT (ΔH_{vap} est supposée constante dans l'intervalle ΔT considéré):

$$\ln\left(\frac{P_2}{P_1}\right) = -\frac{\Delta H_{vap}}{R\Delta T}$$

Cette tension de vapeur augmente donc exponentiellement avec la température, la première solution qui vient alors à l'esprit lorsqu'on veut mettre des espèces moléculaires sous forme de gaz est de chauffer un récipient contenant cette espèce, de manière similaire au cas des atomes. Cette technique est parfaitement adaptée aux espèces qui sont thermiquement stables, donc qui ont une énergie de dissociation plus élevée que celle qui leur est nécessaire pour être désorbée de l'échantillon. En pratique, la technique s'applique très bien aux molécules de petite taille, c'est-à-dire moins de 20 atomes environ. C'est de cette façon que les molécules de 2-pyridone dont nous avons étudié la photoionisation (*cf.* Annexe 3) ont été mises en phase gazeuse. Par contre, cette technique ne s'applique pas à la plupart des biomolécules, qui contiennent un grand nombre d'atomes et qui sont thermiquement fragiles. D'autres méthodes ont donc dû être mises au point afin de les étudier en phase gazeuse.

2.2 L'impact électronique

Cette méthode fut au départ développée pour l'ionisation de molécules ayant *déjà* été mises en phase gazeuse auparavant⁵. Elle consiste à envoyer un faisceau d'électrons sur cette vapeur afin d'arracher un ou plusieurs électrons aux molécules et ainsi créer des cations. Si l'affinité électronique des molécules est assez élevée, des anions peuvent aussi être formés. La section efficace d'ionisation dépend fortement de l'énergie cinétique des électrons : un maximum est atteint aux environs de 70 eV. La mise en phase gazeuse préalable par chauffage n'étant pas adaptée aux molécules fragiles, la méthode par exposition directe au faisceau d'électrons fut imaginée. L'échantillon solide est placé sur un filament chauffé recouvert de polyimide, une substance inerte, et les électrons frappent ce filament, apportant l'énergie requise pour désorber *et* ioniser la molécule sans la casser. L'intensité des jets de biomolécules ainsi créés n'était cependant pas suffisante.

2.3 L'ionisation chimique à pression atmosphérique

Développée à la suite de l'impact électronique, l'ionisation chimique a pour but de limiter la fragmentation induite et ainsi augmenter l'intensité des faisceaux d'ions⁶. On y

parvient en introduisant dans la cellule un gaz (par exemple du méthane) à une pression de l'ordre du mbar qui est ionisé par un faisceau d'électrons et qui réagit avec le gaz de molécules. Cette réaction peut être un transfert de proton ou de charge, les deux options conduisant à la formation d'ions, dans le premier cas sans électron célibataire, dans le second on aura une espèce radicalaire beaucoup moins stable. Le taux de fragmentation est considérablement réduit du fait que ce n'est pas directement le faisceau d'électrons qui ionise la molécule et que le refroidissement collisionnel dans le gaz à 1 mbar abaisse l'énergie interne des ions. Cependant, cette méthode est sensible aux impuretés et la source de molécules gazeuses est encore thermique. Dans sa version interfacée avec une colonne de chromatographie en phase liquide (LC), c'est en quelque sorte l'ancêtre des sources électrospray dont je détaillerai le fonctionnement plus loin. Cette approche fut développée par l'équipe de Horning⁷, et la Figure 1 qui schématise une source APCI couplée à une colonne LC est extraite de la référence⁸. Ici c'est le solvant qui sert de gaz réactif. Celui-ci est nébulisé en présence du produit à analyser, et on induit des réactions ion-molécule par une décharge électrique.

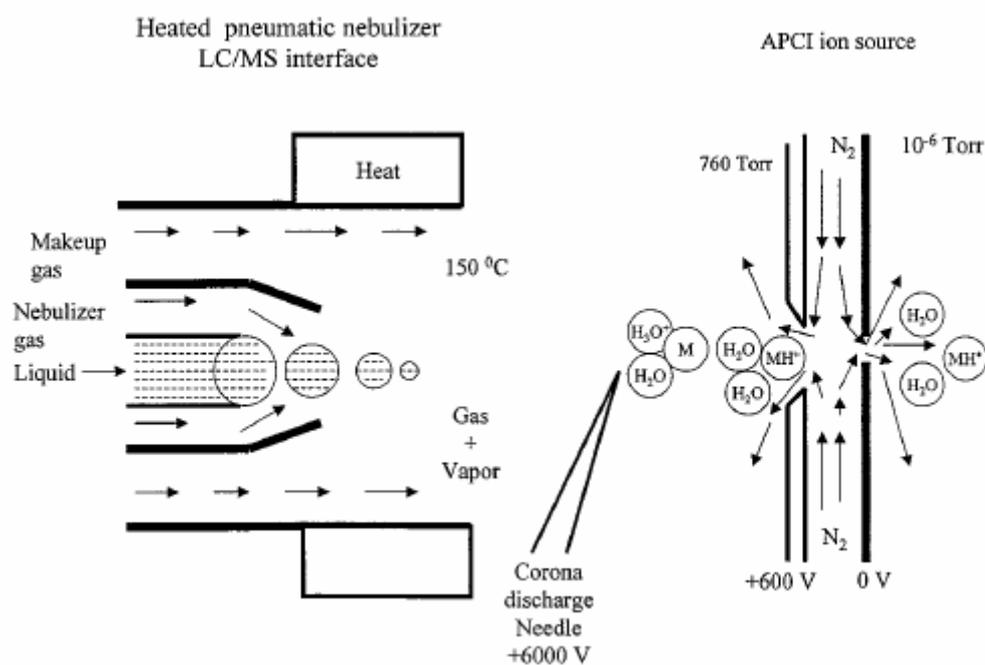


Figure 1: schéma de la source d'ions moléculaires APCI couplée à une colonne de LC. Figure tirée de la référence⁸.

2.4 La désorption par plasma

Un autre moyen général de mettre des espèces en phase gazeuse, cette fois sans chauffer directement l'échantillon, est d'apporter de l'énergie d'une autre manière à ces espèces qui se trouvent en phase condensée. Cette énergie peut être cinétique et provenir de particules issues de la désintégration d'atomes radioactifs. Dans ce cas, on parle de source à désorption par plasma. Les particules sont par exemple des fragments de fission du ^{252}Cf d'énergie de l'ordre de 100 MeV⁹. Cette source a été développée avant l'électrospray et le MALDI, c'était donc la première technique permettant aux molécules d'intérêt biologique, notamment l'arginine, réputée impossible à vaporiser en la gardant intacte, d'être mises en phase gazeuse. Des ions de masse supérieure à 10000 g.mol⁻¹ pouvaient être observés. Malheureusement, les spectres étaient de mauvaise qualité car les ions métastables pouvaient se fragmenter avant d'arriver au détecteur.

2.5 La désorption par impact d'ions

Plus communément appelée SIMS (Secondary Ion Mass-Spectrometry), cette technique était utilisée à la base pour analyser des surfaces. Le principe est de bombarder celles-ci par un faisceau d'ions d'énergie de l'ordre du kiloélectron-Volt, des ions secondaires sont alors éjectés de la surface. Cette méthode est très sensible mais la probabilité d'observer des ions secondaires intacts est faible, même si on peut y remédier partiellement en baissant la densité d'ions incidents (mode « statique »). Les spectres obtenus ressemblent beaucoup à ceux issus de la désorption par plasma. Le SIMS a été appliqué à l'étude de nombreuses biomolécules, comme, entre autres, des acides aminés, des peptides, des protéines et des brins d'ADN¹⁰. Une amélioration astucieuse du SIMS est la désorption par impact d'atomes neutres sur la surface d'un liquide contenant la molécule. Comme le processus se déroule sous vide, le liquide utilisé doit posséder une tension de vapeur saturante faible: le glycérol est souvent choisi. Un jet d'atomes neutres (par exemple d'argon) d'énergie cinétique de l'ordre de 5 keV est envoyé sur la surface et désorbe la molécule protonée. Comme la surface se renouvelle de manière continue, le faisceau d'ions produit est stable. Le glycérol est par contre fragmenté de manière importante, et produit un bruit de fond gênant sur les spectres et de nombreux complexes avec le glycérol sont formés. Cette technique, connue sous le nom de FAB (Fast Atoms Bombardment), a été appliquée avec succès à une large gamme de systèmes¹¹. Un inconvénient majeur du FAB réside dans le nécessaire remplacement de l'échantillon à l'intérieur de la chambre à vide. Celui-ci peut être supprimé en introduisant un jet de liquide

continu, ce qui permet en outre d'utiliser des solvants plus volatils que le glycérol. Je reparlerai de cette technique de jet liquide plus loin dans ce chapitre.

2.6 L'électrospray

L'idée de base de l'électrospray est relativement ancienne, on peut en effet le remarquer dans les travaux de Loeb sur l'électrification statique. Parmi ces travaux, ceux de Chapman représentent sûrement les prémisses de l'électrospray. En effet, il mesura des temps de mobilité qu'il attribua avec raison à des ions moléculaires en phase gazeuse¹². J. Fenn a reçu le prix Nobel de chimie en 2002 pour avoir développé cette technique pour la mise en phase gazeuse de gros systèmes moléculaires, comme les protéines. Cela a grandement contribué à l'essor de la spectrométrie de masse comme outil de routine en biologie, pour trouver des séquences de protéines. Dans certains cas, on peut déduire la structure secondaire et tertiaire de la séquence d'acides aminés qui composent une protéine grâce à des programmes informatiques, et ainsi mieux comprendre ses mécanismes fonctionnels dans un organisme vivant. Les premiers spectres que présentèrent J. Fenn et ses collègues en 1988 à une conférence de la société américaine de spectrométrie de masse étaient spectaculaires pour l'époque : on y voyait les pics d'ions multichargés (jusqu'à 45+) de masse 40000 g.mol⁻¹ (cf. Figure 2)¹³.

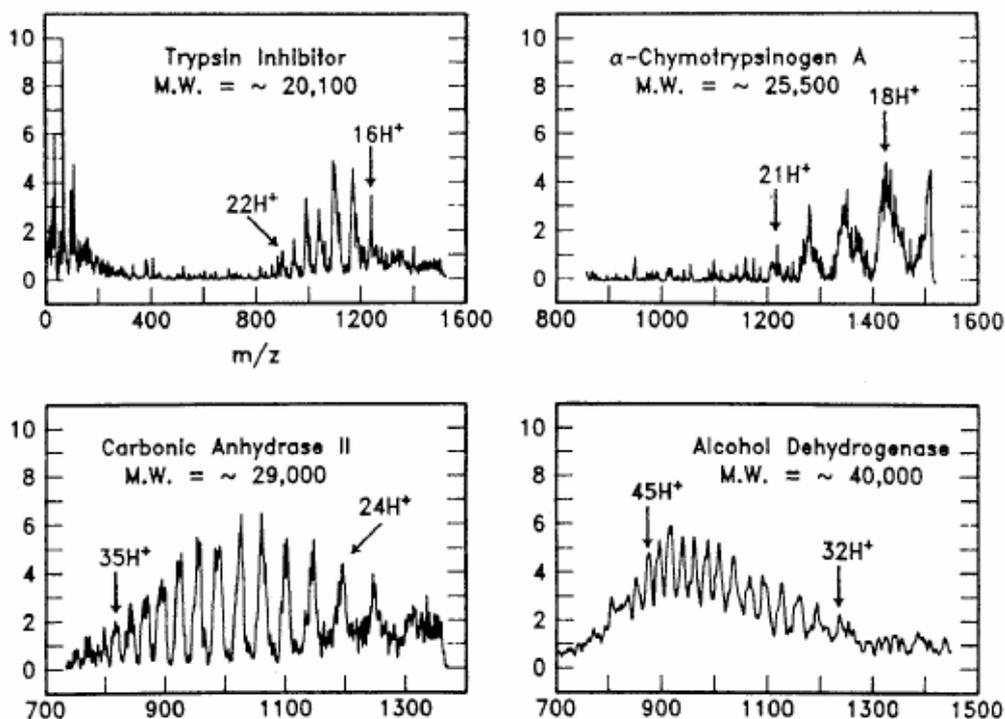


Figure 2: spectres de protéines intactes produites par électrospray. Figure tirée de la référence¹³.

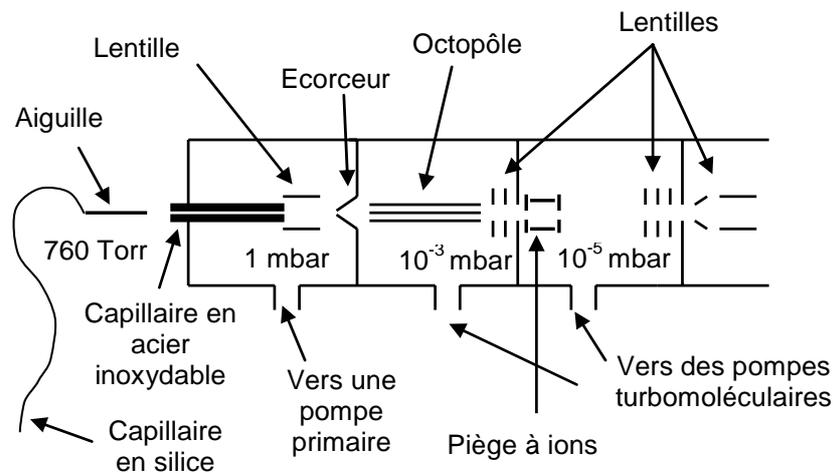


Figure 3 : schéma de la source électrospray utilisée par l'équipe de S. Nielsen à Aarhus.

Le schéma d'une source électrospray typique est donné dans la Figure 3. La molécule à étudier se trouve dans une solution, diluée avec un solvant pur, comme l'eau, ou plus souvent avec un mélange de différents solvants, par exemple eau/méthanol (50/50 en volume). On peut ajouter quelques pour cents d'acide acétique si l'on veut obtenir des cations, ou d'acétate d'ammonium pour déprotomer la molécule à étudier, et donc obtenir des anions. Cette solution est envoyée à un débit de l'ordre de $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ par un tuyau dans une aiguille métallique très fine placée devant l'entrée d'un capillaire de quelques dizaines de microns de diamètre. Ce capillaire est chauffé à environ $100\text{-}150 \text{ }^\circ\text{C}$ et peut être en silice, et dans ce cas l'extrémité est métallisée, ou entièrement en métal (acier inoxydable). On applique entre ce capillaire et l'aiguille métallique une différence de potentiel (DDP) de l'ordre de quelques milliers de Volts pour créer un champ électrique puissant dans cette zone à pression atmosphérique. Sous l'effet de ce champ, le liquide à la sortie de l'aiguille adopte la forme d'un cône appelé « cône de Taylor », et des micro-gouttelettes ayant une grande densité surfacique de charges se détachent de ce cône et suivent le champ jusqu'au capillaire, qui constitue l'entrée de la chambre à vide. Une réaction d'oxydo-réduction se produit à la surface de celui-ci en vertu de la conservation de la charge, comme on peut le voir sur la Figure 4. Un flux de gaz séchant chauffé est souvent envoyé à contre-courant des gouttelettes chargées, par exemple de l'azote, à un débit d'environ $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les ions partiellement ou complètement désolvatés, selon les réglages de la source, sortent de l'autre côté du capillaire en phase gazeuse et doivent être guidés par un système de lentilles électrostatiques.

La façon dont la taille des gouttes se réduit est la suivante : les gouttelettes sont principalement chargées en surface, et comme elles s'évaporent, les charges se rapprochent spatialement donc l'énergie de répulsion coulombienne augmente avec le temps. Lorsque la limite dite de Rayleigh est atteinte, la goutte émet des jets de microgouttelettes très chargées. La limite de Rayleigh correspond à l'égalité entre les forces de tension de surface du liquide constituant la goutte et celles créées par la répulsion coulombienne; la goutte diminue alors la répulsion coulombienne en émettant des charges. Le phénomène se répète ainsi jusqu'à un certain point, mais le mécanisme de formation de l'ion complètement désolvaté est encore sujet à controverse. Certains sont convaincus que le processus précédent se répète jusqu'à ce qu'une goutte contienne un seul ion, et que les dernières molécules de solvant s'évaporent ensuite ¹⁴. Un autre mécanisme couramment cité est celui de l'évaporation des ions directement à partir de la surface de la goutte ¹⁵. Le champ électrique à la surface de la goutte deviendrait alors assez élevé pour que l'évaporation d'un ion puisse avoir une probabilité non-négligeable.

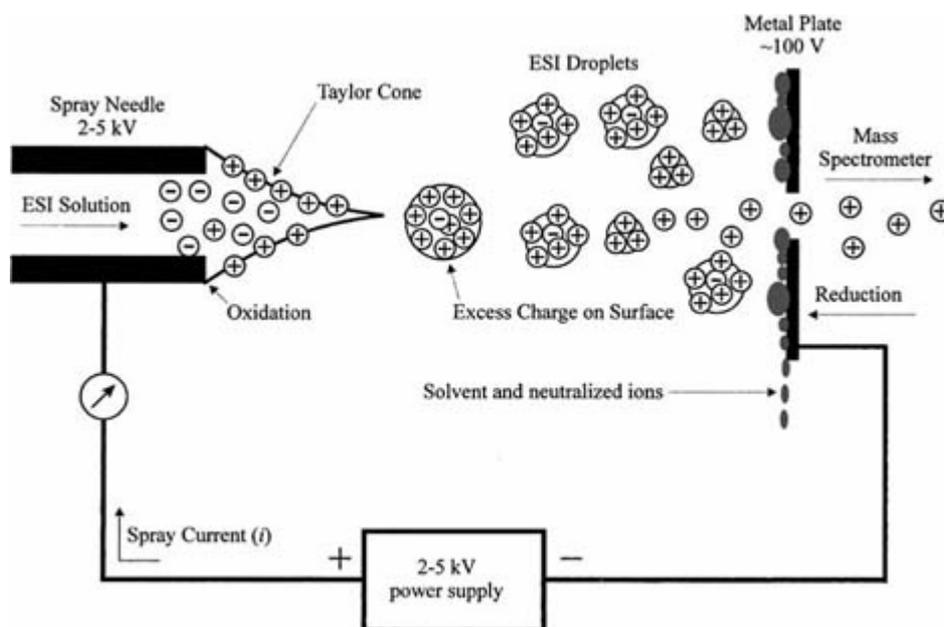


Figure 4 : agrandissement de l'espace entre l'aiguille (à gauche) et le capillaire (à droite), où sont représentés le cône de Taylor et les gouttelettes chargées dont la taille se réduit.

Avec une source électrospray, les espèces sont ionisées par protonation ou déprotonation, jamais par arrachement ou attachement d'électrons. Les espèces formées sont donc dans un état électronique singulet, et sont généralement plus stables que les anions ou

cations radicalaires. Les avantages de l'électrospray sont: la facilité d'utilisation (beaucoup d'appareils de routine en biologie en sont équipés) et notamment d'inversion de polarité qui permet d'étudier des cations et des anions, la très faible consommation de produit (la sensibilité est de l'ordre de la nanomole), et surtout la « douceur » du processus d'ionisation, qui offre la possibilité d'observer des virus entiers jusqu'à des masses de quelques GDa¹⁶. De nombreuses variantes de l'électrospray ont été développées. Parmi les plus utilisées, on peut citer le nanospray, où le diamètre de sortie de l'aiguille, la DDP entre celle-ci et l'entrée du capillaire ainsi que le débit de liquide sont réduits. Ce dernier devient de l'ordre de 1 nL.min⁻¹, et la DDP est de 1000 V. Certaines sources n'utilisent pas de gaz chauffant, la désolvatation s'opère donc en grande partie dans le capillaire chauffé, qui est plutôt en métal, meilleur conducteur de chaleur que la silice. Ces sources permettent d'obtenir des ions microsolvatés, c'est-à-dire avec une ou plusieurs (une vingtaine au maximum) molécules de solvant liées de façon non-covalente à l'ion ou entre elles¹⁷. Si l'on veut garder des ions entourés d'un grand nombre de molécules de solvant ou des complexes particulièrement fragiles, des sources dotées d'un spray froid existent¹⁸. Une source permettant de contrôler le nombre de molécules de solvant autour d'une biomolécule a été développée par l'équipe de S. Nonose à Kobe (Japon)¹⁹. Elle consiste à désolvater totalement les ions à l'aide d'un gaz sec puis les re-solvater avec un gaz dont la teneur en solvant est contrôlée.

2.7 La technique MALDI

L'acronyme MALDI veut dire « Matrix Assisted Laser Desorption Ionization ». Les premiers travaux d'ionisation de substance organique solide furent menés il y a une quarantaine d'année²⁰, mais elle ne fut réellement reconnue comme méthode efficace de mise en phase gazeuse de grosses molécules thermiquement fragiles que lorsque Karas et Hillenkamp présentèrent en 1988 le spectre de masse de la β -D-galactosidase, une enzyme de masse 116900 g.mol⁻¹²¹. A l'époque, c'était la plus lourde molécule jamais étudiée en spectrométrie de masse. Le développement de cette technique a valu à K. Tanaka d'obtenir le prix Nobel de Chimie en 2002. Son principe est d'envoyer un faisceau laser délivrant des impulsions de l'ordre de la nanoseconde dans l'UV ou l'IR sur un matériau solide, par exemple une fine poudre métallique ou une matrice organique, qui absorbe fortement cette lumière. Les molécules à étudier sont contenues dans ce matériau et n'absorbent pas ou très peu le rayonnement laser, pour minimiser toute fragmentation. Curieusement, il a été démontré que l'utilisation d'un rayonnement à une longueur d'onde de 3 μ m induit moins de fragmentation qu'un laser UV, alors que les vibrations d'élongation N-H et O-H absorbent fortement dans

cette région ²². L'absorption des photons crée une éjection de matière sous la forme d'une plume de désorption, et dans cette plume sont présentes les espèces en phase gazeuse. La puissance surfacique nécessaire est de l'ordre de 10^{10} - 10^{11} W.m⁻², il faut donc focaliser le laser pour obtenir un diamètre de faisceau de l'ordre de 200-300 μ m ²³. L'application d'une DDP entre la plaque où est déposée la matrice et l'entrée du spectromètre de masse crée un champ électrique qui guide les ions formés vers celle-ci. L'utilisation d'un laser UV donne un rendement d'ionisation faible, de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} ²⁴. Le MALDI, de part sont caractère impulsif, est souvent couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (Time Of Flight-Mass Spectrometer TOF-MS) permettant d'atteindre des fréquences de répétition de l'ordre d'1 kHz lorsque le laser l'autorise. Un autre avantage du MALDI est la possibilité de couplage avec une colonne de chromatographie en phase gazeuse, ce qui permet de séparer les composants par taille avant de les analyser. Afin d'augmenter le signal d'ions, une trappe de Paul par exemple peut être placée avant le spectromètre de masse, en particulier pour des mesures spectroscopiques longues. La matrice a plusieurs rôles ; d'abord celui d'absorber l'énergie lumineuse du laser, elle doit pour cela avoir un coefficient d'absorption molaire élevé à la longueur d'onde considérée (de l'ordre de 10^5 L.mol⁻¹.m⁻¹), ensuite celui de séparer spatialement les molécules à analyser et éviter leur agrégation (les concentrations en analyte sont donc de l'ordre de 10^{-4} mol.L⁻¹), et enfin celui de donneur ou d'accepteur de protons si l'on veut étudier des cations ou des anions. Les mécanismes physiques sous-tendant le MALDI ne sont pas encore bien compris, on ne peut donc pas prédire quelle matrice conviendra à un échantillon donné. Généralement, en MALDI-UV, on utilise un laser à N₂ émettant à 337 nm et comme matrice, pour les cations, de l'acide sinapique, de l'acide 2,5-dihydrobenzoïque ou des dérivés, et pour les anions, de la triacétophénone. Ces molécules possèdent des cycles aromatiques qui absorbent fortement l'UV. Quelques groupes de recherche utilisent des lasers IR afin de réduire le taux de fragmentation des molécules à analyser, surtout pour les gros systèmes comme des protéines ²⁵, ou pour sonder des échantillons plus profondément. Les photons UV pénètrent en effet jusqu'à 200 nm, et la lumière IR jusqu'à 2 μ m ²⁶.

La distribution en vitesse initiale des ions créés par une source MALDI est large ²⁷ et la résolution en masse en pâtit, c'est pourquoi aujourd'hui, une grande majorité des spectromètres utilisant une source d'ions MALDI possèdent une extraction retardée, c'est-à-dire que les ions sont produits dans une zone sans champ électrique, et qu'on applique une impulsion électrique après un certain délai, typiquement 300 ns ^{28,29}. L'électrospray couplé à

un quadropôle ou un FT-ICR (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance) est la technique la plus précise en terme de résolution et de précision en masse. La résolution peut ainsi atteindre 43000, contre 40000 pour le MALDI-TOF avec extraction retardée (Bruker Daltonics).

2.8 La désorption sur jet liquide

J'ai parlé précédemment, dans le paragraphe 2.5, de la technique d'ionisation FAB, qui consiste à bombarder une surface liquide avec des ions ou des atomes de basse énergie. Les scientifiques qui ont développé la désorption sur jet liquide sous vide se sont certainement inspirés du FAB, puisque le principe est similaire, à la différence que le jet est bombardé de photons et non de matière. Le schéma d'un montage expérimental typique est dessiné dans la Figure 6. Le liquide est introduit de manière continue à une pression de 10 à 100 bar à travers une ouverture de 20 μm de diamètre, ce qui produit un jet ayant une vitesse de 10 à 100 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ^{30,31}. Le flux doit être laminaire, il faut donc que la pression exercée ait une valeur telle que le nombre de Reynolds soit compris entre 100 et 1000. Afin de garder un vide d'environ 10^{-6} mbar dans l'enceinte expérimentale, un piège refroidi à l'azote liquide (77 K) est situé à 10 cm en aval du jet³². Même si un intense refroidissement évaporatif a lieu à la surface du liquide, un jet d'eau qui se trouve sous vide passe rapidement dans un état métastable super-refroidi, et gèle dès qu'il rencontre le piège à azote, formant une pointe de glace et pouvant boucher l'ouverture. L'éthanol pose moins de problèmes du fait de sa température de solidification plus basse (156 K). L'équipe de R. Saykally a montré que la température de la surface d'un jet d'eau de 4 μm de diamètre chute à partir de 300 K à la vitesse de $10^5 \text{ K}\cdot\text{s}^{-1}$ jusqu'à 260 K³³. Des mesures de diffraction de laser UV ont montré que le jet se comporte comme un filament stable de diamètre identique à celui de l'ouverture³⁴. Lorsqu'un laser UV est envoyé sur le jet, des complexes ionisés de molécules de solvant sont éjectés dans la direction du laser, et des molécules contenant des cycles aromatiques diluées dans le solvant peuvent être éjectées après avoir été ionisées si elles absorbent deux photons. En effet, leur potentiel d'ionisation est voisin de 9 eV en phase gazeuse, et 7,5 eV en surface d'un liquide³⁵. Des électrons peuvent également être émis.

Les ions sont analysés après leur désorption du jet par un spectromètre de masse de type TOF, le laser de désorption étant souvent impulsionnel. Une impulsion de tension est appliquée aux plaques d'extraction avec un délai qui est réglé de façon à maximiser la résolution en masse, qui peut atteindre 300³². De multiples études ont ainsi pu être menées sur le comportement physique et la réactivité chimique de molécules diverses sur une surface

liquide³⁶. Avec un laser UV comme pompe et un laser visible comme sonde, on peut par exemple calculer le temps de relaxation d'un état excité d'une molécule en surface en mesurant l'intensité des ions éjectés du jet³⁷.

Le principal mécanisme de formation des ions par illumination dans l'UV est l'éjection coulombienne. Dans ce modèle, les électrons éjectés de la surface du jet par irradiation laser laissent la surface chargée positivement, et lorsqu'un ion en surface subit une énergie de répulsion électrostatique supérieure à son énergie de solvation, il est désorbé et peut être détecté par le spectromètre de masse³⁸. Des expériences soutiennent ce modèle de façon semi-quantitative, en montrant qu'en augmentant la puissance du laser, on observe d'abord uniquement des ions à l'intérieur du jet, puis à partir d'un seuil des ions supplémentaires sont détectés par le TOF-MS (cf. Figure 5)³⁹. D'autres mesures ont montré que les ions éjectés ont une vitesse d'environ 700 m.s^{-1} et sont entourés d'un nombre variable de molécules de solvant. Celles-ci peuvent ensuite se détacher de l'ion, diminuant ainsi son énergie interne. Des réactions chimiques ou physiques peuvent se produire sur la surface du jet, comme la formation de $\text{C}_6\text{H}_5\text{OC}_6\text{H}_5\text{OH}^+$ à partir d'une solution aqueuse de phénol ou la transition d'une couche de phénol constituée de monomères vers une couche de dimères³². Ces phénomènes peuvent être étudiés à partir de la seule mesure des spectres de masse issus de la désorption laser UV sur jet liquide.

Il est également possible d'irradier le jet liquide avec des impulsions laser IR de quelques nanosecondes dont la longueur d'onde correspond à un mode de vibration du solvant, par exemple le mode d'élongation O-H de l'eau autour de $3 \mu\text{m}$ (dans ce cas le laser utilisé est un OPO (Optical Parametric Oscillator)) ou C-O du méthanol à $9,66 \mu\text{m}$ ⁴⁰⁻⁴². Le nom de la méthode est LILBID (Laser-Induced Liquid Beam Ionization/Desorption). Le mécanisme d'ionisation, bien que restant mal compris, semble être radicalement différent du cas d'un laser UV. En effet, c'est le *solvant* qui absorbe l'énergie lumineuse et la transmet à l'ion préformé pour que celui-ci s'échappe du jet. Plusieurs mécanismes détaillés ont été proposés selon les caractéristiques du laser IR: pour Sobott et ses collaborateurs⁴³, un laser à CO_2 délivrant des impulsions de 100 ns à $9,66 \mu\text{m}$ est utilisé. L'énergie surfacique atteinte est de 10^{11} W.m^{-2} et la surface du faisceau focalisé est de 2 mm^2 . Après absorption par l'eau, l'énergie des photons IR se redistribue selon tous les degrés de liberté vibrationnels du solvant par IVR (Intermolecular Vibrational energy Redistribution) en quelques picosecondes, induisant une montée de la température à une vitesse de l'ordre de 10^{10} K.s^{-1} . La pression atteint plusieurs centaines de bars, et le liquide se trouve alors dans un état supercritique, ce

qui induit une expansion soudaine: la constante diélectrique chute et la plupart des ions et contre-ions se recombinent ⁴⁴, sauf certains qui peuvent alors être détectés. L'équipe de B. Abel est dans un cas différent: le laser IR a un diamètre de 50 μm de façon à éviter de former un plasma dans le jet liquide. L'énergie surfacique est de 10^{12} W.m^{-2} , l'impulsion est centrée autour de 2700 cm^{-1} et dure quelques nanosecondes. Deux mécanismes supplémentaires sont alors proposés ⁴⁵: la décomposition thermique explosive et l'onde de choc. Leur hypothèse principale est que l'énergie IR est absorbée de manière non-homogène, à cause de points chauds dans le faisceau laser, donnant naissance à une onde de choc, phénomène non-thermique dispersant le liquide. Celui-ci serait alors suivi par une expansion thermique. Le mécanisme d'ionisation en lui-même est sujet à controverse. L'évaporation d'une nanogouttelette chargée ayant été éjectée du jet liquide n'est pas compatible avec les conditions expérimentales des études, la température de la nanogouttelette devant être de l'ordre de 1000 K pour obtenir un ion isolé. L'ion est supposé être créé par protonation en solution.

Cette méthode de désorption par laser IR présente des caractéristiques intéressantes pour l'étude des molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse: les ions observés par spectrométrie de masse possèdent des états de charge peu élevés, typiquement 1 ou 2 protons ajoutés ou enlevés, ce qui permet de minimiser l'impact des interactions électrostatiques sur les grandeurs physiques et chimiques étudiées. De plus, le taux de fragmentation des molécules désorbées est très faible, faisant de cette technique d'ionisation l'une des plus douces qui existent, ce qui permet d'observer des complexes non-covalents de protéines ^{46,47}. Enfin, plusieurs indices expérimentaux issus de travaux de l'équipe de B. Brutschy indiquent que la molécule isolée conserve une « mémoire » de la solution ^{44,48}: l'intensité du signal correspondant au cytochrome C et à l'albumine du sérum des bovins est proportionnelle à leur concentration initiale en solution, des complexes spécifiques de protéines avec des molécules d'eau et des ions métalliques ont été détectés, et un comportement vis-à-vis du pH identique à celui en solution a été démontré pour la Ribonucléase S, un complexe protéine-peptide. Cependant, le jet continu consomme beaucoup de produit dont la majorité n'est pas utilisée. Cet inconvénient majeur disparaît dans la technique mise au point par l'équipe de B. Brutschy: la désorption laser sur microgouttelettes.

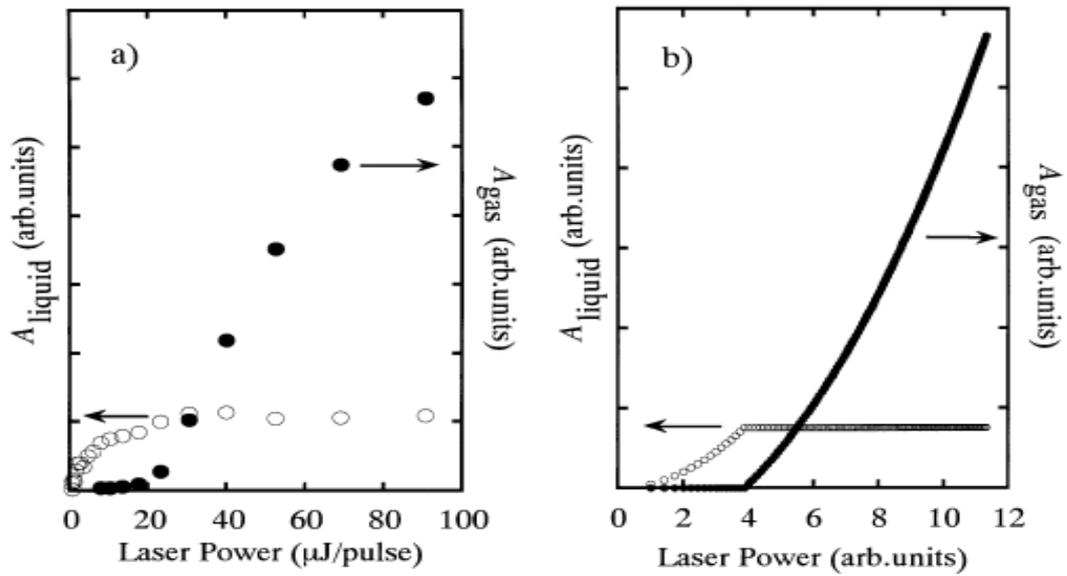


Figure 5 : Intensité des ions à l'intérieur du jet (ronds évidés) et détectés par le TOF-MS (ronds pleins); a) expérience, b) modèle (figure tirée de la référence ³⁹)

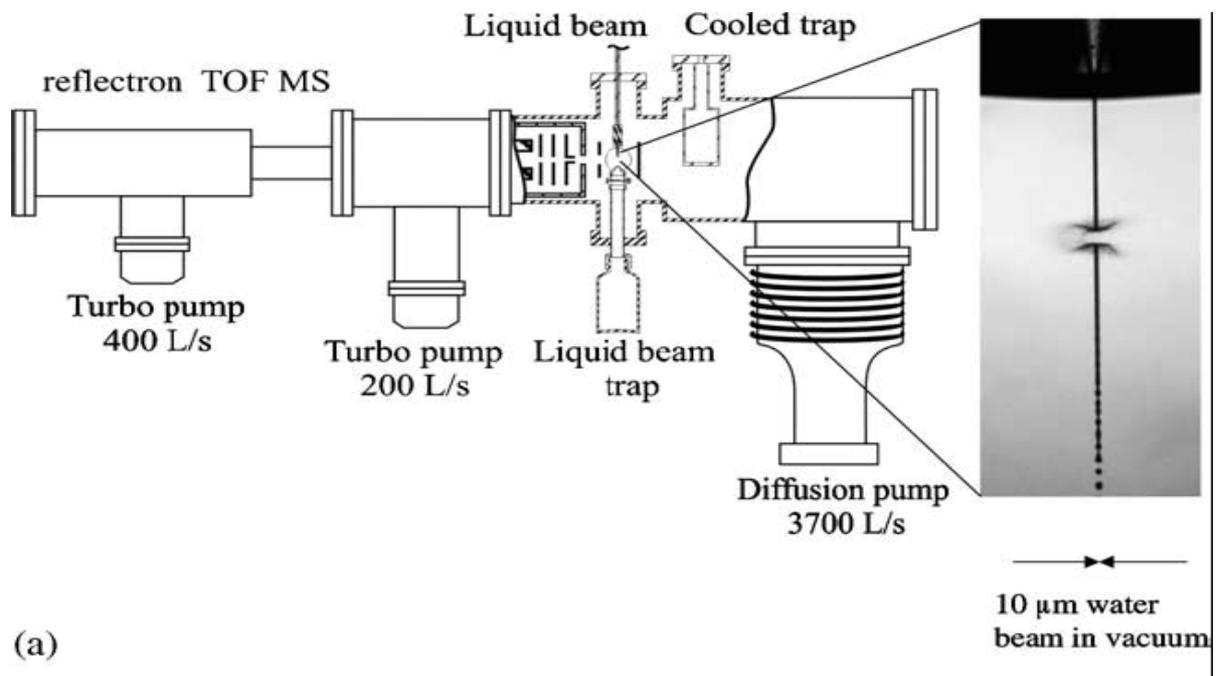


Figure 6 : schéma d'un montage expérimental de désorption sur jet liquide (figure tirée de la référence ⁴⁵).

2.9 La désorption sur micro-gouttelettes

Pour obtenir des ions isolés dans cette technique, le moyen couramment utilisé est un

laser, qui est alors focalisé et synchronisé sur les gouttelettes, à la fréquence du générateur de gouttes ou un multiple ou diviseur de cette fréquence. La synchronisation est facilitée par le montage d'une diode stroboscopique devant le passage des gouttelettes, ce qui permet de visualiser celles-ci, donc de mesurer leur vitesse et le délai entre l'impulsion piézoélectrique et le flash de la diode. Notons qu'une autre piste a été explorée par l'équipe de J. L. Beauchamp, celle de l'ionisation par champ électrique ⁴⁹. Dans leur expérience, des gouttes de méthanol de 170 microns de diamètre passent entre les plaques d'un condensateur où règne un puissant champ électrique d'environ $2 \cdot 10^6 \text{ V.m}^{-1}$. Sous l'effet de ce champ, elles s'allongent dans sa direction et deux jets sont émis aux deux extrémités de la goutte. Ces jets sont constitués de nano-gouttelettes et d'ions isolés qui peuvent alors être détectés par spectrométrie de masse. Le phénomène est une fission de Rayleigh, mais symétrique car la goutte n'est pas chargée, contrairement au cas asymétrique de l'électrospray. Un spectre du cytochrome C similaire à celui observé avec une source électrospray a ainsi été obtenu. Pour la désorption d'ions, deux solutions ont été explorées: d'abord le laser UV ⁵⁰, puis IR ⁵¹. Les travaux précurseurs de Mansoori et ses collaborateurs sur les effets de l'intensité d'un laser à 248 nm, la concentration des espèces dans des gouttelettes de glycérol de quelques microns de diamètre et la taille de celle-ci sur le signal d'ions mesuré ont permis d'explorer cette nouvelle technique. Cependant, ils utilisaient un générateur d'aérosol, leur rendement d'ionisation était donc très bas, autour de 10^{-6} . L'énergie surfacique du laser était de 10^4 J.m^{-2} . Ils ont notamment observé que l'intensité du signal d'ions croît linéairement avec la concentration et le volume de la goutte dans le cas d'espèces inorganiques diluées. Des conclusions similaires ont été tirées d'études sur des molécules organiques dans des gouttes plus grosses (50 μm de diamètre) par l'équipe de B. Brutschy. Cette même équipe a montré que des édifices moléculaires conséquents pouvaient être observés grâce à cette technique, comme des complexes non-covalents de protéines ou des oligonucléotides ⁵². Comme dans le cas des jets liquides, les états de charge des désorbées sont bas. Pour résumer, les micro-gouttelettes gardent tous les avantages du jet liquide, c'est-à-dire la mise en phase gazeuse extrêmement douce, la tolérance par rapport à l'utilisation des sels destinés à solubiliser certaines molécules, la tendance à conserver certaines propriétés physiques de la phase liquide, tout en éliminant son principal défaut: la consommation élevée de produit. Un spectre de masse peut être mesuré avec une seule goutte, qui contient une quantité de matière de l'ordre de l'attomole.

La particularité des microgouttelettes est qu'elles sont isolées de leur environnement lorsqu'elles sont sous vide, notamment de tout apport de chaleur extérieur. Le refroidissement

évaporatif est alors significatif, et on peut se demander si les microgouttelettes ont le temps de geler, ce qui peut avoir son importance car le spectre d'absorption d'une espèce n'est en général pas le même pour les états solide et liquide... Je discuterai de cette possibilité dans la partie suivante.

VII.3 Développement expérimental: source d'espèces biomoléculaires en phase gazeuse refroidies ro-vibrationnellement

3.1 Intérêt du refroidissement ro-vibrationnel

a) Origine de la largeur des bandes en spectroscopie IR

Lorsqu'on simule un spectre IR d'absorption ou d'émission, on calcule des transitions entre états vibrationnels d'un système moléculaire. Ces états étant quantifiés, ces transitions sont des valeurs d'énergie ou de fréquence bien définies, or on compare ces spectres discrets à des spectres de bandes plus ou moins larges, ce qui complique parfois la tâche de l'attribution des bandes lorsque l'écart entre celles-ci est de l'ordre de leur largeur à mi-hauteur. Cette largeur peut être due à plusieurs facteurs: la source de lumière utilisée, la co-existence de plusieurs conformères du même système moléculaire dans l'expérience, et la température ro-vibrationnelle des espèces étudiées. Dans le cas de la spectroscopie IRMPD, le laser à électrons libre a une largeur intrinsèque d'environ $\Delta\nu = 0,01\nu$, avec ν le nombre d'onde de la lumière. Pour les études que nous avons menées pendant ma thèse, où les spectres sont mesurés entre 1000 et 2000 cm^{-1} , cette largeur est d'environ 15 cm^{-1} . De plus, une espèce moléculaire flexible, comme le sont beaucoup de systèmes d'intérêt biologique ou pharmaceutique, peut explorer sa PES autant que le lui permet son énergie interne, et peut donc franchir des barrières d'isomérisation séparant un conformère d'un autre. Comme le spectre IR dépend de la conformation de la molécule, différents conformères présents dans la même expérience donneront un spectre qui sera la superposition des spectres individuels. On aura donc un élargissement et/ou une multiplication des bandes spectrales. Enfin, la température de 300 K induit un peuplement conséquent des états rotationnels excités de l'état vibrationnel fondamental, et donc un élargissement des transitions vibrationnelles sondées. Cette contribution est majoritaire dans les études présentées dans cette thèse. C'est donc sur celle-ci qu'on doit agir pour augmenter la résolution des spectres IR des espèces en phase gazeuse, qui est d'environ 20 cm^{-1} dans notre cas.

b) Solutions possibles pour l'amélioration de la résolution

• *Le piège refroidi*

La méthode la plus directe est de refroidir le milieu dans lequel sont stockées les espèces moléculaires. Dans le cas d'ions, la solution retenue par plusieurs groupes, dont celui de T. Rizzo à Lausanne, est de mettre en contact les parois d'un piège électrostatique de type multipolaire (leur piège contient 22 pôles) avec un gaz liquéfié comme l'azote (80 K) ou l'hélium (10 K). Le contenu du piège, c'est-à-dire un gaz rare et les ions, se trouve après un certain temps en équilibre thermique avec les murs par collisions inélastiques. Des températures rotationnelles et vibrationnelles de l'ordre de quelques Kelvin peuvent ainsi être atteintes. La Figure 7 illustre cette réduction drastique de l'élargissement ro-vibrationnelle sur une transition électronique du tryptophane protoné dans une expérience réalisée par Rizzo *et al.* Le contraste est énorme entre l'expérience à température ambiante et dans le piège d'hélium à 10 K : la largeur à mi-hauteur de la transition électronique dans le premier cas est d'environ 500 cm^{-1} , alors que dans le piège refroidi les transitions vibrationnelles apparaissent nettement avec une résolution de l'ordre de 5 cm^{-1} . Grâce à cette technique, l'équipe de T. Rizzo a pu mener des études structurales sur des peptides de sept acides aminés sélectionnés en masse et en conformère, ce qui n'avait jamais été fait auparavant⁵³. L'inconvénient majeur de ce type de refroidissement est qu'il ne peut s'appliquer qu'à des ions. Je vais décrire dans les prochains paragraphes des techniques applicables à des espèces neutres.

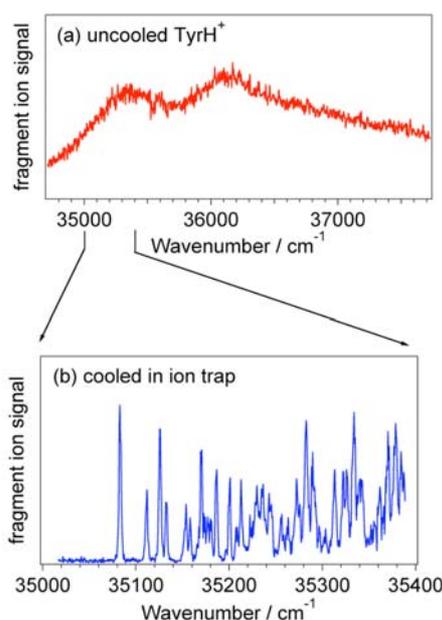


Figure 7 : comparaison entre le spectre UV de la tyrosine protonée à 300 K (en haut) et un agrandissement de celui-ci mesuré dans un piège à hélium liquide à la température de 10 K (en bas).

- *Le jet supersonique*

La technique que nous avons choisie est le jet supersonique. Il faut bien différencier celui-ci d'un jet effusif : ce dernier consiste simplement en une cellule remplie de gaz à une pression donnée, supérieure à la pression extérieure, et un petit trou dans la cellule permet à un jet de gaz de s'en échapper. Les atomes ou molécules sortent dans toutes les directions, et avec une distribution de vitesses de type Maxwell-Boltzmann à la température du gaz dans l'enceinte. Au contraire, un jet supersonique nécessite une différence de pression entre la cellule et l'espace où sort le gaz de plusieurs ordres de grandeur, ce qui est réalisé en faisant le vide secondaire dans une enceinte de l'autre côté du trou, plusieurs bar de gaz étant présents dans la cellule (*cf.* Figure 8). Les propriétés d'un jet supersonique sont particulières : comme son nom l'indique, le gaz sort avec une vitesse supérieure à celle du son à la pression qui règne dans l'enceinte, donnant ainsi naissance à un front d'onde appelé « bouteille de Mach », et qui confine le gaz à l'intérieur de celle-ci. Ce front d'onde est d'autant plus éloigné du trou que le vide est poussé dans l'enceinte, mais le coût d'une pompe augmente très vite avec sa capacité de pompage, on a donc souvent recours à un pompage différentiel. Concrètement, on place un écorceur aligné avec le trou à quelques millimètres de celui-ci. Les parois de l'écorceur sont faites pour absorber l'onde de choc et ne pas la réfléchir afin de ne pas perturber le jet. Le but est de sélectionner la partie centrale du jet, celle où les collisions sont les plus nombreuses donc la plus froide, et de pomper l'enceinte située après l'écorceur afin de reculer le front d'onde par rapport à une situation sans écorceur.

Une autre propriété intéressante du jet supersonique est que les distributions angulaires et en vitesse sont très étroites, de l'ordre de 0,3 mrad et 1 %. Les vitesses relatives des particules de gaz sont donc très faibles, et comme la température augmente avec la valeur moyenne de cette distribution de vitesse, on a un gaz très froid, de l'ordre de 10 K. On peut donc mélanger les molécules au gaz dans la cellule, et elles auront la même température que celui-ci dans l'expansion supersonique. Mais attention, c'est de la température translationnelle dont il est question ici, or c'est le contour rotationnel qu'il faut affiner. Le fait est que les collisions à trois corps avec le gaz refroidissent également ro-vibrationnellement les espèces présentes dans le jet, de façon cependant moins efficace que les degrés de libertés de translation. La raison à ceci est que les niveaux ro-vibrationnels sont quantifiés, il faut donc qu'une quantité d'énergie égale à la différence entre deux niveaux soit emportée par le troisième corps. La probabilité de collisions hautement énergétiques étant faible, le refroidissement est d'autant plus efficace que le système possède des intervalles petits entre

- ***Le refroidissement par incorporation dans des gouttelettes d'hélium***

Le refroidissement par collisions dans un jet supersonique est un processus qui n'aboutit pas toujours à l'équilibre thermodynamique, ce qui pose un problème lorsqu'on veut parler de température. Un moyen d'aboutir à cet équilibre est d'utiliser une technique astucieuse : l'incorporation d'espèces neutres dans de nanogouttelettes d'hélium à très basse température. Le refroidissement se fait alors par collision et évaporation d'un certain nombre d'atomes d'hélium, de plusieurs centaines à plusieurs milliers selon la taille de la molécule. On peut ainsi atteindre des températures translationnelle, vibrationnelle et rotationnelle d'environ 0,4 K. Les gouttelettes, qui contiennent de l'ordre de 10^3 - 10^5 atomes, sont formées par production d'un jet supersonique d'hélium et passent dans une cellule où les molécules à étudier sont évaporées puis capturées par les gouttelettes⁵⁵. L'avantage de cette technique est de refroidir le système moléculaire sans perturber sa structure isolée et ainsi obtenir son spectre IR en phase gazeuse⁵⁶⁻⁵⁸.

3.2 Réalisation du montage expérimental

a) Principe général de l'expérience

Dans cette nouvelle source d'espèces biomoléculaires en phase gazeuse (voir Figure 9), celles-ci sont d'abord dissoutes dans un solvant, puis des micro-gouttelettes sont formées à partir de cette solution et envoyées sous vide secondaire. Une impulsion IR centrée sur une bande d'absorption du solvant est alors envoyée sur les gouttelettes afin de les faire exploser et désorber les molécules à étudier, d'une façon similaire à la technique décrite dans le paragraphe 2.9 de ce chapitre. Une fois isolées, celles-ci sont entraînées par un jet supersonique impulsionnel de gaz rare créé par une vanne Even, qui a l'avantage de pouvoir s'ouvrir pendant des temps très courts (de l'ordre de la dizaine de microsecondes) comparés à ceux atteints par les vannes conventionnelles. Nous espérons refroidir les ions et les espèces neutres jusqu'à des « températures » vibrationnelles¹ de l'ordre de 50 K⁵⁹. Le jet supersonique entraîne les espèces jusqu'à un spectromètre de masse à temps de vol couplé à un réflectron (Re-TOF), qui les analysera en masse avec une résolution de l'ordre de 1000. Dans le cas des espèces neutres, un laser UV devra être ajouté au montage afin de les ioniser avant qu'elles arrivent dans le spectromètre, comme dans les expériences de spectroscopie IR/UV (voir chapitre II). Juste avant le réflectron sera placé un système de sélection en masse

¹ Dans l'hypothèse d'un équilibre thermique dans le jet supersonique, ce qui n'est pas toujours vrai.

électrostatique. Ensuite, un laser OPO fin décrit dans la suite de ce chapitre sera envoyé sur les ions pour réaliser la spectroscopie IR. Des détecteurs à micro-canaux sont également prévus pour recueillir les ions et ainsi obtenir des spectres de masse.

La première étape a été l'exploration des possibilités offertes par le générateur de gouttelettes, nous avons ensuite imaginé et réalisé le couplage avec l'enceinte à vide et la vanne impulsienne qui produit le jet supersonique. La construction d'un nouveau laser OPO large bande a permis la désorption des gouttelettes, et nous sommes actuellement en train de caractériser la source en termes de courant d'ions et de refroidissement. Je vais décrire brièvement chacune des étapes ayant abouti à ce qui constitue potentiellement la première source d'ions et d'espèces neutres refroidies en phase gazeuse.

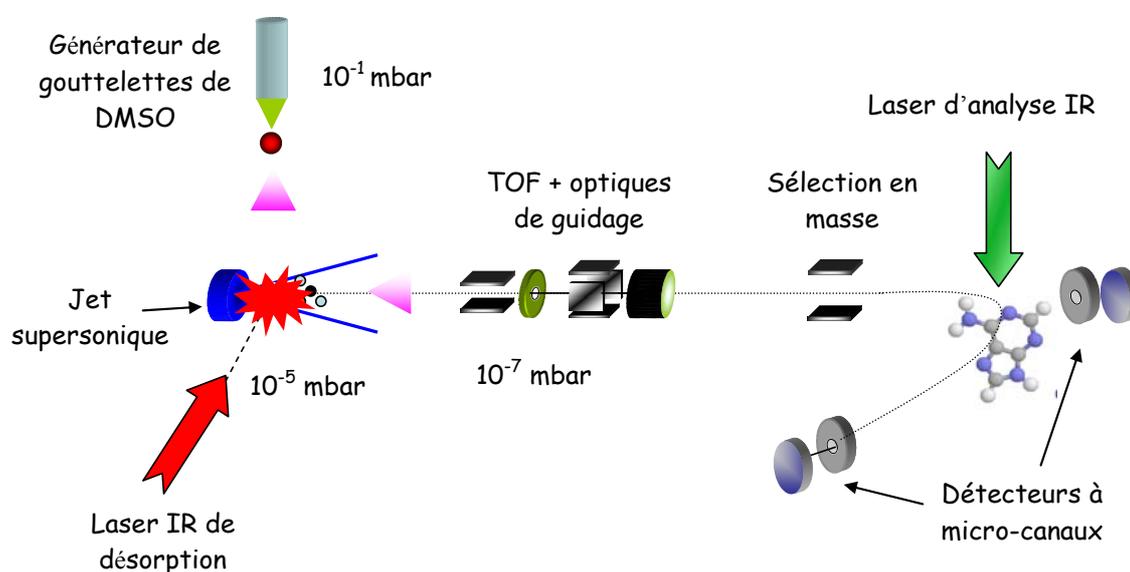


Figure 9 : schéma du futur dispositif expérimental réalisé au laboratoire pour la spectroscopie IR d'espèces refroidies vibrationnellement.

b) Génération de micro-gouttelettes

Nous avons choisi un générateur de micro-gouttelettes vendu par Microdrop, une société allemande. Celui-ci présentait l'avantage d'avoir été testé par l'équipe de B. Brutschy auparavant. Ce genre d'appareil est utilisé généralement en biologie pour déposer de très faibles quantités de produit de manière précise sur un grand nombre d'échantillons. Le fonctionnement du générateur est décrit par la Figure 10 : le liquide passe dans un capillaire de verre d'environ 100 μm de diamètre, lui-même entouré d'un matériau piézoélectrique. Lorsqu'une impulsion électrique lui est envoyée, celui-ci se contracte et envoie une onde de

choc au capillaire en verre, qui transmet à son tour la vibration au liquide. Comme l'extrémité du capillaire est ouverte, il s'en échappe une goutte dont le diamètre est environ égal à celui de l'extrémité, ici 50 μm . Les caractéristiques de l'impulsion à envoyer dépendent du liquide, et surtout de sa viscosité. Pour l'eau à température ambiante, un bon fonctionnement requiert des valeurs typiques de 100 V pour l'intensité, sur une durée de 20 μs .

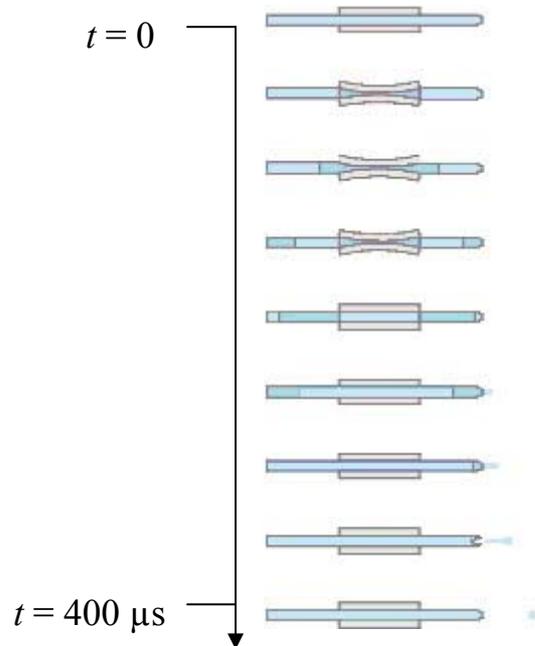


Figure 10 : séquence de fonctionnement du générateur piézoélectrique de micro-gouttelettes. Le liquide bleu est à l'intérieur du capillaire, lui-même entouré par le matériau piézoélectrique. A $t = 0$, on envoie l'impulsion de tension. (Image tirée du site www.microdrop.de)

Comme nous n'avons pas d'expérience avec ce générateur, nous l'avons testé avec un montage provisoire à l'air libre. Le positionnement dans le plan pouvait être réglé avec deux montures micrométriques, et l'angle de visée à l'aide d'une monture pour miroir. La gouttelette devant à terme passer dans une chambre sous vide secondaire par un orifice très petit, il fallait évaluer les possibilités de maîtrise des gouttelettes. Nous avons ainsi pu établir plusieurs conclusions importantes pour la suite :

- Le générateur produit des gouttelettes d'eau de diamètre constant jusqu'à une fréquence de 1000 Hz, peut être piloté facilement à distance et les gouttelettes sont visualisables par le système de diode stroboscopique fourni par Microdrop.
- La régularité en vitesse dépend de la distance par rapport à la sortie du générateur : à

quelques millimètres, la variation de vitesse n'est pas perceptible à l'oeil. Lorsque la goutte a parcouru quelques centimètres, sa vitesse diminue fortement et fluctue à cause des frottements visqueux avec l'air.

- La direction des gouttelettes est fortement influencée par les courants d'air.
- Lorsqu'on protège les gouttelettes pendant leur parcours, on peut viser l'extrémité d'une aiguille située à environ 7 cm du générateur de façon reproductible.
- Et enfin, nous avons fait exploser des gouttelettes d'eau avec le laser OPO (Optical Parametric Oscillator) de l'équipe réglé à 3330 cm^{-1} et focalisé sur environ 1 mm^2 (voir Figure 11). L'énergie était d'environ 5 mJ.

Comme nous envisagions de mettre le générateur sous vide primaire afin de faciliter le pompage dans la chambre où la désorption se fera, la seconde étape a été de vérifier si le générateur fonctionnait sous une pression d'environ 50 mbar. Cette valeur est supérieure à celle de la pression de vapeur saturante de l'eau à température ambiante (23,4 mbar à 293 K), l'évaporation est ainsi limitée. J'ai alors constaté que les gouttelettes sont toujours formées à cette pression, et que la stabilité semble être renforcée par l'absence de courants d'air, mais à la condition rédhibitoire de placer le réservoir de liquide assez bas pour que le niveau dans celui-ci soit en dessous de la sortie du générateur. En effet, la pression de la colonne de liquide est assez grande pour créer un ménisque qui absorbe l'onde de choc et empêche la formation des gouttelettes.

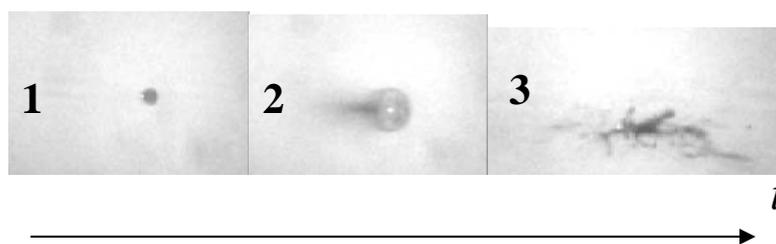


Figure 11 : séquence temporelle de l'explosion d'une gouttelette d'eau. L'ordre de grandeur de la durée séparant les images 1 et 3 est de 100 μs .

c) Couplage des gouttelettes à l'enceinte à vide

Le schéma du montage retenu pour la source de molécules en phase gazeuse est montré dans la Figure 12. Le générateur de gouttelettes est placé dans une chambre à vide séparée de l'enceinte principale où se trouve le jet supersonique par un écorceur dont le trou

fait 300 μm de diamètre. Les gouttes doivent donc passer à travers ce trou, c'est pourquoi le générateur est réglable dans le plan perpendiculaire à l'axe défini par la direction prise par les gouttelettes, et en angle (*cf.* Figure 13). La chambre principale est reliée à une pompe turbomoléculaire de débit 1600 $\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ (pour le diazote). Le vide atteint est de l'ordre de 10^{-6} mbar dans la chambre principale et 10^{-1} mbar dans celle du générateur, en pompant en continu pendant 24 h en l'absence de celui-ci. La différence de pression vient du très faible diamètre du trou et de la nature moléculaire de l'écoulement à cette pression : les molécules de gaz n'ont plus d'interactions entre elles, il n'y a donc pas d'effet d'entraînement et seules passent à travers le trou celles qui frappent un disque de 300 μm de diamètre de manière statistique à cette pression.

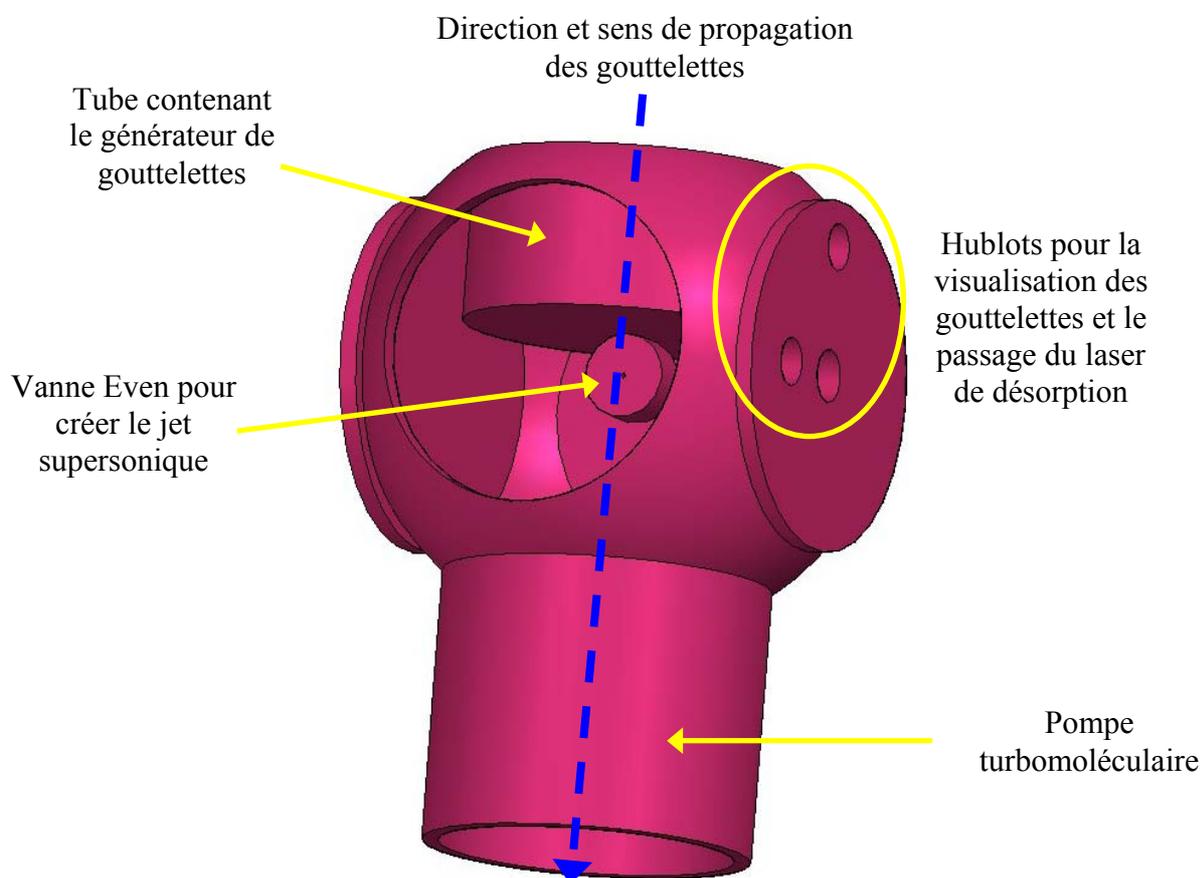


Figure 12 : dessin technique représentant l'enceinte à vide et la source d'espèces biomoléculaires en phase gazeuse.

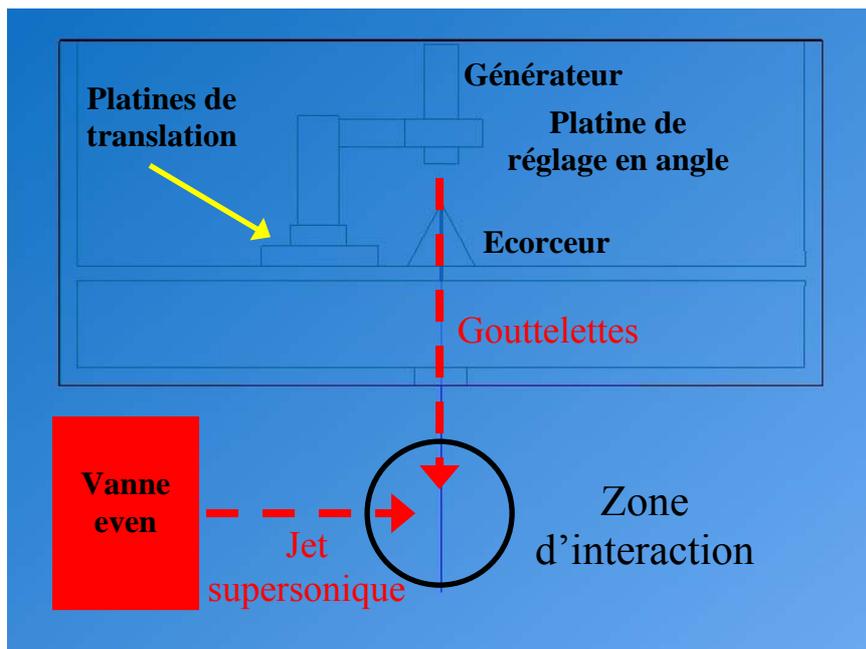


Figure 13 : agrandissement et coupe transversale du tube contenant le générateur de gouttelettes. Le dessin n'est pas à l'échelle.

Nous avons d'abord effectué des essais avec de l'eau comme solvant. Comme sa pression de vapeur saturante est plus grande que la pression atteinte avec la pompe turbomoléculaire, une micro-fuite doit laisser passer assez d'air dans la chambre où est placé le générateur pour que la pression d'équilibre soit au moins égale à 30 mbar. Malheureusement, l'air étant aspiré par le trou de l'écorceur, les gouttelettes sont fortement perturbées et déviées de leur trajectoire. Il est alors impossible de les visualiser au niveau de la vanne Even.

Comme les essais précédents n'étaient pas concluants, j'ai proposé d'utiliser un autre solvant, le DMSO (diméthylsulfoxyde), dont la pression de vapeur saturante est de $5 \cdot 10^{-2}$ mbar, soit bien plus basse que la pression atteinte dans la chambre du générateur en l'absence de micro-fuite. Autre avantage, le DMSO possède une forte bande d'absorption dans l'IR, autour de $3,3 \mu\text{m}$ de longueur d'onde, due aux modes de vibration d'élongation CH. Enfin, c'est un solvant utilisé couramment en biologie, peu onéreux, et qui dissout la plupart des composés organiques d'intérêt biologique. Les premiers essais à l'air libre révélèrent que des gouttelettes de DMSO sont produites mais avec des impulsions de $30 \mu\text{s}$ de durée et 150 V d'amplitude. Lorsque nous mettons le générateur dans l'enceinte à vide, les réglages sont un peu différents, mais les gouttelettes passent à travers l'écorceur et nous les voyons au niveau de la vanne Even.

Lorsqu'une gouttelette d'un matériau liquide dans les conditions normales de température et de pression ($T = 300 \text{ K}$, $P = 1 \text{ atm}$) est mise sous un vide secondaire de façon soudaine, et donc isolée du milieu environnant, elle se retrouve hors d'équilibre thermodynamique et un refroidissement évaporatif a lieu. On peut alors se demander si la gouttelette va changer de phase, c'est-à-dire se solidifier, car même si sa température descend en dessous de sa température de fusion à pression atmosphérique, par exemple $273,15 \text{ K}$ pour l'eau, la pression est beaucoup plus faible et par conséquent la température de fusion baisse... Le fait que la gouttelette soit isolée pose également le problème de l'absence de « noyau » qui permet d'habitude la solidification : sans ce noyau, la gouttelette peut rester liquide en dessous de sa température de fusion, elle est alors dans un état métastable super-refroidi. Si la gouttelette se solidifie, les propriétés optiques peuvent changer, et notamment l'absorption, il est donc important de se pencher sur la question. Par exemple, pour un rayonnement de longueur d'onde $3 \mu\text{m}$, la partie imaginaire n_i de l'indice de réfraction de la glace à -7 °C est de $0,411$ ⁶⁰, alors qu'elle est de $0,310$ pour l'eau à 1 °C ⁶¹, soit une différence de 25% , ce qui n'est pas négligeable. Dans une récente publication, L. Zilch *et al.* décrivent l'évaporation de gouttelettes d'eau sous vide secondaire⁶². Selon leurs calculs, des gouttelettes d'environ $10 \mu\text{m}$ de diamètre, soit cinq fois plus petites que dans notre cas, passent par un état super-refroidi et sont solidifiées au bout de 3 ms environ. Ils montrent également que l'évolution du temps au bout duquel les gouttelettes sont solides augmente à peu près linéairement avec le diamètre de la goutte, on peut donc s'attendre à une solidification au bout de 15 ms pour une gouttelette de $50 \mu\text{m}$ de diamètre. Malheureusement, il n'est pas possible d'estimer cette durée à partir de leur modèle pour des gouttes de DMSO car les auteurs de la référence⁶² ont utilisé des expressions empiriques de grandeurs physiques en fonction de la température qui sont valables uniquement pour l'eau... Il y a toutefois un autre facteur extrêmement important : le DMSO est une substance très différente de l'eau, sa tension de vapeur saturante est notamment beaucoup plus basse que celle de l'eau, cela augmentera encore la durée de solidification. Le temps de parcours de nos gouttelettes jusqu'à la vanne Even est de 30 ms environ, on ne peut donc a priori pas trancher sur l'état de phase de celles-ci. Cependant, les images d'explosion de gouttelettes de DMSO sous vide secondaires ressemblent beaucoup à celles de la Figure 11, on peut notamment remarquer sur l'image n°3 que la goutte est disloquée à la manière d'un liquide et non d'un solide. On peut donc supposer que les gouttelettes n'ont pas le temps de se solidifier.

d) Explosion des gouttelettes

• Réalisation du laser OPO de désorption

Etant donné la densité d'énergie surfacique requise pour la désorption (de l'ordre de 100 MW/cm^2), nous avons choisi d'utiliser un laser OPO accordable dans l'IR autour d'une longueur d'onde de $3 \text{ }\mu\text{m}$ pour l'explosion des gouttelettes de DMSO et la désorption des ions. Le savoir-faire de l'équipe a permis de le construire au laboratoire en quelques mois. La Figure 15 en montre le schéma. Un cristal non-linéaire de niobate de Lithium, LiNbO_3 , choisi pour ses propriétés de transparence aux longueurs d'onde utilisées, est pompé par un faisceau d'une longueur d'onde de $1,064 \text{ }\mu\text{m}$ issu d'un laser Nd:YAG impulsif nanoseconde. Deux miroirs de chaque côté du cristal forment une cavité qui permet d'amplifier la lumière produite par le processus non linéaire d'amplification paramétrique au sein du cristal. Ainsi, contrairement à un laser classique, aucune inversion de population n'est réalisée dans un OPO, c'est une conversion de fréquence qui permet d'obtenir le faisceau voulu. On a au total trois faisceaux : la pompe, le signal et le complémentaire (que l'on appelle aussi « idler »). Par convention, le faisceau de plus petite longueur d'onde est le signal. Du fait de la conservation de l'énergie, le processus non-linéaire obéit à l'équation suivante :

$$\omega_p = \omega_s + \omega_c$$

avec ω_p , ω_s , et ω_c les pulsations des faisceaux de pompe, du signal et du complémentaire. C'est ce dernier qui constitue le rayonnement IR que l'on veut optimiser. On doit également satisfaire la condition similaire pour les vecteurs d'onde en vertu de la conservation de la quantité de mouvement des photons. D'autre part, lors de la propagation dans le long du cristal, ces trois faisceaux de longueurs d'ondes sensiblement différentes « voient » des indices optiques différents, et donc n'ont pas la même vitesse de groupe. Par conséquent, même si elles sont en phase au début du cristal, les ondes perdent leur cohérence lors du trajet et ne sont plus superposées temporellement. Après une certaine distance parcourue, elles sont même en opposition de phase et le processus inverse se produit alors : un photon de pulsation ω_s et un autre ω_c donnent un photon ω_p . Cette distance est appelée « longueur de cohérence » et est quantifiée par le désaccord de phase $\Delta\vec{k} = \vec{k}_p - \vec{k}_s - \vec{k}_c$ dont la norme est $\Delta k = \frac{1}{c}(n_s\omega_s + n_c\omega_c - n_p\omega_p)$. Cette grandeur physique intervient dans la formule du gain :

$$G^2 = \frac{\omega_s \omega_c c^4}{n_s^2 n_c^2} K^2 \varepsilon_p^2 \frac{\left(\sin\left(\Delta k \frac{l}{2} \right) \right)^2}{\left(\Delta k \frac{l}{2} \right)^2}$$

où l est la longueur du cristal, c la vitesse de la lumière dans le vide, ε_p l'amplitude du champ électrique du faisceau de pompe et K un facteur dépendant de la susceptibilité non-linéaire du second ordre du cristal.

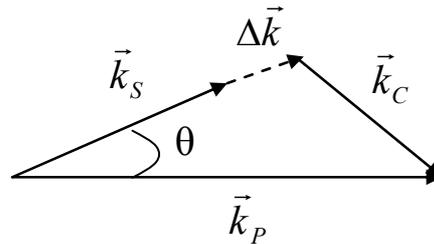


Figure 14 : schéma des trois vecteurs d'onde des photons de pompe (P), du signal (S) et du complémentaire (C) illustrant le désaccord de phase.

Pour maximiser le gain, il faut donc compenser la différence de vitesse de groupe en annulant le désaccord de phase Δk . On peut le faire grâce à l'utilisation de cristaux biréfringents dans lesquels il est possible d'ajuster la valeur de l'indice optique d'un faisceau par son angle d'incidence dans le cristal et sa polarisation. Il existe dans le cristal une direction de polarisation linéaire de la lumière suivant laquelle l'indice optique ne varie pas en fonction de l'angle d'incidence. Cette direction est dite « axe ordinaire ». Par contre, la même lumière polarisée perpendiculairement à cette dernière verra son indice optique dépendre de l'angle et on parlera alors d'« axe extraordinaire ». Il s'agira ensuite de choisir convenablement les polarisations des faisceaux et l'angle de coupe du cristal de manière à ce que l'accord de phase soit possible pour la gamme de longueur d'onde désirée. Concrètement il est nécessaire de fixer le cristal sur une monture de rotation afin de pouvoir le pencher par rapport à l'axe du faisceau de pompe. D'autre part, il faut, bien sûr, veiller à ce que les trains d'ondes puissent interagir en les superposant spatialement et temporellement dans le cristal. Pour cette raison il est préférable que les trois vecteurs d'onde soient colinéaires (θ nul sur la Figure 14), on parle alors d'accord de phase colinéaire.

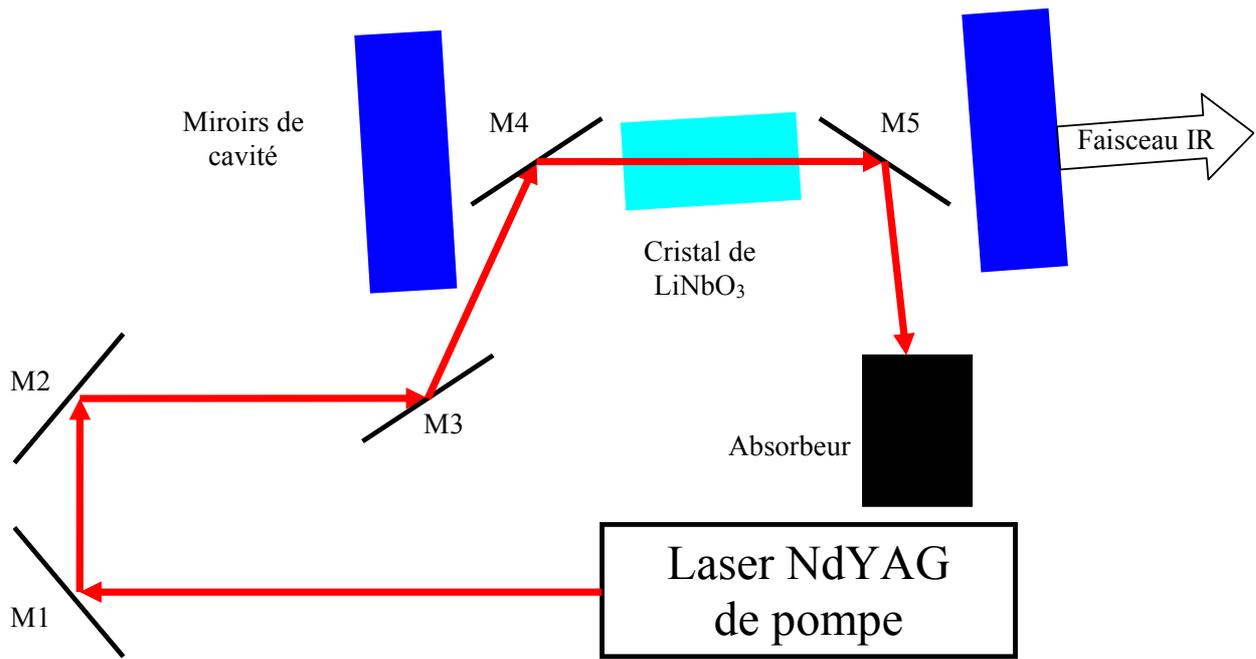


Figure 15 : schéma de l'OPO large bande réalisé au laboratoire. Le trajet du faisceau de pompe est représenté par des flèches rouges.

Il existe toute une gamme de couples de fréquences ω_S , et ω_C qui satisfont la conservation de l'énergie mais l'accordabilité finale de notre OPO sera déterminée par la condition d'accord de phase. La position angulaire du cristal contrôle la longueur d'onde d'émission, typiquement comprise pour notre système (cristal de LiNbO₃) entre 2.5 et 4 μ m. Comme nous l'avons précisé auparavant, le gain maximal est obtenu pour $\Delta k = 0$, c'est à dire que pour une pulsation désirée ω_C nous devons choisir une valeur de l'indice optique en ajustant la position du cristal. Cependant des photons avec des valeurs de ω_S et ω_C légèrement différentes sont produits par le même processus non linéaire et ce avec suffisamment de gain pour que ce mode fréquentiel subsiste dans la cavité. On observe donc un élargissement spectral du faisceau de sortie (le complémentaire en l'occurrence). En d'autres termes pour une position du cristal fixée, il existe une distribution en pulsation pour laquelle désaccord de phase n'est pas trop grand et conduit à un gain suffisant. Par analogie et toujours pour une position du cristal donnée, il existe une distribution en angle des photons générés en ω_C pour laquelle le gain est également suffisant. On obtient donc un cône d'émission faisant un angle d'environ 5 mrad avec la direction du faisceau de pompe. La largeur spectrale est déterminée par les propriétés du faisceau de pompe, les propriétés du cristal et l'angle d'incidence du faisceau de pompe par rapport à la direction du cristal. L'auteur de la référence ⁶³ parle d'une largeur de 130 cm⁻¹ pour un angle de 47 °.

Ces performances en termes de largeur sont assez médiocres aux vues des spécifications des OPO commerciaux actuels mais il faut se rappeler que les bandes d'absorption dans un liquide sont très larges. Et dans ce cas il est préférable que le spectre du laser soit comparable à celle-ci afin d'accroître la probabilité d'absorption. D'autre part, l'affinage spectral d'un laser nécessite souvent un montage plus compliqué, et qui sera donc moins compact et moins stable.

- ***Étalonnage de la longueur d'onde du laser OPO***

Il est toujours difficile de réaliser des mesures de longueur d'onde dans les domaines de l'infrarouge moyen. Nous avons alors imaginé une expérience simple pour estimer la longueur d'onde du maximum d'émission du laser large bande : une cuve d'absorption remplie du même solvant, soit de DMSO, on pourra ainsi l'étalonner avec le laser OPO accordable, puis centrer l'émission du laser large bande, sur le maximum d'absorption du solvant. Si l'on considère que le rayonnement est absorbé dans le liquide selon la loi de Beer-Lambert, on a :

$$I = I_0 \exp(-\epsilon l)$$

avec I_0 et I l'intensité du faisceau avant et après la cuve, ϵ le coefficient d'absorption du DMSO et l la longueur de la cuve. Comme $\epsilon = 7,7 \cdot 10^4 \text{ m}^{-1}$, la moitié de l'intensité sera perdue au bout d'environ $9 \text{ }\mu\text{m}$, ce qui est une épaisseur de DMSO beaucoup trop faible pour que l'on puisse construire une cuve au laboratoire. De plus, la dissipation thermique sera faible avec un risque de pyrolyse des molécules et de dépôt sur les parois de la cuve. Cette manière d'étalonner notre laser n'est donc malheureusement pas aisément réalisable.

Une autre façon de connaître la position du maximum d'émission du cristal est d'injecter celui-ci avec une impulsion venant d'un autre laser de longueur d'onde connue. En effet, lorsqu'on injecte une autre impulsion d'une fréquence incluse dans la bande de gain, superposée spatialement et temporellement au faisceau de pompe dans le cristal, on privilégie l'amplification de lumière à cette longueur d'onde, et on a alors une résolution de l'ordre de la largeur intrinsèque du laser d'injection. Ceci est donc une solution possible, bien que complexe, pour savoir quelle est la longueur d'onde du maximum de la bande large : on règle l'OPO en large bande pour avoir un maximum d'intensité, puis on injecte le cristal avec une impulsion fine, et on balaye la position du cristal jusqu'à trouver une amplification. Cette impulsion fine est créée par un autre laser OPO conçu par l'équipe il y a quelques années pour la spectroscopie IR d'anions dipolaires, et qui servira à mesurer le spectre IR des espèces

désorbées des micro-gouttelettes. Sa résolution est de l'ordre de 1 cm^{-1} et son schéma de principe est présenté dans la Figure 16. Deux cristaux de LiNbO_3 sont nécessaires : le premier sert à générer la lumière de longueur d'onde utile pour la spectroscopie IR à partir de la différence de fréquence (DFM) entre le faisceau vert fondamental à 532 nm d'un laser Nd:YAG (5 mJ) et la lumière rouge accordable entre 620 et 670 nm créée par un laser à colorant (5 mJ). On obtient ainsi un faisceau de quelques dizaines de microjoules dont la longueur d'onde est accordable entre $2,5$ et $3,7 \text{ }\mu\text{m}$. Celui-ci traverse ensuite un autre cristal de LiNbO_3 encadré par deux miroirs de cavité : c'est au sein de ce cristal que l'effet d'amplification se produit, par conversion non-linéaire entre la seconde harmonique à $1,064 \text{ }\mu\text{m}$ du même laser Nd:YAG (faisceau de pompe) et le faisceau injecté. Celui-ci va en quelque sorte « forcer » le processus de différence de fréquence à générer sa longueur d'onde. La cavité doit nécessairement être transparente au faisceau injecté et donc être résonante pour le signal, c'est-à-dire aux photons de fréquence $\nu \in \left[\frac{c}{1,064} - \frac{c}{2,5}, \frac{c}{1,064} - \frac{c}{3,7} \right]$, aussi les miroirs sont réfléchissants à 97 % entre $1,5$ et $1,9 \text{ }\mu\text{m}$, et transparents entre $2,5$ et $3,7 \text{ }\mu\text{m}$. Les faisceaux dans les cristaux sont superposés spatialement et temporellement. Le faisceau de pompe fait un seul passage dans le cristal, possède une énergie de 110 mJ , et nous obtenons jusqu'à 10 mJ de signal accordable entre $2,5$ et $3,7 \text{ }\mu\text{m}$. La résolution et la durée de l'impulsion laser sont limitées par celles des faisceaux de pompe, qui se situent autour de 1 cm^{-1} et 6 ns .

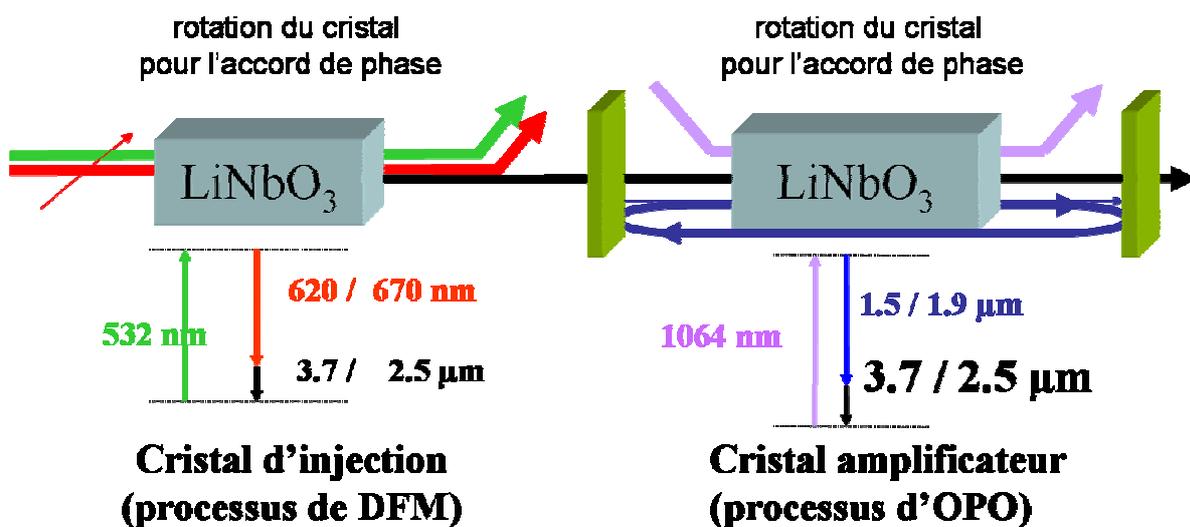


Figure 16 : principe de fonctionnement du laser OPO haute résolution. Cette figure est tirée de la thèse de J. C. Gillet (Université Paris 13, 2008).

- ***Tests du laser large bande***

Les avantages d'un tel laser par rapport à un OPO ayant une résolution de l'ordre du cm^{-1} sont multiples : d'abord, il est très compact car on a un seul laser de pompe et un seul cristal, le tout tenant dans une boîte de dimensions 30x40x10cm (si l'on exclut l'alimentation du laser de pompe). Cette condition est indispensable car le faisceau qui sort de l'OPO diverge, il faut donc le refocaliser sur les gouttelettes, et pour limiter la taille de la lentille utilisée on doit placer le laser OPO le plus près possible de l'enceinte expérimentale. Ensuite, cette compacité entraîne une limitation des risques de désalignement, donc un gain en stabilité. De plus, dans un laser à bande étroite, l'accord de phase est plus fin, et donc beaucoup plus sensible aux variations de conditions expérimentales que pour un OPO à large bande. Une troisième cause de stabilité est le fait que même si la longueur d'onde du maximum d'énergie de cette bande varie un peu lors de l'utilisation du laser, la bande d'absorption du DMSO à $3,3 \mu\text{m}$ sera toujours contenue dans la large bande.

Les principaux objectifs de la réalisation de cet OPO sont avant tout d'obtenir une énergie suffisante au niveau de la zone de désorption et de garantir une stabilité correcte, non seulement pour des impulsions successives mais aussi au bout de quelques heures de fonctionnement. Or il apparaît que les profils spatiaux des lasers OPO nanosecondes sont loin d'être gaussiens : ceci est connu pour être un défaut notable de ce genre de source. Ainsi on cherchera, autant que possible, à obtenir une distribution d'énergie homogène en sortie afin de pouvoir le focaliser sans « points chauds ». Outre le risque d'endommager le cristal et les traitements diélectriques des miroirs, si on concentre l'énergie sur une surface comparable à celle de la goutte, alors la moindre instabilité (pointé du laser, déclenchement du générateur de gouttelettes, vitesse de la goutte, etc...) provoquera une forte instabilité du nombre d'ions désorbés. En régime impulsionnel nanoseconde et sur des cavité instables, améliorer le profil spatial est synonyme de perte d'énergie, nous avons donc jusqu'à présent surtout optimisé la focalisation du faisceau. Les lentilles doivent être parfaitement centrées sur l'axe optique et les focales, limitées à quelques centimètres pour minimiser la tache de focalisation. Il faut alors diminuer la distance de propagation et la divergence du faisceau. Etant donné la taille du laser, nous avons pu le fixer sur le châssis de la chambre à vide à proximité du hublot, la distance entre la sortie du laser et la zone d'interaction étant inférieure à 40 cm. En ce qui concerne la divergence de l'OPO, le seul paramètre accessible est la divergence du faisceau de pompe. Il convient alors d'avoir un faisceau parfaitement parallèle.

Le faisceau doit, avant de rencontrer le cristal, parcourir un chemin optique suffisant pour éviter que les réflexions sur les faces de celui-ci ne puissent rentrer à nouveau dans le laser. En effet, cela peut entraîner la détérioration du laser de pompe, on incline donc légèrement le cristal pour voir les réflexions sur le côté de l'orifice de sortie du laser de pompe. Les miroirs M1, M2 et M3 sont traités pour réfléchir la lumière à $1,06 \mu\text{m}$ avec des pertes de moins de 5 %. Les miroirs de cavités ont un coefficient de réflexion de 97 % pour les longueurs d'onde comprises entre $1,5$ et $1,9 \mu\text{m}$, mais sont transparents autour de $3 \mu\text{m}$. Une autre contrainte dans la construction de ce laser était imposée par le seuil de dommage du cristal ($1,5 \text{ GW}\cdot\text{cm}^{-2}$ sur 10 ns , le laser de pompe délivrant des impulsions de 4 ns), nous avons donc inséré un télescope formé d'une lentille divergente L_1 de focale -50 mm suivie d'une convergente L_2 de focale 100 mm entre les miroirs M2 et M3. Le parcours des rayons issus du laser de pompe est tracé dans la Figure 17. La distance O_1-O_2 est de 50 mm pour permettre aux foyers objet de la lentille convergente et image de la divergente d'être confondus.

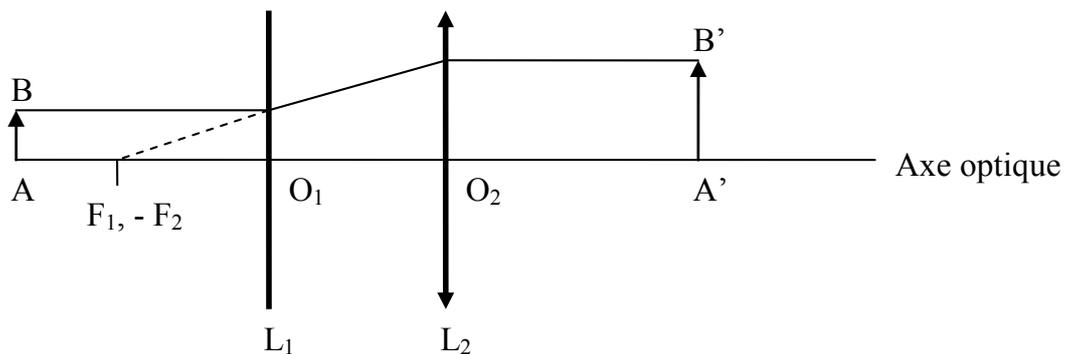


Figure 17 : schéma du chemin optique parcouru dans le télescope par un rayon provenant d'un objet AB situé à l'infini.

On a alors un faisceau d'un diamètre deux fois plus grand ($A'B' = 2AB$), et l'énergie du laser de pompe peut être augmentée, sans toutefois jamais dépasser $700 \text{ MW}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour prévenir le risque de « points chauds », c'est-à-dire de régions très inférieures au diamètre du faisceau où la puissance dépasse de beaucoup la puissance moyenne. Nous avons testé les performances de ce laser large bande en terme de stabilité, puissance moyenne, et divergence. Les résultats sont très encourageants, le montage réalisé étant très robuste et restant stable au niveau de l'alignement pendant plusieurs semaines. L'énergie maximale obtenue a été de 1

mJ, pour une énergie du laser de pompe de 45 mJ, la divergence étant de l'ordre de 0,03 rad, ce qui est une faiblesse commune à tous les laser OPO et qui oblige à focaliser le faisceau le plus près possible de la sortie du cristal. Nous avons réduit cette distance à 30 cm. Nous avons également réussi à faire exploser les gouttelettes de DMSO, avec un seuil d'énergie aussi faible que 0,3 mJ.

e) Interaction entre gouttelettes et jet supersonique

Le couplage des gouttelettes avec le jet supersonique a également été testé. En effet, le comportement d'une gouttelette en interaction avec la bouteille de Mach n'est pas connu et difficilement prédictible : celle-ci va-t-elle empêcher la gouttelette de pénétrer au coeur du jet? J'ai donc fait des essais en produisant des gouttelettes à la fréquence de 10 Hz et en synchronisant la diode stroboscopique avec l'ouverture de la vanne. De l'argon était envoyé en amont de celle-ci à une pression de 2 bar, la vanne s'ouvrant sur une durée de 30 μ s. Un écran permet de visualiser la sortie de la vanne ainsi que la gouttelette, des observations sont donc aisément faisables:

- Les gouttes sont déviées par le jet d'environ 10 diamètres de gouttelette dans la direction de celui-ci au niveau du trou de la vanne, et ralenties dans leur direction de propagation. Un simple modèle de friction visqueuse permet d'en rendre compte. La force exercée par les atomes de gaz sur la gouttelette est donnée par la relation suivante :

$$F = 6\pi\eta vr$$

avec η la viscosité dynamique de l'argon à température ambiante, v la vitesse des atomes du jet par rapport à la goutte, et r le rayon de celle-ci. Il faut prendre la viscosité à température ambiante car la température n'est basse que dans le référentiel des atomes du jet, pas dans celui de la goutte. Pour l'argon à 25 °C et 1 bar, on a $\eta = 2,25 \cdot 10^{-5} \text{ kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le rayon de la goutte est d'environ 25 μ m. Pour déterminer la vitesse des atomes de gaz, il faut appliquer la formule suivante, si l'on se situe dans l'approximation des gaz parfaits :

$$v = \left(\frac{2\gamma}{\gamma-1} \frac{RT}{M} (1-\eta) \right)^{\frac{1}{2}}$$

avec $\gamma = \frac{C_p}{C_v} = \frac{5}{3}$ pour un gaz monoatomique, R la constante des gaz parfaits, T la température et M la masse du gaz, soit $4 \cdot 10^{-2} \text{ kg.mol}^{-1}$ pour l'argon. Comme la viscosité est

petite devant 1, on peut la négliger et on a alors :

$$v = \left(\frac{2 \times \frac{5}{3} \cdot 8,31 \times 298}{\frac{5}{3} - 1 \cdot 0,04} \right)^{\frac{1}{2}} = 556 \text{ m.s}^{-1}$$

d'où

$$F = 6 \times 3,14 \times 2,25 \cdot 10^{-5} \times 556 \times 2,5 \cdot 10^{-5} = 5,9 \cdot 10^{-6} \text{ N}$$

On peut alors en déduire l'accélération subie par la goutte, en calculant sa masse m :

$$m = \frac{4}{3} \pi \rho_{DMSO} r^3 = \frac{4}{3} \times 3,14 \times 1095,5 \times (2,25 \cdot 10^{-5})^3 = 52 \text{ ng}$$

$$a = \frac{F}{m} = \frac{5,9 \cdot 10^{-6}}{5,2 \cdot 10^{-11}} = 1,13 \cdot 10^5 \text{ m.s}^{-2}$$

Comme l'accélération est supposée constante, la trajectoire est parabolique et le déplacement est donné par :

$$d = \frac{1}{2} a t^2$$

Il faut estimer le temps de parcours de la goutte à travers le jet : j'ai observé que les gouttes sont déviées à partir d'une distance d'environ 2 mm du trou de la vanne (selon l'axe de propagation de la goutte), et j'ai mesuré à l'aide de la diode stroboscopique qu'elle mettait 100 μ s à parcourir cette distance. On obtient donc :

$$d = \frac{1}{2} \times 1,13 \cdot 10^5 \times (10^{-4})^2 = 0,56 \text{ mm}$$

- Les gouttes traversent le jet en restant nettes à l'écran, or la mise au point est sensible à des déplacements de l'ordre de quelques millimètres dans la direction de visée de la caméra, elles ne sont donc probablement pas déviées de manière notable.

Ces observations sont encourageantes, il faut cependant que les gouttelettes arrivent au plus près de la vanne si l'on veut que les molécules à étudier soient suffisamment refroidies. En effet, les collisions à trois corps qui sont responsables du processus de refroidissement sont les plus fréquentes au centre du jet et à une distance r de l'orifice de la vanne (de diamètre d) de l'ordre de $r = 10d$ ⁶⁴. Dans notre cas, la vanne Even possède un trou de 100 μ m de diamètre, il faut donc dans l'idéal que les gouttes passent à 1 mm de celui-ci. Or un cône de 2

mm de long se trouve déjà devant l'orifice, il faut donc trouver un moyen de raser la surface de la vanne avec les gouttelettes, et pour cela on doit les protéger jusqu'au centre du jet pour éviter qu'elles soient déviées, sans pour autant trop perturber le jet. La solution retenue est de fixer une pièce en aluminium de 500 μm d'épaisseur sur la vanne. Le dessin de cette pièce est donné dans la Figure 18. Les essais réalisés avec cette pièce sont concluants, dans le sens où les gouttelettes ne sont pas déviées dans la direction du jet jusqu'à arriver en face de l'orifice de la vanne.

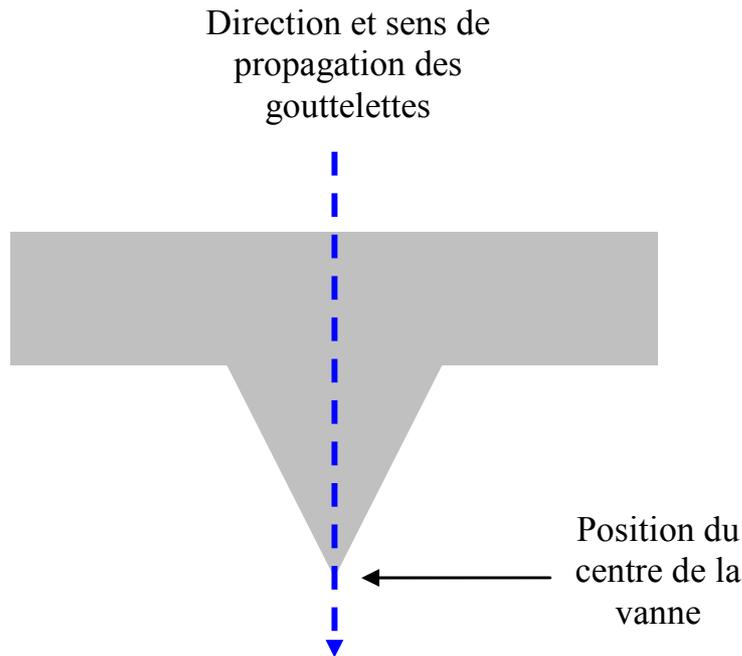


Figure 18 : dessin de l'écran (vu de face) destiné à protéger les gouttelettes jusqu'au centre du jet supersonique.

f) Montage des détecteurs et du spectromètre de masse

Nous avons choisi de monter un spectromètre de masse à temps de vol au sein du laboratoire. De type Wiley-Mc Laren, il est placé orthogonalement à la direction du jet supersonique. Il est composé de trois lentilles électrostatiques pour l'accélération des ions, de deux plaques déviateuses afin de compenser la composante de la vitesse des ions dans la direction du jet, et de deux lentilles Einzel pour focaliser les ions. Un réflectron est également prévu, composé de 10 plaques rectangulaires ayant des grilles très fines en nickel créant un champ homogène destiné à réfléchir les ions afin d'améliorer la résolution en masse. Ce réflectron est incliné de 3 ° par rapport à l'axe entre celui-ci et le TOF-MS. Des simulations que j'ai effectuées à l'aide du logiciel Simion ont permis de déterminer les potentiels typiques

à appliquer à chacune des plaques. La Figure 19 montre une image tirée du logiciel et les valeurs des potentiels pour des ions positifs sont notées dans la Figure 20.

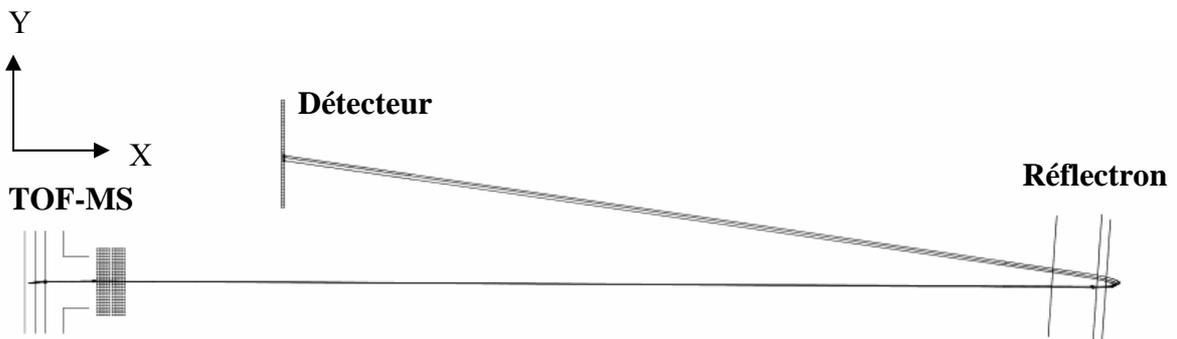


Figure 19 : image du montage final du spectromètre de masse à temps de vol et du réflectron tel qu'il apparaît dans l'interface graphique du logiciel Simion. La trace des ions permet de visualiser leur parcours jusqu'au détecteur. La mauvaise qualité de l'affichage ne permet pas de voir toutes les plaques du réflectron, elles sont visibles dans la Figure 21.

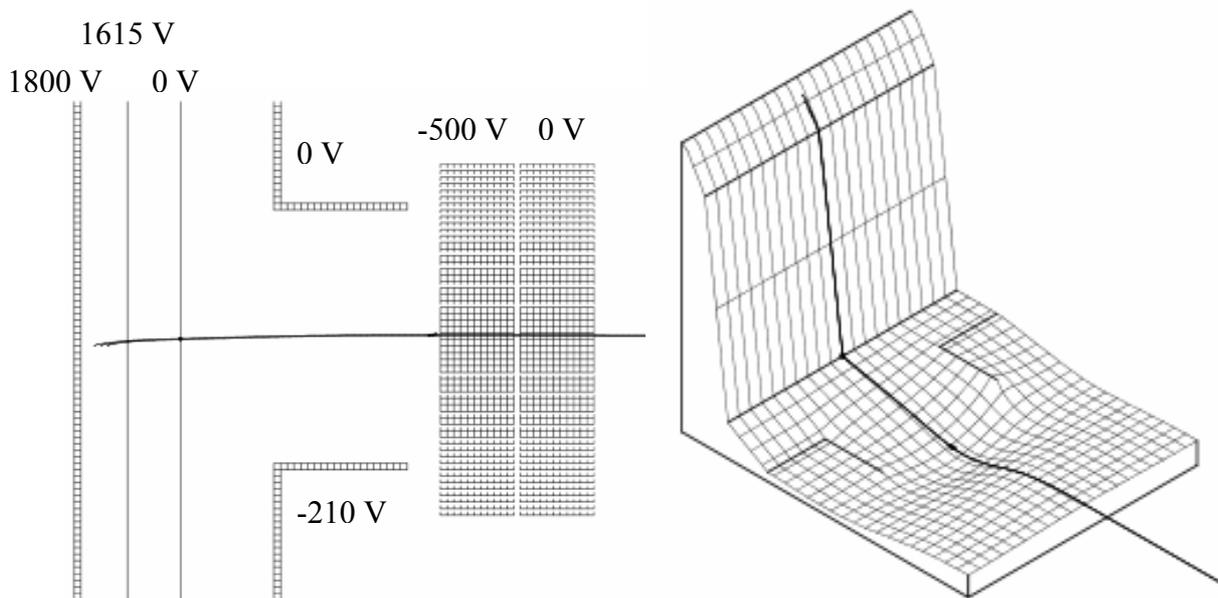


Figure 20 : à gauche, agrandissement du spectromètre Wiley-Mc Laren de la Figure 19 ; à droite, vue de la surface d'énergie potentielle créée par les champs électriques entre les plaques de ce spectromètre.

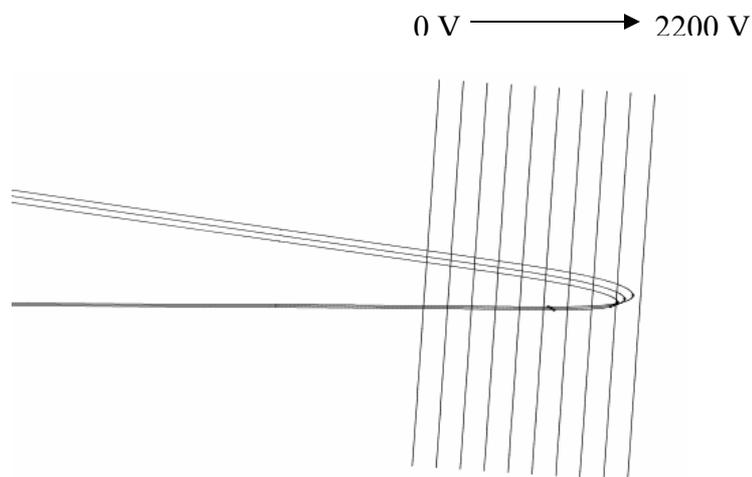


Figure 21 : agrandissement du réflectron de la Figure 19.

Le but de ce montage est de séparer les ions de masses différentes et de regrouper ceux qui ont la même masse le mieux possible. Après l'explosion d'une gouttelette par une impulsion laser IR, les ions sont entraînés dans le jet supersonique, mais aucun champ ne les influence, ils ont donc la vitesse des atomes du gaz rare lorsqu'ils arrivent entre les deux premières plaques du spectromètre Wiley-Mc Laren. La distribution en vitesse des atomes dans un jet supersonique est de l'ordre de 1 %, or j'ai calculé la vitesse moyenne des atomes d'argon au paragraphe e), on a donc une vitesse de $556 \pm 6 \text{ m.s}^{-1}$. Voyons quelle différence d'énergie cinétique cela donne pour un ion de masse 3000 g.mol^{-1} . Calculons d'abord son énergie cinétique si l'on admet qu'il a une vitesse de 556 m.s^{-1} :

$$EC = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{3 \times 556^2}{2 \times 6,02 \cdot 10^{23}} \approx 2,6 \cdot 10^{-19} \text{ J} = 1,6 \text{ eV}$$

La dispersion en énergie cinétique est donc de : $\Delta EC = 5,6 \cdot 10^{-4} \text{ eV}$. On peut par conséquent admettre que les ions arrivent tous avec la même énergie cinétique dans le spectromètre, de l'ordre de 1,6 eV, dans la direction perpendiculaire aux champs d'extraction. Cette valeur est négligeable par rapport à la différence de potentiels de 1800 V entre la première et la troisième plaque, mais des plaques déviatrices sont tout de même requises pour guider les ions au milieu du réflectron. Le but de ce dernier est de focaliser temporellement des ions ayant la même masse mais pas la même énergie cinétique en entrant dans le réflectron. Cela peut arriver lorsque ces ions ne sont pas à la même position dans le spectromètre, selon l'axe entre le spectromètre et le réflectron. Ils ne reçoivent pas la même accélération, et donc pas la même énergie cinétique. Si l'on prend comme exemple deux ions distants d'1 mm dans un

champ de $1,6 \cdot 10^5$ V/m, ce qui correspond à deux plaques distantes d'1 cm et avec une DDP = 1600 V, on aura une différence d'énergie cinétique de 160 V entre les deux ions. Le spectromètre et le réflectron sont distants d'environ 1 m, alors que le détecteur est à 80 cm du réflectron. On peut, à partir des équations du mouvement de Newton, calculer le temps mis par chaque ion pour parcourir le chemin jusqu'au détecteur, avec et sans le réflectron. Pour des ions de masse 3000 g.mol^{-1} chargés une fois, la différence de temps est de $6,6 \mu\text{s}$ avec le réflectron, alors que sans cette différence monte à $17,4 \mu\text{s}$.

Le but de notre montage est, *in fine*, d'étudier des espèces neutres ou ioniques par spectroscopie IR. Dans le cas des espèces ioniques, elles seront déjà formées en solution et c'est dans le réflectron que le laser IR sera envoyé. On doit donc régler les paramètres du spectromètre de façon à focaliser spatialement et temporellement les ions au fond du réflectron. Les simulations à l'aide du logiciel Simion montrent que pour les réglages de la Figure 20 et de la Figure 21, 5 ions séparés par une distance de 2 mm dans la direction Y (normale à l'axe TOF-MS/réflectron) et 1 mm dans la direction X ont une extension spatiale de $\Delta X = 4 \text{ mm}$ et $\Delta Y = 2,5 \text{ mm}$, et arrivent dans un intervalle de temps de 63 ns.

g) Sélection en masse et spectroscopie IR

De nombreux ions différents seront sans doute formés par désorption laser sur les microgouttelettes, nous serons donc contraints de sélectionner ceux que nous voulons étudier par spectroscopie IR. Nous avons choisi d'éliminer tous les ions ayant un rapport $\frac{m}{q}$ différent de ceux-ci en plaçant un champ électrique créé par deux plaques métalliques disposées parallèlement à la direction de propagation des ions (*cf.* Figure 9), et ce juste avant le réflectron. Ce champ déviara les ions en continu, et sera mis à zéro lors du passage des ions à étudier. Cela leur permettra continuer leur chemin jusqu'au réflectron et d'être détectés par les galettes à micro-canaux.

La spectroscopie IR nécessite d'envoyer le laser d'analyse sur les ions sélectionnés en masse, donc après leur passage entre les plaques de déviation décrites précédemment. Cependant, l'endroit exact où l'on irradie ceux-ci a une importance : avant le réflectron, les ions ont une vitesse élevée, de l'ordre de 1400 m.s^{-1} (pour un ion de $\frac{m}{q}=1000$), mais ils sont regroupés sous forme de paquet. L'avantage est alors le bon recouvrement entre laser et ions, qui optimise le nombre d'ions irradiés, mais le temps d'interaction est de quelques centaines

de nanosecondes. On peut également détecter les espèces neutres issues de la fragmentation avec le premier détecteur, ce qui peut permettre d'obtenir des informations sur la fragmentation ⁶⁵. Si les ions sont irradiés au fond du réflectron, à l'endroit où ils font demi-tour, on aura un moins bon recouvrement avec le laser IR car ils sont dispersés par le champ mais ils sont beaucoup plus lents donc la durée d'interaction sera plus grande.

La détection de l'absorption IR des ions moléculaires d'intérêt biologique ne peut pas être réalisée par fragmentation de l'ion lui-même car la densité de photons du laser OPO est trop faible : nous utiliserons donc la technique dite du « messenger » ⁶⁶⁻⁶⁸. Le principe est le suivant : au sein du jet supersonique, un atome de gaz rare peut se fixer sur l'ion si les collisions à trois corps sont assez nombreuses, on détecte alors la masse du complexe avec le Re-TOF. L'énergie de liaison de l'atome de gaz rare est très faible, de l'ordre de l'énergie d'un photon IR, ce qui permet de détecter l'absorption de celui-ci par la perte de cet atome, et donc l'apparition d'un signal à la masse de l'ion seul. En balayant la longueur d'onde du laser IR, on peut alors obtenir un spectre d'absorption linéaire, contrairement au cas de l'IRMPD, détaillé dans le chapitre II. Le grand avantage de cette technique est que ce n'est pas une spectroscopie de dépopulation mais de fragmentation, c'est-à-dire que lorsque les ions n'absorbent pas le rayonnement IR, le signal est nul.

Dans le cas des complexes du type récepteur/ligand (comme les complexes vancomycine/Ac₂KAA étudiés dans le chapitre V de ce manuscrit), nous pourrions détecter l'absorption d'un ou plusieurs photons IR si l'énergie de liaison est suffisamment faible, mais pour les complexes très liés, la technique du messenger s'imposera.

- (1) Vestal, M. L. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 361.
- (2) Ivonov, N. I. Surface Ionization and Its Applications. In *Progress in Surface Science*; Pergamon, Ed. New-York, 1972; Vol. 1; pp 237.
- (3) Brown, R. C., R. D.; Elliott, R. M. *Advances in Mass Spectrometry*; Pergamon: New-York, 1963; Vol. 2.
- (4) Houk, R. S.; Fassel, V. A.; Flesch, G. D.; Svec, H. J.; Gray, A. L.; Taylor, C. E. *Analytical Chemistry* **1980**, *52*, 2283.
- (5) Nier, A. O. *Review of Scientific Instruments* **1947**, *18*, 398.
- (6) Fales, H. M.; Milne, G. W. A. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91*, 3682.
- (7) Horning, E. C.; Horning, M. G.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N. *Analytical Chemistry* **1973**, *45*, 936.
- (8) Covey, T. R.; Lee, E. D.; Bruins, A. P.; Henion, J. D. *Analytical Chemistry* **1986**, *58*, 1451A.
- (9) Sundqvist, R. D. M. *Mass Spectrometry Reviews* **1985**, *4*, 421.
- (10) Grade, H.; Winograd, N.; Cooks, R. G. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 7725.
- (11) Rinehart, K. L., Jr. *Science* **1982**, *218*, 254.
- (12) Chapman, S. *Physical Review* **1937**, *52*, 184 LP
- (13) Mann, M.; Meng, C. K.; Fenn, J. B. *Proceedings of 36th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* **1988**, 1207.
- (14) Schmelzeisen-Redeker, G.; Bütfering, L.; Röllgen, F. W. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1989**, *90*, 139.
- (15) Thomson, B. A.; Iribarne, J. V. *The Journal of Chemical Physics* **1979**, *71*, 4451.
- (16) Hogan, C. J.; Kettleton, E. M.; Ramaswami, B.; Chen, D.-R.; Biswas, P. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 844.
- (17) Chakraborty, T.; Holm, A. I. S.; Hvelplund, P.; Nielsen, S. B.; Pouilly, J. C.; Worm, E. S.; Williams, E. R. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 1675.
- (18) Yamaguchi, K. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38*, 473.
- (19) Nonose, S.; Iwaoka, S.; Mori, K.; Shibata, Y.; Fuke, K. *European Physical Journal D* **2005**, *34*, 315.
- (20) Conzemius, R. J.; Capellen, J. M. *International Journal or Mass Spectrometry and Ion Physics* **1980**, *34*, 197.
- (21) Karas, M.; Hillenkamp, F. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299.
- (22) Berkenkamp, C. M., Michael Karas, Franz Hillenkamp,. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1399.
- (23) Dreisewerd, K.; Schürenberg, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1995**, *141*, 127.
- (24) Puzos, A. A.; Geohegan, D. B.; Hurst, G. B.; Buchanan, M. V.; Luk'yanchuk, B. S. *Physical Review Letters* **1999**, *83*, 444 LP
- (25) Zhang, W.; Niu, S.; Chait, B. T. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 879.
- (26) Dreisewerd, K.; Berkenkamp, S.; Leisner, A.; Rohlfing, A.; Menzel, C. *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *226*, 189.
- (27) Zhou, W. E., K. G. Standing, A. Verentchikov, B. U. R. Sundqvist,. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1992**, *6*, 671.
- (28) Vestal, M. L.; Juhasz, P.; S. A. Martin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, *9*, 1044.
- (29) Czerwieniec, G. A.; Russell, S. C.; Lebrilla, C. B.; Coffee, K. R.; Riot, V.; Steele, P. T.; Frank, M.; Gard, E. E. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1866.
- (30) Faubel, M.; Kisters, T. *Nature* **1989**, *339*, 527.
- (31) Wattenberg, A.; Sobott, F.; Barth, H. D.; Brutschy, B. *European Mass Spectrometry* **1999**, *5*, 71.
- (32) Kondow, T.; Mafune, F. *Annual Review of Physical Chemistry* **2000**, *51*, 731.
- (33) Wilson, K. R.; Rude, B. S.; Smith, J.; Cappa, C.; Co, D. T.; Schaller, R. D.; Larsson, M.; Catalano, T.; Saykally, R. J. *Review of Scientific Instruments* **2004**, *75*, 725.
- (34) Horimoto, N.; Kohno, J.; Mafune, F.; Kondow, T. *Chemical Physics Letters* **2000**, *318*, 536.
- (35) Faubel, M.; Steiner, B.; Toennies, J. P. *The Journal of Chemical Physics* **1997**, *106*, 9013.
- (36) Kohno, J.-y.; Horimoto, N.; Mafune, F.; Kondow, T. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 15627.
- (37) Horimoto, N.; Mafune, F.; Kondow, T. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 9540.
- (38) Mafuné, F.; Kohno, J.-y.; Nagata, T.; Kondow, T. *Chemical Physics Letters* **1994**, *218*, 7.

- (39) Kohno, J. Y.; Mafune, F.; Kondow, T. *Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 243.
- (40) Sobott, F.; Wattenberg, A.; Kleinekofort, W.; Pfenninger, A.; Brutschy, B. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1998**, *360*, 745.
- (41) Toyama, N.; Kohno, J. Y.; Mafune, F.; Kondow, T. *Chemical Physics Letters* **2006**, *419*, 369.
- (42) Charvat, A.; Stasicki, B.; Abel, B. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 3297.
- (43) Sobott, F.; Kleinekofort, W.; Brutschy, B. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 3587.
- (44) Dessiaterik, Y.; Nguyen, T. V.; Baer, T.; Miller, R. E. *Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 11245.
- (45) Abel, B.; Charvat, A.; Diederichsen, U.; Faubel, M.; Girmann, B.; Niemeyer, J.; Zeeck, A. *International Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *243*, 177.
- (46) Kleinekofort, W.; Pfenninger, A.; Plomer, T.; Griesinger, C.; Brutschy, B. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1996**, *156*, 195.
- (47) Wattenberg, A.; Sobott, F.; Barth, H. D.; Brutschy, B. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *203*, 49.
- (48) Brutschy, B. *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 3891.
- (49) Grimm, R. L.; Beauchamp, J. L. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 14161.
- (50) Kohno, J.; Toyama, N.; Kondow, T. *Chemical Physics Letters* **2006**, *420*, 146.
- (51) Morgner, N.; Barth, H. D.; Brutschy, B. *Australian Journal of Chemistry* **2006**, *59*, 109.
- (52) Hoffmann, J.; Schmidt, T. L.; Heckel, A.; Brutschy, B. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23*, 2176.
- (53) Stearns, J. A.; Boyarkin, O. V.; Rizzo, T. R. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 13820.
- (54) Wallraff, P.; Yamada, K. M. T.; Winnewisser, G. *Journal of Molecular Spectroscopy* **1987**, *126*, 78.
- (55) Callegari, C.; Lehmann, K. K.; Scmied, R.; Scoles, G. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 10090.
- (56) Choi, M. Y.; Dong, F.; Miller, R. E. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2005**, *363*, 393.
- (57) Lindinger, A.; Toennies, J. P.; Vilesov, A. F. *Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 1429.
- (58) Stiles, P. L.; Nauta, K.; Miller, R. E. *Physical Review Letters* **2003**, *90*.
- (59) Chin, W. *Thèse de doctorat* **2006**, Université Paris 11, Orsay.
- (60) Schaaf, J. W.; Williams, D. *Journal of the Optical Society of America* **1973**, *63*, 726.
- (61) Pinkley, L. W.; Sethna, P. P.; Williams, D. *Journal of the Optical Society of America* **1977**, *67*, 494.
- (62) Zilch, L. W.; Maze, J. T.; Smith, J. W.; Jarrold, M. F. *International Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *283*, 191.
- (63) Shen, Y. R. **1984**.
- (64) Evans, D. A.; Wales, D. J.; Dian, B. C.; Zwier, T. S. *Journal of Chemical Physics* **2004**, *120*, 148.
- (65) Kang, H.; Dedonder-Lardeux, C.; Juvet, C.; Martrenchard, S.; Gregoire, G.; Desfrancois, C.; Schermann, J. P.; Barat, M.; Fayetteon, J. A. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 2628.
- (66) Robertson, W. H.; Kelley, J. A.; Johnson, M. A. *Review of Scientific Instruments* **2000**, *71*, 4431.
- (67) Okumura, M.; Yeh, L. I.; Myers, J. D.; Lee, Y. T. *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 3416.
- (68) Walker, N. R.; Walters, R. S.; Duncan, M. A. *New Journal of Chemistry* **2005**, *29*, 1495.

Chapitre VIII: Conclusions et perspectives

VIII.1 *Résultats obtenus*

Durant ces trois années, je me suis intéressé aux propriétés structurales et aux interactions inter et intramoléculaires au sein de systèmes covalents et non-covalents d'intérêt biologique et/ou pharmaceutique isolés, c'est à dire en phase gazeuse. Ce travail s'inscrit dans une dynamique qui a des buts multiples. Tout d'abord, il s'agit de mieux comprendre le comportement intrinsèque de ces systèmes à l'échelle moléculaire en l'absence de solvant, en maîtrisant parfaitement la stoechiométrie grâce à la spectrométrie de masse, et en ayant la possibilité de comparer les résultats expérimentaux de la spectroscopie IR avec des calculs de chimie quantiques poussés. Il est également intéressant de savoir si les structures des molécules importantes en biologie ou l'attachement d'un médicament sur un récepteur d'un organisme sont influencés par le solvant et plus généralement l'environnement extérieur. L'équipe s'est auparavant penchée sur des systèmes modèles relativement petits à l'échelle des molécules du vivant, et l'un des objectifs de ma thèse était d'étendre ces recherches vers des systèmes plus gros, et donc plus complexes mais aussi potentiellement plus intéressants.

Dans la lignée des activités de recherche de l'équipe AMIBES, ainsi que celles de divers collaborateurs, j'ai donc mené une étude structurale par spectroscopie IR et simulations sur le pentapeptide AGWLK protoné. Le but était de tester la faisabilité de l'approche et le degré d'information accessible lorsque la taille du système moléculaire augmente. Des logiciels de recherche de conformation et de chimie quantique m'ont permis de déterminer quelques familles de structures peuplées en phase gazeuse à 300 K, par comparaison avec les données expérimentales de spectroscopie IRMPD. Cependant, un classement exhaustif des conformations de plus basse énergie potentielle n'est pas réalisable à cause du trop grand nombre de degrés de liberté du système: le calcul précis de l'énergie pour des centaines voire des milliers de conformères est impossible. Toutefois, contrairement à des expériences à basse température, la quantité d'énergie interne à 300 K permet au système de passer au-dessus de petites barrières d'isomérisation et, de plus, elle augmente avec la taille du système. Parler de conformations figées n'a donc, en réalité, pas de sens. De plus, les conformères peuplés dans l'expérience ne sont pas forcément les plus bas en énergie, ce critère dans la recherche des familles de structures observées perd donc de sa pertinence par rapport au cas des petites molécules.

Afin d'orienter nos travaux vers des systèmes plus pertinents pour la biologie et la pharmacologie, j'ai testé la méthode de calcul QM/MM, connue dans le milieu de la physique moléculaire mais qui n'avait pas été appliquée à la simulation de spectres d'absorption IR des systèmes moléculaires isolés d'intérêt biologique ou pharmaceutique. Les résultats sont très encourageants, l'écart type des prédictions étant de l'ordre de 15 cm^{-1} au niveau B3LYP/6-31G(d):AM1 pour un gain de temps de calcul qui peut atteindre un ordre de grandeur. Cette méthode permet également de mener des calculs sur des systèmes trop gourmands en capacités de calcul pour les ordinateurs actuels, ou qui prendraient trop de temps avec une méthode « tout quantique ». La stratégie est alors de « diviser pour mieux simuler ».

Cet outil de calcul m'a permis de m'intéresser à un médicament, la vancomycine, et à son complexe non-covalent avec un modèle de son récepteur naturel dans l'organisme, que je désignerai par « récepteur » dans la suite. Plus précisément, le but était de caractériser les variations de structure en phase gazeuse induites par l'attachement du récepteur, ce qui n'a pas été observé à ce jour et à notre connaissance. Les conclusions sont multiples: d'abord, la technique d'électrospray permet de mettre en phase gazeuse des complexes intacts aussi bien en mode positif que négatif. Ensuite, la spectroscopie IRMPD donne des résultats parfaitement exploitables car les spectres ont des bandes aussi bien résolues que dans le cas des petits systèmes étudiés auparavant, comme les di et tripeptides. Nous avons ainsi pu les comparer aux simulations réalisées avec la méthode QM/MM, et avec l'aide d'une seconde technique expérimentale, la spectrométrie de mobilité ionique, nous avons proposé des familles de conformations compatibles avec les données concernant la vancomycine et son complexe protonés. Il ressort de manière assez claire qu'en mode positif le récepteur ne se trouve pas dans la poche de liaison de la vancomycine telle qu'elle existe en phase condensée. Par contre, nos conclusions sont opposées pour les complexes déprotonés: l'interaction intermoléculaire responsable de la grande constante d'affinité en solution est conservée en phase gazeuse. Or Heck *et al.* ont fait l'hypothèse que la protonation du récepteur induit une perte de cette interaction sans pour autant dissocier le complexe, à partir de mesures de dissociation par CID¹. Nous démontrons ainsi, grâce à la spectroscopie IR qui interroge directement la structure des molécules, la validité de ces conclusions, mais en allant plus loin et en proposant des familles de conformères qui sont très proches de celles révélées par cristallographie.

Les polypeptides adoptent dans l'organisme des structures secondaires, tertiaires et quaternaires qui sont souvent reliées à leur activité biologique. Il est intéressant de chercher à savoir si ces structures peuvent être conservées en l'absence d'environnement, nous nous

sommes donc penchés sur l'étude de divers brins de la protéine amyloïde β . Cette protéine est présente naturellement dans le cerveau humain, et un changement de sa structure secondaire est à l'origine de son agrégation et de son implication dans la maladie d'Alzheimer. Nous avons ici largement utilisé la spectrométrie de mobilité ionique, car les spectres de ces brins sont difficiles à simuler. Nous avons ainsi pu montrer que les divers états de protonation du brin le plus long, qui contient 28 acides aminés, sont plutôt repliés et n'adoptent pas de structure secondaire spécifique, de la même manière qu'en solution aqueuse. Un résultat intéressant est que le solvant avec lequel est dissoute la molécule détermine sa structure secondaire en phase gazeuse: dans le cas d'une solution de faible constante diélectrique (TFE/MeOH), les signatures spectrales changent et sont alors cohérentes avec la présence de familles de conformations ayant une structure secondaire proche d'une hélice α . A notre connaissance, ce genre d'effet n'a pas été l'objet d'un grand nombre de travaux à ce jour, mais il serait intéressant de l'étudier de manière systématique par électrospray, et surtout à l'aide de la source à désorption laser sur micro-gouttelettes que nous avons commencé à monter au laboratoire. En effet, nous avons choisi cette technique de mise en phase gazeuse car elle perturbe très peu la structure native des protéines².

La spectroscopie IRMPD est une technique puissante et quasiment universelle en termes de systèmes moléculaires, et nous l'avons utilisée uniquement sur des ions à température ambiante. Cela a l'avantage d'être des conditions proches de celles rencontrées dans l'organisme, mais au prix d'une dégradation de la résolution et d'une grande diversité conformationnelle. Nous tentons de minimiser ces inconvénients dans le nouveau montage expérimental de l'équipe. Nous avons, au cours de ma thèse, mis au point la source de désorption par laser IR, construit l'enceinte expérimentale, et monté le spectromètre à temps de vol.

VIII.2 Perspectives

Cette nouvelle source d'espèces moléculaires refroidies devra, dans un futur proche, être caractérisée en termes de signal d'ions et de refroidissement d'ions au début, puis de systèmes neutres. Les performances du spectromètre de masse à temps de vol doivent être testées sur des systèmes connus, avant que les études de spectroscopie puissent commencer. Là encore, les premiers ions étudiés seront des « cas d'école », qui ont des transitions bien séparées et intenses autour de 3300 cm^{-1} , comme la dialanine protonée. Si le refroidissement est assez efficace pour attacher un ou plusieurs atomes d'argon à l'ion en question, la technique du messenger pourra s'appliquer. Sinon, il faudra travailler sur des complexes non-

covalents dont l'énergie de liaison est assez faible pour qu'un ou deux photons IR puissent les dissocier.

Le nouveau montage expérimental permettra également d'ajouter un laser UV afin de faire de la spectroscopie UV/IR d'une façon similaire à la technique décrite dans le chapitre II de ce manuscrit. Le grand avantage serait d'utiliser des espèces neutres et de les sélectionner en conformères. En effet, elles sont plus pertinentes d'un point de vue biologique car leurs structures ne sont pas influencées par les fortes interactions électrostatiques induites par les protonations et déprotonations.

L'acquisition récente d'une grappe de PC dédiée aux simulations de chimie quantique a permis à l'équipe d'accroître considérablement sa capacité de calcul. Les spectres IR de systèmes contenant de l'ordre de 500 atomes, comme le brin d'amyloïde β 1-28, devraient pouvoir être simulés avec la méthode ONIOM ou d'autres comme la RI-DFT ou la DFT-B, mais en un temps de l'ordre de deux ou trois semaines par calcul. Ceci devient trop long pour des études comme l'équipe a l'habitude d'en faire, surtout étant donné le nombre de conformères possibles, même à basse température. Il faut alors réduire au maximum le nombre de calculs de ce type, et donc augmenter l'efficacité et la quantité d'information tirée de ceux-ci en acquérant le plus possible de connaissances sur le système étudié, c'est-à-dire en recueillant des données de la littérature ou de techniques expérimentales complémentaires comme la spectrométrie de mobilité ionique.

Se pose également la question de la pertinence de la recherche de conformations sur les gros systèmes de ce type: la surface d'énergie potentielle devient de plus en plus difficile à sonder de manière exhaustive lorsqu'on augmente le nombre de degrés de liberté, et le temps demandé à une recherche systématique par variation des angles de torsion augmente très rapidement. Celle-ci devient donc impraticable et devra être remplacée. Certaines méthodes récentes comme la dynamique moléculaire par échange de réplique (REMD) ou la recherche par exploration des modes de basse fréquence peuvent être intéressantes et semblent être efficaces même pour des protéines entières^{3,4}. Le programme de REMD utilisé dans ma thèse est donc potentiellement un outil de choix pour l'exploration conformationnelle des gros systèmes.

La méthode et les objectifs de l'équipe changent donc: on ne cherche plus les quelques conformations très précises peuplées à 300 K dans notre expérience, puisque l'on sait qu'elles sont très nombreuses et s'échangent continuellement. On accepte de perdre en précision pour gagner sur la taille de système et donc sur l'intérêt biologique et pharmaceutique; nous pouvons comparer les spectres expérimentaux à des simulations sur des modèles (provenant

de données expérimentales, de recherches par REMD ou construits à la main) qui permettront de déterminer des signatures de familles de structures particulières en phase gazeuse. Ces simulations seront de moins en moins nécessaires car ces signatures expérimentales devraient être semblables. Dans le cas de complexes, nous pouvons trouver le site de liaison, décrire les changements de structure dus à la complexation, et déterminer précisément les groupements engagés dans la fixation, comme par exemple le carboxylate dans la vancomycine déprotonée. Ceci nécessite néanmoins une connaissance structurale minimum du système, qui pourra être trouvée dans la récente PDBbind (<http://www.pdbbind.org.cn>), base de données sur les complexes d'intérêt biologique où plus de 4000 fichiers de structure peuvent déjà être trouvés.

- (1) Heck, A. J. R.; Jorgensen, T. J. D. *International Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 236, 11.
- (2) Morgner, N.; Kleinschroth, T.; Barth, H.-D.; Ludwig, B.; Brutschy, B. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, 18, 1429.
- (3) Nanas, M.; Chinchio, M.; Oldziej, S.; Czaplewski, C.; Scheraga, H. A. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, 26, 1472.
- (4) Kolossváry, I.; Keserü, G. M. *Journal of Computational Chemistry* **2001**, 22, 21.

Annexe 1: Liste des conformères utilisés pour le calcul des facteurs d'échelle spécifiques avec la méthode ONIOM

- *Pour le calcul des facteurs d'échelle, les conformères suivants ont été utilisés :*

Tryptophane: 1 conformère ¹

Phénylalanine: 4 conformères ²

Ac-F-NH₂ (2 conformères), **Ac-FA-NH₂** (1 conformère), **Ac-AF-NH₂** (1 conformère), **Ac-GF-NH₂** (2 conformères), **Ac-FG-NH₂** (2 conformères), **Ac-PF-NH₂** (1 conformère), **Ac-FP-NH₂** (1 conformère), **Ac-VF-NH₂** (2 conformères), **Ac-FV-NH₂** (3 conformères) ³

Ac-AAF-NH₂ (1 conformère), **Ac-AFA-NH₂** (1 conformère), **Ac-FAA-NH₂** (2 conformères) ⁴

Ac-FGG-NH₂ (1 conformère) ⁵

Phenyl-xyloside (2 conformères) ⁶

Phenyl-fucopeyranoside (2 conformères) ⁷

Phenyl-β-D-galactopyranoside (1 conformère) ⁸

Phenyl-β-D-glucopyranoside (1 conformère) ⁹

Phenyl-α-D-mannose (1 conformère) ⁸

- *Pour estimer l'erreur de prédiction des fréquences des modes du groupement carboxylate, les conformères suivants ont été utilisés:*

Ions propionate et benzoate ¹⁰

Ions déprotonés phénylalanine, cystéine, tryptophane et tyrosine ¹¹

Zwitterion [RR+H⁺] ¹²

- (1) Snoek, L. C.; Kroemer, R. T.; Hockridge, M. R.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, *3*, 1819.
- (2) Snoek, L. C.; Robertson, E. G.; Kroemer, R. T.; Simons, J. P. *Chemical Physics Letters* **2000**, *321*, 49.
- (3) Chin, W.; PiuZZi, F.; Dimicoli, I.; Mons, M. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 1033.
- (4) Chin, W.; PiuZZi, F.; Dognon, J.-P.; Dimicoli, I.; Tardivel, B.; Mons, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 11900.
- (5) Chin, W. *Thèse de doctorat* **2006**, Université Paris 11, Orsay.
- (6) Hunig, I.; Painter, A. J.; Jockusch, R. A.; Carcabal, P.; Marzluff, E. M.; Snoek, L. C.; Gamblin, D. P.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7*, 2474.
- (7) Carcabal, P.; Patsias, T.; Hunig, I.; Liu, B.; Kaposta, C.; Snoek, L. C.; Gamblin, D. P.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 129.
- (8) Jockusch, R. A.; Talbot, F. O.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2003**, *5*, 1502.
- (9) Talbot, F. O.; Simons, J. P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*, 3562.
- (10) Steill, J. D.; Oomens, J. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 4941.
- (11) Oomens, J.; Steill, J. D.; Redlich, B. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 4310.
- (12) Prell, J. S.; O'Brien, J. T.; Steill, J. D.; Oomens, J.; Williams, E. R. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 11442.

Annexe 2: Le brin 16-22 de la protéine amyloïde β

2.1 Introduction

Le brin de la protéine amyloïde β composé des acides aminés numéros 16 à 22 (séquence KLVFFAE) comporte le cœur hydrophobe de l'amyloïde β : les acides aminés 17 à 21. En solution, la structure de ce brin n'a pas été déterminée, mais celle du brin 10-35 peut être trouvée dans la PDB (code 1hz3). On peut constater que la partie correspondant aux résidus 16 à 22 adopte une forme de boucle, afin de minimiser les interactions entre les acides aminés hydrophobes et l'eau. Dans une publication datant de 2003, D. Klimov et D. Thirumalai ont montré, grâce à des simulations de dynamique moléculaire en solution, que ce peptide $A\beta_{16-22}$ s'agrège, et que ses oligomères adoptent la forme de feuillets β anti-parallèles ¹. Cette configuration est fortement stabilisée par des interactions électrostatiques entre la chaîne latérale protonée de la lysine d'un brin et celle de l'acide glutamique d'un autre brin, qui elle est déprotonée. On a donc 2 interactions de ce type par dimère. C'est une configuration qui peut être assez solide pour être désorbée et mise en phase gazeuse sans être détruite, même si les interactions entre charges opposées ont peu de chance de survivre. On aurait dans ce cas un modèle de feuillet β en phase gazeuse, et l'on pourrait ainsi déterminer sa signature spectroscopique par IRMPD dans la région 1000-2000 cm^{-1} .

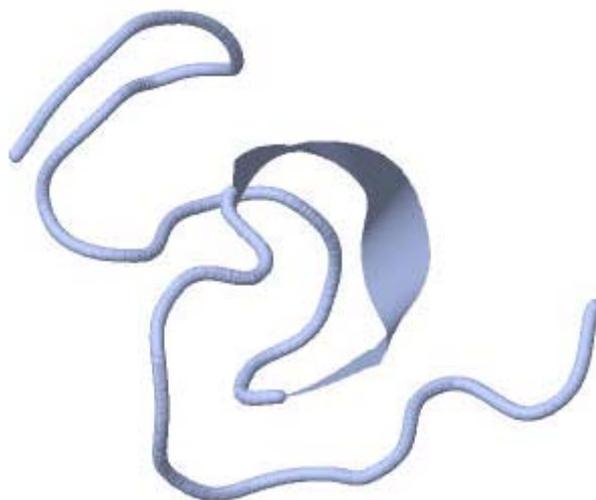


Figure 1: structure du brin $A\beta_{10-35}$ dans l'eau mesurée par RMN. On peut voir la boucle formée par les résidus hydrophobes, elle est représentée par un ruban.

2.2 Etude du monomère

2.1 Résultats expérimentaux

La caractérisation du monomère du peptide $A\beta_{16-22}$ est la première étape avant d'aborder l'étude du dimère. Nous avons mesuré le spectre IRMPD des états de charge 1+ et 1- du peptide protégé $Ac-A\beta_{16-22}-NH_2$, et le spectre de mobilité ionique du brin protoné uniquement. Ces données sont rassemblées dans la Figure 2 et la Figure 3.

Les spectres IRMPD des peptides sont extrêmement simples, deux bandes pour le cation et trois pour l'anion: les bandes amide I et II sont présentes dans les deux cas, et il en apparaît une supplémentaire autour de 1600 cm^{-1} pour l'anion, que l'on peut attribuer au mode asymétrique du groupement carboxylate. On peut d'ores et déjà, d'après les données issues des travaux de J. Oomens *et al.*, dire que ce groupement déprotoné est engagé dans des liaisons H avec des groupements NH. En effet, la position de cette bande est plus basse en nombre d'onde que celle des acides aminés isolés, qui possèdent un groupe carboxylate lié à un seul groupement NH_2 . La bande amide II ne change pas tellement de forme lorsqu'on passe d'un état de charge à l'autre, mais la bande amide I s'élargit clairement vers les bas nombres d'onde. Cela veut sans doute dire que la majorité des groupements $C=O$ est engagée dans des liaisons H, et dans des interactions électrostatiques avec la charge positive.

La largeur des bandes amide I et II est étonnamment basse: 50 cm^{-1} environ, contre 100 cm^{-1} pour $[AA+H^+]$ par exemple. Ce cas a déjà été rencontré lors de l'étude des brins d'amyloïde 1-28 et 12-28, et nous avons expliqué cette particularité par un effet de seuil. En effet, il existe une prédominance de ces bandes dues aux vibrations d'élongation $C=O$ et de pliage NH dans les spectres des peptides, et nous sommes obligés de baisser le flux de photons IR par rapport au cas des petits systèmes afin d'éviter la saturation des bandes amide I et II, mais l'énergie absorbée par les autres modes de vibrations (modes des cycles aromatiques, de pliage CH_n , d'élongation C-N (amide III)) ne dépasse pas le seuil de dissociation de l'ion et celles-ci n'apparaissent donc pas dans le spectre.

Le spectre de mobilité ionique est pour sa part composé d'un pic majoritaire dont le maximum est situé à 230 et s'étale jusqu'à 300 \AA^2 , ainsi que d'un faible signal autour de 190 \AA^2 .

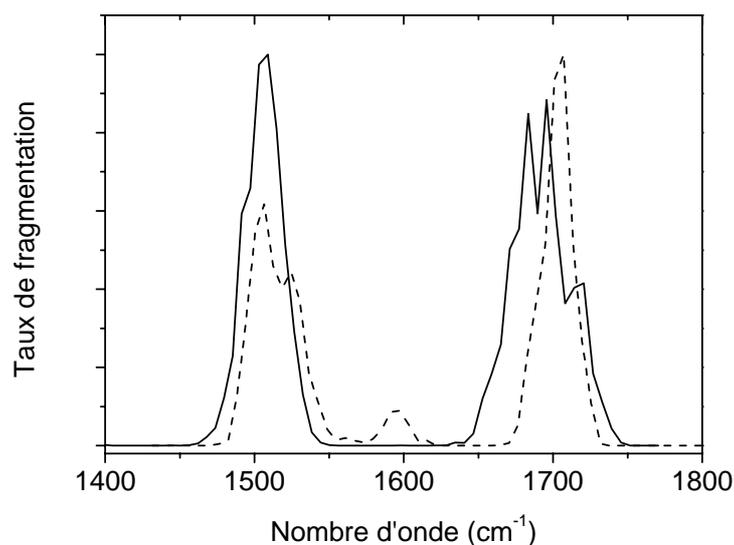


Figure 2: spectres IRMPD des peptides Ac-A β_{16-22} -NH₂ protoné (en trait plein) et déprotoné (en tirets).

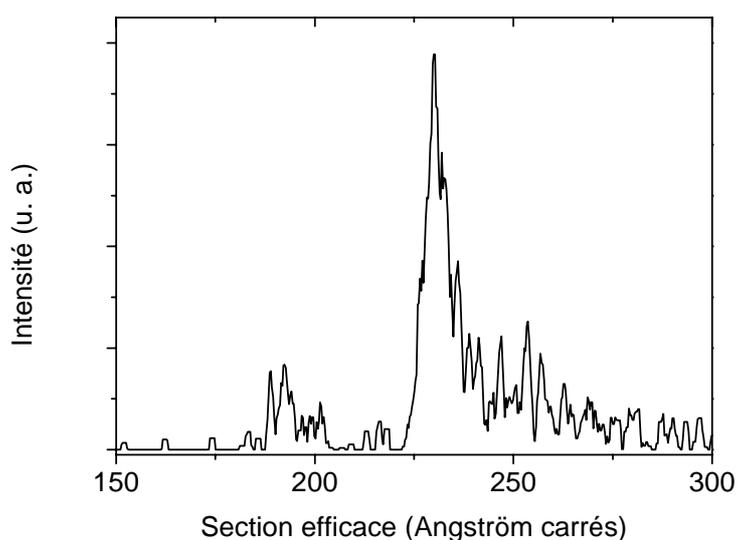


Figure 3: spectre de mobilité ionique du peptide Ac-A β_{16-22} -NH₂ protoné.

2.2 Simulations

a) Le peptide protoné

Une recherche de conformations par variation systématique des angles de torsion avec le champ de force MMFF a été effectuée sur le peptide Ac-A β_{16-22} -NH₂ protoné. Le site privilégié de fixation du proton est la chaîne latérale de la lysine car le N terminal est protégé par un groupement acétyle. 40000 conformères différents ont été générés, et 2234 ont été trouvés entre 0 et 84 kJ.mol⁻¹. Les conformères d'énergies potentielles les plus basses ont

pour point commun une structure très repliée, et notamment le groupement NH_3^+ en interaction forte avec au moins trois groupes $\text{C}=\text{O}$ peptidiques. La section efficace moyenne des 15 conformères de plus basses énergies a été calculée grâce au logiciel Mobcal (voir chapitre III): elle est de 234 \AA^2 . C'est un accord remarquable avec le pic majoritaire du spectre de mobilité. La dispersion des 15 valeurs autour cette moyenne est également plutôt cohérente avec celle observée, puisque le minimum est de 221 et le maximum de 254 \AA^2 .

Le spectre du conformère ayant l'énergie potentielle la plus basse (calculée avec le champ de force MMFF) a été simulé à l'aide de la méthode ONIOM, au niveau B3LYP/6-31+g(d):AM1. Le grand nombre de chaînes latérales hydrophobes (elles sont composées de groupements alkyles) peuvent être traitées au niveau AM1, elles ne participent pas aux interactions intramoléculaires. Le résultat est visible dans la Figure 4. Trois transitions intenses sont situées entre les deux bandes principales, donc clairement en désaccord avec le spectre IRMPD. Il s'agit du mode d'élongation d'un groupement $\text{C}=\text{O}$ en liaison H forte avec le groupe chargé NH_3^+ à 1629 cm^{-1} , du mode de pliage du groupement NH_2 du C terminal à 1594 cm^{-1} , et du mode de pliage symétrique du groupe chargé à 1588 cm^{-1} . Sa fréquence est située très haut en nombre d'onde parce-qu'il est très fortement lié à trois groupements $\text{C}=\text{O}$, mais aussi parce-qu'elle est mal reproduite par le niveau de calcul ONIOM, on ne peut donc pas se baser sur celle-ci pour rejeter la présence de cette famille de conformation. Cependant, les deux autres transitions ainsi que la trop grande largeur de la bande amide II simulée constituent des arguments dans ce sens.

Dans la Figure 5, je compare les spectres expérimentaux du brin $\text{Ac-A}\beta_{16-22}\text{-NH}_2$ et du peptide AGWLK, tous deux une fois protonés. Le conformère majoritaire en phase gazeuse à 300 K a été déterminé au chapitre IV de ce travail. Sa structure est rappelée à droite dans la Figure 5. On constate que les bandes amide II des deux peptides sont proches, un petit décalage vers les grands nombres d'onde distingue celle du spectre du peptide AGWLK. La bande amide I de celui-ci est par contre plus fortement décalée vers les bas nombres d'onde par rapport à celle apparaissant dans le spectre du brin $\text{Ac-A}\beta_{16-22}\text{-NH}_2$. Comme les groupements $\text{C}=\text{O}$ responsables des transitions les plus intenses dans ce conformère du peptide AGWLK protoné sont liés à des groupements NH en configuration C7, cette configuration peut être présente dans le brin $\text{Ac-A}\beta_{16-22}\text{-NH}_2$ mais pas en majorité. La configuration C5 est celle dans laquelle le décalage vers le rouge est moindre, on pense donc à une conformation totalement dépliée, un peu comme la di-alanine protonée (*cf.* Figure 6), mais on s'attend alors à une section efficace de collision bien trop élevée par rapport à l'expérience. Par contre, une conformation en forme d'épingle à cheveux a des chances d'être

assez repliée pour satisfaire cette exigence. Dans leur étude du peptide Ac-VQIVYK-NHCH₃ neutre, T. Vaden *et al.* évoquent l'existence d'une famille de conformations de ce type pour expliquer leurs données ². J'ai donc construit un conformère similaire à l'aide du logiciel de visualisation moléculaire Gaussview, puis ai simulé son spectre IR de la même façon que précédemment. Le résultat est donné dans la Figure 7, ainsi que l'illustration de la structure.

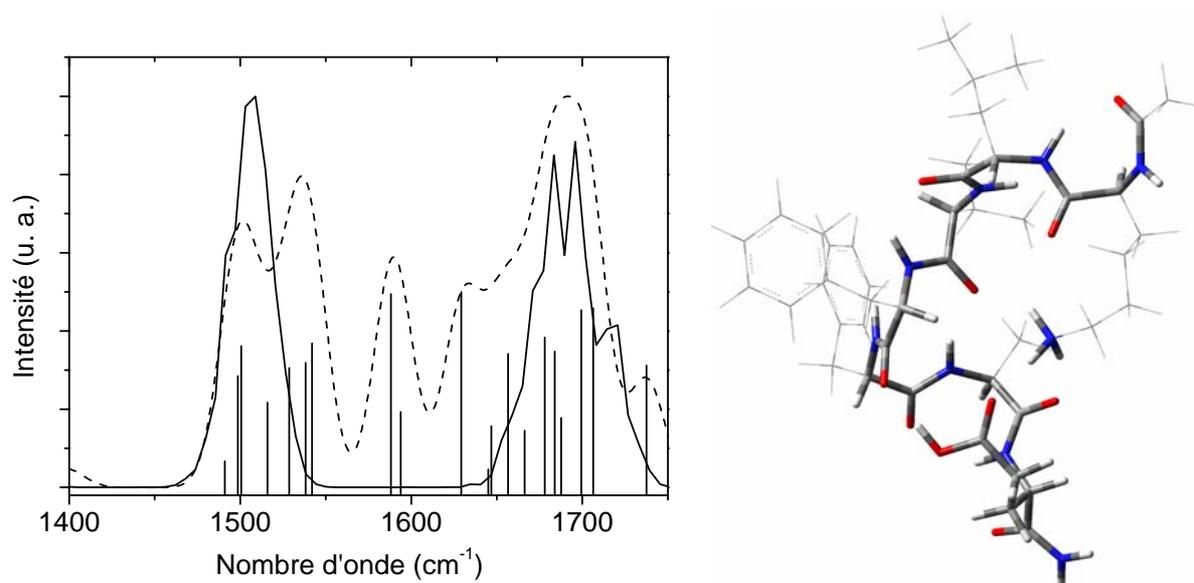


Figure 4: superposition des spectres IRMPD (trait plein) et simulé (tirets) au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1 du conformère de plus basse énergie du peptide Ac-A β ₁₆₋₂₂-NH₂ protoné. La convolution a été réalisée avec une fonction gaussienne de largeur à mi-hauteur 25 cm⁻¹. Sa structure est présentée à droite: la couche basse du calcul ONIOM est représentée sous forme de traits, et la couche haute sous forme de tubes.

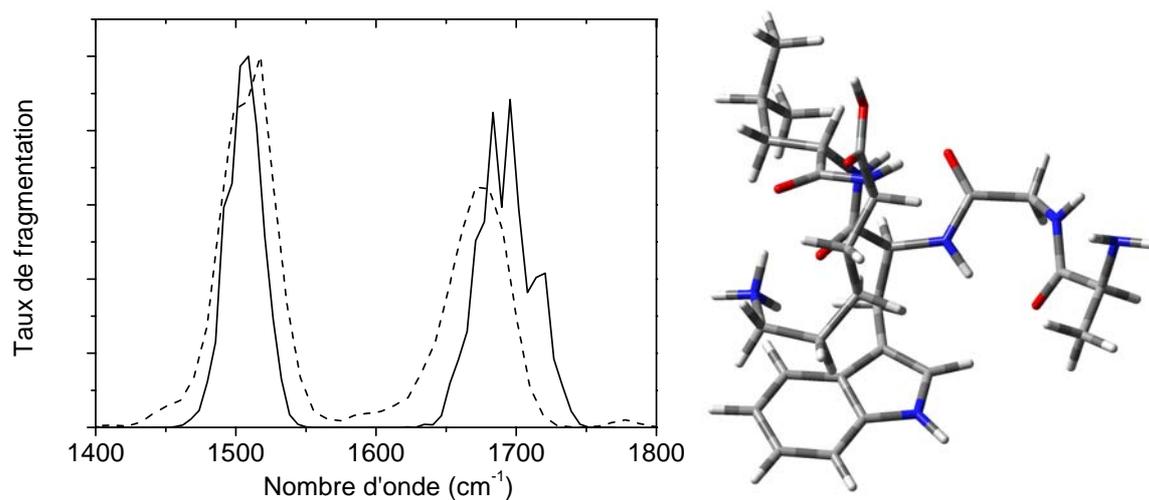


Figure 5: comparaison entre les spectres IRMPD des peptides protonés Ac-A β_{16-22} -NH₂ (trait plein) et AGWLK (tirets). A droite est donnée la structure optimisée au niveau B3LYP/6-31g(d) du conformère de ce dernier dont le spectre correspond le mieux à l'expérience.

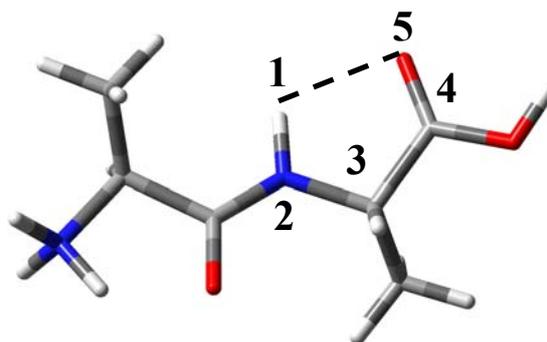


Figure 6: structure du conformère majoritaire peuplé à 300 K du peptide [AA+H⁺]. La configuration de la liaison H (symbolisée par des tirets) entre les groupements NH et C=O du C terminal est appelée C₅. Les numéros des atomes impliqués dans le « cycle » incluant la liaison H sont indiqués.

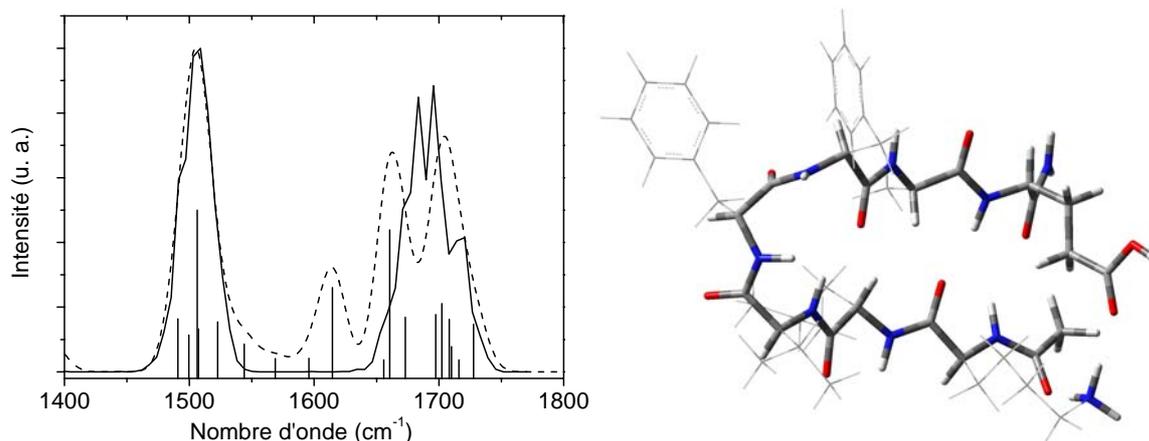


Figure 7: à gauche: superposition des spectres IRMPD (en trait plein) et simulé (en tirets) au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1 du conformère en forme d'épingle à cheveux du brin Ac-A β ₁₆₋₂₂-NH₂ protoné. La convolution a été réalisée avec une fonction gaussienne de largeur à mi-hauteur 25 cm⁻¹. Sa structure optimisée au même niveau est à droite ; la couche basse du calcul ONIOM est représentée sous forme de traits, et la couche haute sous forme de tubes.

Le spectre simulé est cette fois plus proche de l'expérience que celui du premier conformère. La bande amide II est notamment très bien reproduite, grâce à une forte absorption du mode de pliage d'un groupement NH lié en configuration C5, ce qui est encourageant et confirme l'hypothèse précédente. Cependant, une transition intense située à 1615 cm⁻¹ n'apparaît pas dans le spectre IRMPD: elle est due à l'excitation du mode d'élongation d'un groupement C=O en liaison forte avec le groupe chargé. La bande amide I est pour sa part mieux reproduite que dans le spectre du premier conformère, mais la transition expérimentale située à 1683 cm⁻¹ n'est pas simulée, alors que l'intensité de sa partie basses fréquences est surestimée.

On constate que l'intensité de la transition située à 1661 cm⁻¹, et due à l'absorption de groupements C=O engagés dans des liaisons typiques du feuillet β , est trop élevée par rapport à l'expérience pour que ce conformère soit peuplé majoritairement en phase gazeuse. De plus, un calcul de section efficace de collision donne une valeur de 256 Å², ce qui correspond au faible signal à droite du pic principal du spectre expérimental.

b) Le peptide déprotoné

Le même genre d'étude a été appliqué à l'espèce déprotonée du brin Ac-A β ₁₆₋₂₂-NH₂. Le seul site acide en solution étant le groupement carboxyle de la chaîne latérale de l'acide glutamique, j'ai fait l'hypothèse que seul ce site est déprotoné et donc chargé négativement.

Une recherche de conformations identique à celle menée pour le cation a donné 3124 conformères distincts entre 0 et 84 kJ.mol⁻¹. Ceux qui ont l'énergie potentielle la plus basse ont comme particularité de présenter le groupement carboxylate entouré de la majorité des groupes NH du peptide. J'ai donc simulé le spectre de celui d'énergie la plus basse au même niveau que pour le cation (ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1), il est donc visible dans la Figure 8, avec la structure du conformère en question. L'allure globale du spectre IRMPD est respectée, même si la position des trois bandes principales n'est pas parfaite. Le fait que certaines transitions intenses entre 1550 et 1600 cm⁻¹ (dues à des modes de pliage NH en liaison avec le groupe COO⁻) ne correspondent à aucune bande expérimentale et que la bande amide I soit décalée vers le rouge est le signe que le groupement carboxylate n'est pas autant engagé que dans ce conformère. Cette hypothèse est cohérente avec la prédiction apparemment très bonne de la fréquence de son mode d'élongation asymétrique (1590 contre 1594 cm⁻¹) alors qu'on sait que ce niveau de calcul la surestime (*cf.* chapitre V). Il est cependant probable que le groupement carboxylate soit très lié, à l'opposé du peptide Ac₂K(DA)(DA) déprotoné (*cf.* chapitre V).

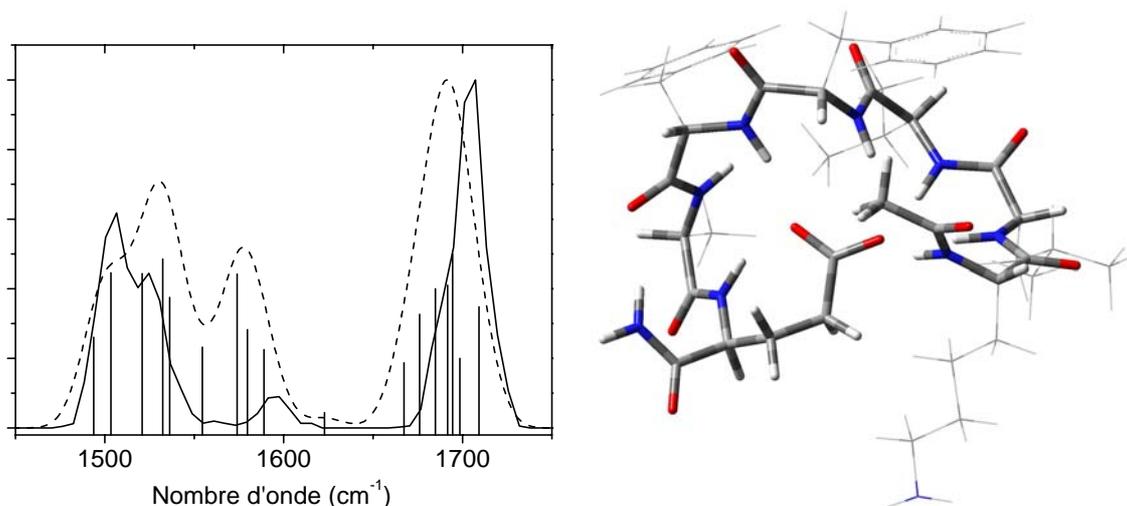


Figure 8: spectres IRMPD (trait plein) et simulé (tirets) au niveau ONIOM B3LYP/6-31+g(d):AM1 du conformère du brin Ac-Aβ₁₆₋₂₂-NH₂ dont la structure optimisée apparaît à droite de la figure. La convolution a été réalisée avec une fonction gaussienne de largeur à mi-hauteur 25 cm⁻¹.

2.3 Etude du dimère

Nous avons mesuré le spectre IRMPD du dimère protoné du brin Ac-Aβ₁₆₋₂₂-NH₂, et il est visible dans la Figure 9 où il est superposé au spectre du monomère protoné. Les

différences sont faibles mais nettes: la bande amide II subit un décalage d'environ 15 cm^{-1} vers le bleu et l'amide I perd un épaulement dans sa partie hautes fréquences sous l'influence de la complexation. Ce décalage est sans doute le résultat d'un engagement plus fort des groupements NH dans des liaisons H, ce qui est cohérent avec la chute d'intensité de l'épaulement de la bande amide I. En effet, celui-ci est dû à l'absorption de groupements peu liés. Ceci est quelque peu décevant par rapport à nos attentes, car si la famille de structures de ce dimère majoritairement présente en phase gazeuse avait la forme d'un feuillet β , on s'attendrait à observer une bande amide I composée de deux pics: un correspondant aux groupements pointant vers l'extérieur et un aux groupements fortement liés à l'autre monomère, d'après la simulation du monomère protoné en épingle à cheveux. Or ce n'est pas le cas, nous en concluons donc que la structure doit être différente.

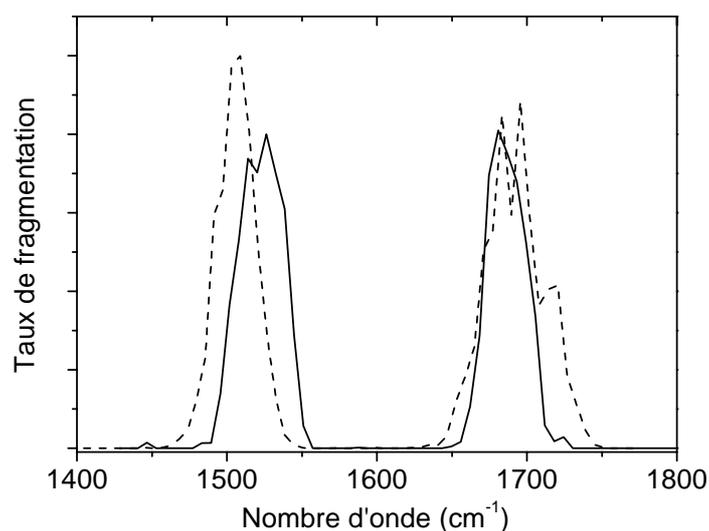


Figure 9 : superposition des spectres IRMPD du monomère (tirets) et du dimère (trait plein) une fois protonés du brin Ac-A β ₁₆₋₂₂-NH₂.

- (1) Klimov, D. K.; Thirumalai, D. *Structure* 2003, *11*, 295.
- (2) Vaden, T. D.; Gowers, S. A. N.; de Boer, T. S. J. A.; Steill, J. D.; Oomens, J.; Snoek, L. C. *Journal of the American Chemical Society* 2008, *130*, 14640.

Annexe 3: Photo-ionisation de la 2-pyridone

3.1 Introduction

Lorsqu'un atome ou une molécule absorbent de la lumière, un électron peut être arraché et ne pas être re-capturé par l'ion ainsi formé. Ce phénomène s'appelle la photo-ionisation. C'est l'équivalent de l'effet photoélectrique dans les métaux découvert par Hertz en 1887 et décrit théoriquement par Einstein en 1905. Pour un atome neutre isolé, l'énergie minimale à fournir s'appelle le potentiel d'ionisation (PI) et peut aller de 24,6 eV pour l'hélium à 3,9 eV pour le césium. Dans le cas d'une molécule, on doit distinguer deux PI: dans le cas où la surface d'énergie potentielle de l'ion est atteinte sans changement de structure, qu'on appelle PI vertical, et le PI adiabatique (forcément inférieur ou égal au premier), où le processus d'ionisation laisse le temps au système de se relaxer avant l'émission d'électron. Dans la Figure 1, je prends l'exemple d'une molécule diatomique pour illustrer ces deux PI. En photo-ionisation à un photon, le processus est vertical, et le PI atteint généralement quelques eV. Par exemple, M. Hochlaf *et al.* ont étudié la molécule H₂S entre 10 et 17 eV et ont mesuré un PI de 10,5 eV environ ¹. Tous les photons d'énergie supérieure au PI ne conduisent pas automatiquement à l'ionisation de l'espèce, et le taux d'ions formé dépend de la section efficace de photo-ionisation. La mécanique quantique est capable de décrire de façon complète les expériences de photo-ionisation en termes d'énergie, d'intensité et de distribution angulaire. Les expériences de photo-ionisation permettent donc de mesurer le spectre d'une espèce, c'est-à-dire de connaître les états électroniques et ro-vibrationnels de l'ion, grâce à la très haute résolution atteinte par les techniques de spectroscopie de photoionisation par champ impulsif (PFI-PES). Ces mesures peuvent alors être comparées à des calculs de chimie quantique pointus qui sont ainsi mis à l'épreuve. On peut également étudier la fragmentation de molécules, et en déduire des énergies de liaison et d'activation.

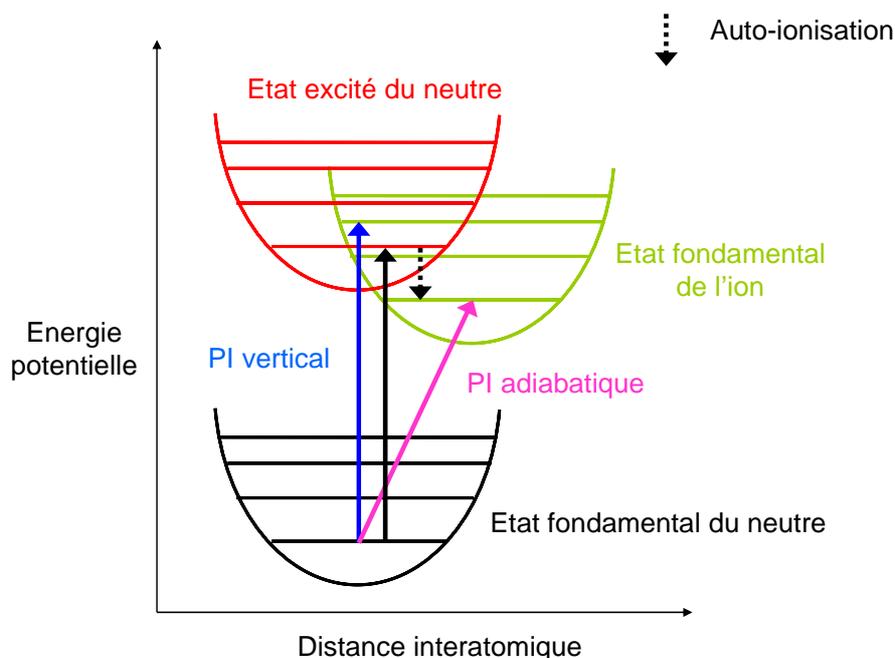


Figure 1: illustration des différents phénomènes évoqués dans le texte avec l'exemple d'une molécule diatomique. Les flèches représentent des transitions électroniques.

Dans cette annexe, je présenterai nos résultats sous forme de spectres de photoélectrons (PES) et de rendement d'ion (IYS). Les premiers sont obtenus en mesurant l'intensité des électrons émis par photo-ionisation en balayant la longueur d'onde des photons incidents sur une gamme donnée, et les seconds en mesurant l'intensité du signal d'ions. On détecte un signal à partir du moment où l'énergie des photons atteint la valeur du PI. Comme l'énergie des atomes et molécules est quantifiée, les spectres de photoélectrons sont des spectres de raies: à chaque fois qu'un état électronique ou ro-vibrationnel de l'ion est atteint par le photon, un électron est émis, mais avec une énergie cinétique très faible (quelques meV), on parle alors de photoélectron de seuil (« Threshold Photo-Electron », TPE). Le PI correspond en fait à la différence d'énergie entre l'état électronique et vibrationnel fondamental de l'espèce neutre et celui de l'ion formé. A partir de l'état fondamental du neutre, si l'on augmente l'énergie du photon, l'électron peut être émis du même état de l'ion mais avec une énergie cinétique égale à la différence entre l'énergie du photon et l'énergie de la transition. Il peut également atteindre un autre état de l'ion et être émis avec une vitesse quasi-nulle: pour une énergie de photon, on aura donc plusieurs types d'électrons émis. Pour illustrer ce fait, je présente dans la Figure 2 le spectre en 2D des photoélectrons issus de la 2-pyridone en fonction de l'énergie des photons incidents. En ordonnée, on a l'énergie cinétique des photoélectrons, et comme c'est un spectre en 2D, on peut voir également leur intensité par un code couleur. On voit clairement les lignes obliques qui montrent que l'énergie cinétique des électrons venant d'un état donné du cation augmente de la même quantité que celle des photons. Le PI de la 2-pyridone est situé autour de 8,45 eV, et on a un autre état vers 8,51 eV. A cette valeur, on a donc des électrons de

seuil venant de cet état *et* des électrons d'énergie cinétique 0,06 eV qui viennent de l'état fondamental du cation. Pour avoir le spectre du cation, il faut donc prendre en compte uniquement les électrons de seuil, on obtient un spectre de photoélectrons de seuil (TPES).

La situation que je viens de décrire n'est pas celle qui prévaut dans tous les cas: un phénomène appelé « auto-ionisation » peut également se produire. Cela consiste en une transition électronique entre l'état fondamental de l'espèce neutre et un état excité *de cette même espèce* (et non un état du cation), suivie par une désexcitation vers un état de plus basse énergie du cation, comme on peut le voir pour une molécule diatomique sur la Figure 1. Si l'on prend l'exemple d'un atome comme l'argon, on constate que l'auto-ionisation est très présente, et se traduit sur les IYS par des pics supplémentaires correspondant aux états vibrationnels du neutre (voir Figure 2, b)). Cependant, ces pics ne sont pas détectables sur les TPES car les photoélectrons ont alors une énergie cinétique trop élevée par rapport au seuil d'ionisation (*cf.* Figure 3, a)). La présence de lignes bien définies dans la Figure 2 est la preuve que l'auto-ionisation ne joue pas un grand rôle dans la photo-ionisation de la 2-pyridone. Dans le cas contraire l'énergie cinétique des photoélectrons ne varierait pas linéairement avec l'énergie des photons, et l'intensité des photoélectrons serait donc répartie de manière plus homogène.

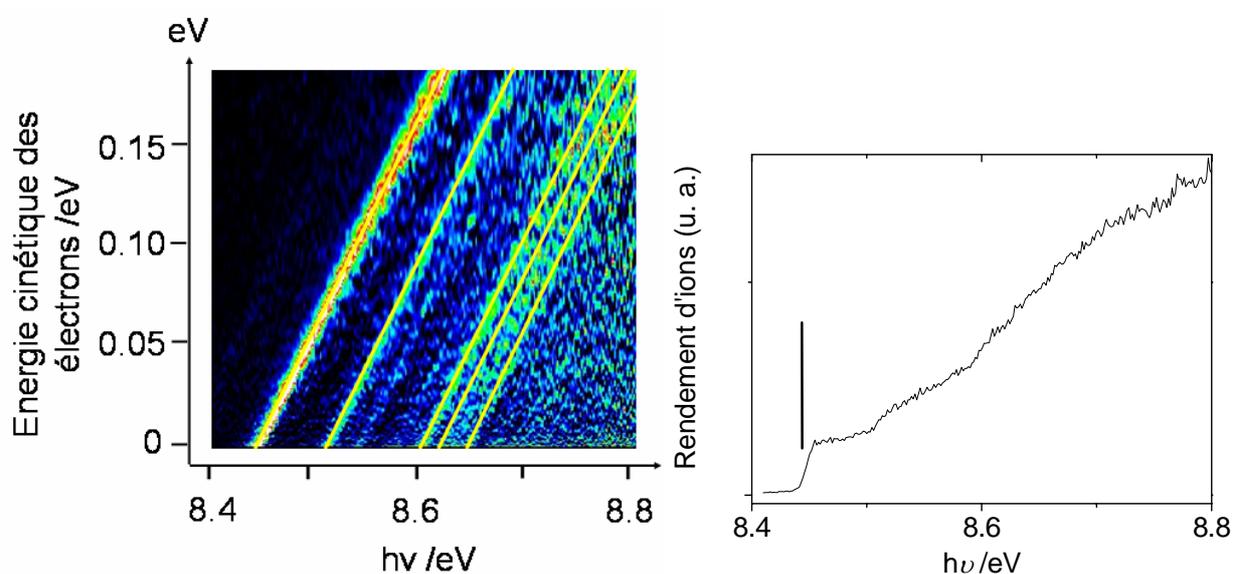


Figure 2: à gauche: spectre 2D de photoélectrons de la 2-pyridone. Le code couleurs est tel que l'intensité des électrons augmente du violet au rouge. Les lignes jaunes ont été ajoutées pour guider l'œil. A droite: spectre de rendement d'ions dans le même intervalle d'énergie de photons. Le PI est indiqué par une barre verticale.

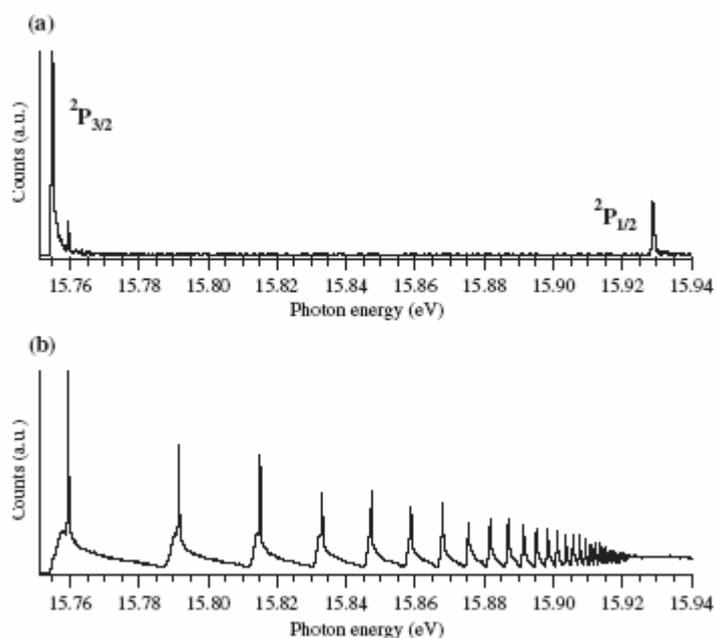


Figure 3: a) spectre de photoélectrons de seuil ; b) spectre de rendement d'ions de l'argon. (figure tirée de la référence ²)

3.2 *But du projet*

La 2-pyridone est une molécule contenant 12 atomes. Sa structure est donnée dans la Figure 4. C'est une molécule plane dans son état fondamental, et elle ne possède qu'une seule conformation. Les propriétés physiques à étudier sont donc ici radicalement différentes de celles des autres systèmes dont j'ai parlé dans ce travail de thèse: ce qui nous intéresse dans cette molécule, c'est sa capacité à former un dimère, celui-ci constituant le plus petit modèle des liaisons entre bases de l'ADN (Adenine-Thymine et Guanine-Cytosine). Il existe plusieurs types de dimères, les plus communs étant nommés Watson-Crick et Hoogsteen (voir Figure 6). Dans l'ADN, les liaisons hydrogène induisent des structures planaires, comme on peut le voir dans la Figure 5. Par contre, la structure des dimères en phase gazeuse n'est pas facile à sonder, principalement à cause de la difficulté à les isoler sans les dégrader. Des expériences sur des modèles ont cependant été menées avec succès par les groupes de S. Leutwyler et D. Pratt. Par exemple, Frey *et al.* ont montré qu'un mélange de 9-méthyladénine (analogue de l'adénine) et de 2-pyridone donnait naissance à des complexes neutres de type Watson-Crick et Hoogsteen, les premiers étant trois fois plus nombreux que les autres ³.

Le dimère neutre de la 2-pyridone a également été étudié en phase gazeuse par spectroscopies UV ⁴ ainsi que UV/IR et Raman/UV couplées à des calculs de chimie quantique ⁵. Sa structure (schématisée dans la Figure 4) à l'état fondamental est telle que les deux molécules

sont coplanaires et centrosymétriques. Il est très lié à cause des liaisons NH et C=O adjacentes, qui sont respectivement donneuse et accepteuse de liaison H. Ces calculs ont permis de prédire son énergie de liaison, qui se situe autour de 97 kJ.mol^{-1} ⁵⁻⁷. Cependant, cette énergie n'a jamais été mesurée expérimentalement. La technique de photo-ionisation permet en principe de le faire puisque la mesure des PI du monomère et du dimère ainsi que de l'énergie de dissociation du dimère permet d'en déduire l'énergie de liaison du dimère ionisé et du dimère neutre, à condition que leurs géométries soient similaires. Ceci est extrêmement intéressant car aucune mesure fiable d'énergie de liaison des bases de l'ADN ou de leurs systèmes modèles n'a été effectuée depuis celles de L.F. Sukhodub⁸ en 1976. Durant ma thèse, nous n'avons eu le temps d'analyser les données concernant uniquement la spectroscopie du monomère de la 2-pyridone, c'est pourquoi je me focaliserai sur celui-ci dans cette annexe.

Un nombre conséquent de travaux ont été dédiés à la détermination de diverses propriétés de la 2-pyridone seule, notamment parce-qu'elle possède un tautomère: la 2-hydroxypyridine (forme énol, la 2-pyridone étant la forme kéto). La différence d'énergie potentielle entre les deux formes est petite quel que soit l'environnement (0,092 eV en solution, 0,025 eV en phase gazeuse et 0,034 eV à l'état solide⁹). Par contre, le transfert de proton est facilité en solution¹⁰ ou dans le dimère¹¹ par une baisse de la barrière de 2,1 eV existant en phase gazeuse. La forme kéto est majoritaire dans les solvants polaires et en phase solide, alors que c'est la forme énol qui domine en phase gazeuse et dans les solvants apolaires. Les structures géométrique et électronique, la réactivité ainsi que la fragmentation de cette molécule ont été déterminées précisément en phases condensée et gazeuse par l'expérience (RMN¹², spectroscopies micro-onde^{13,14}, Raman, IR^{5,7,15-17}, UV¹⁸⁻²⁰) et la théorie²¹.

En revanche, les études mettant en jeu la forme ionisée de cette molécule sont plus rares: les premières mesures de PI datent des années 70 et furent effectuées par impact électronique²² et spectroscopie de photoélectrons²³. La valeur de 9 eV déterminée alors fut grandement améliorée par des expériences de spectroscopie de photoélectrons de seuil, qui donnèrent des valeurs de 8.4479 et $8,9384 \pm 0.0006$ eV pour les formes kéto et énol, respectivement²⁴. Ces auteurs ont aussi montré que la différence d'énergie potentielle des deux tautomères ionisés dans leur état électronique fondamental est de 0,46 eV, soit 19 fois plus que pour les molécules neutres. Une autre publication fait état d'une valeur de $8,9344 \pm 0,0005$ eV pour le PI de la forme énol²⁵. La fragmentation de la 2-pyridone est complexe au vu de mesures par spectrométrie de masse²⁶.

Le but de cette étude par photo-ionisation est de mesurer le spectre de photoélectrons des deux tautomères ionisés (voir Figure 7) et de le comparer avec les calculs de chimie quantique qui ont été effectués par D. Hammoutène et M. Hochlaf à l'Université Marne-la-Vallée. Comme cette molécule est petite comparée aux autres systèmes présentés dans cette thèse, le niveau de calcul

peut être considérablement élevé, la structure électronique et les fréquences anharmoniques de vibrations des deux tautomères ont donc été simulées au niveau PBE0/6-311+G(d,p) (PBE0 est une fonctionnelle DFT)²⁷.

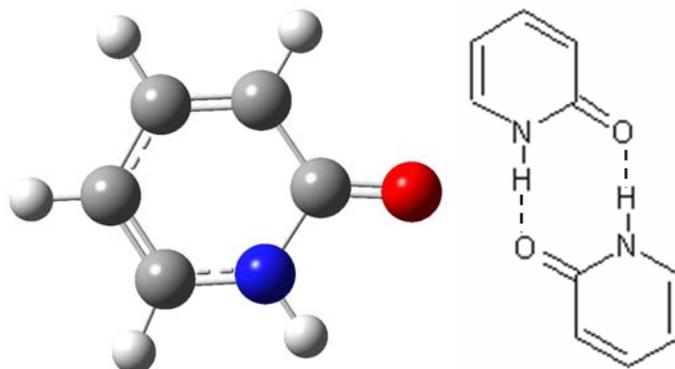


Figure 4: à gauche, structure de l'état fondamental de la 2-pyridone neutre, calculée au niveau MP2/6-31+g(d) ; à droite, schéma du dimère. Les deux liaisons H sont représentées par des tirets.

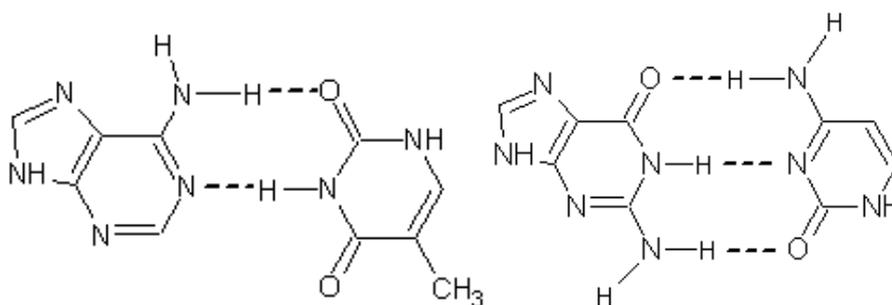


Figure 5: structure des liaisons entre paires de bases de l'ADN complémentaires A-T (à gauche) et G-C (à droite). Les liaisons H sont représentées par des tirets.

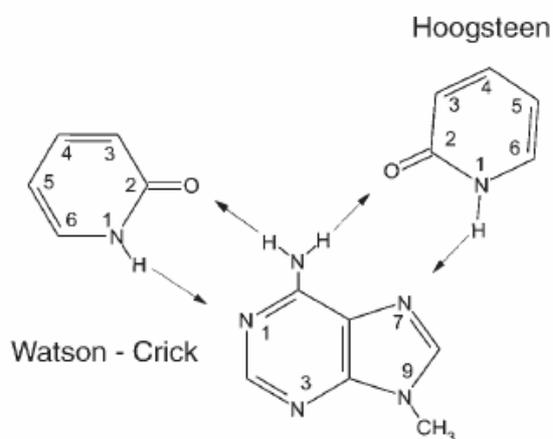


Figure 6: Illustration de la différence entre les liaisons Watson-Crick et Hoogsteen (figure tirée de la référence³). Les liaisons H sont représentées par des flèches.

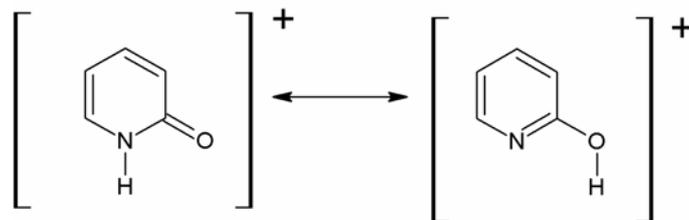


Figure 7: formule de Lewis des deux tautomères de la 2-pyridone ionisée.

3.3 Description du montage expérimental

Toutes les données expérimentales ont été prises durant la semaine de faisceau obtenue en collaboration avec M. Hochlaf (Université Marne-la-Vallée) et L. Poisson (CEA). Nos contacts au synchrotron SOLEIL étaient G. Garcia et L. Nahon. Ils nous ont gracieusement aidés à faire fonctionner l'expérience qu'ils ont montée. Je vais dans ce paragraphe décrire brièvement le synchrotron, la ligne de lumière DESIRS et le spectromètre que nous avons utilisé.

Un synchrotron est un instrument dédié à la production de lumière pour des applications scientifiques très diverses. Cette lumière est émise par des électrons qui sont envoyés dans un anneau maintenu sous vide poussé et qui tournent à une vitesse proche de celle de la lumière avec une énergie de 2,75 GeV sur un trajet de 354 m de longueur. La grande majorité du flux est créée grâce au passage des électrons dans des onduleurs, dispositifs composés d'aimants disposés de telle sorte que leurs pôles nord et sud soient alternés. Les électrons décrivent alors une sinusoïde et perdent de l'énergie en rayonnant de la lumière appelée « rayonnement synchrotron ». Celui-ci est situé dans un cône étroit tangent à la trajectoire des électrons et dans leur direction de propagation. Il est très intense et composé d'un continuum de longueurs d'onde. A SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE (Laboratoire d'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique)), il existe 24 lignes de lumière, chaque ligne étant réservée à un thème scientifique. La ligne DESIRS (Dichroïsme Et Spectroscopie par Interaction avec le Rayonnement Synchrotron) est dédiée à l'étude d'espèces en phase gazeuse, elle couvre la gamme d'énergie de 5 à 40 eV avec une résolution de $2,5 \cdot 10^5$ à 13 eV. La sélection en longueur d'onde est assurée par un réseau, et le flux de photons atteint 10^{12} s^{-1} . Pour éviter les fragmentations et le bruit de fond sur les spectres de photoélectrons, les harmoniques du rayonnement synchrotron sont absorbées par une cellule de gaz, dans notre cas de l'argon. Tous les photons dont l'énergie est située au-delà du PI de l'argon (environ 15 eV) sont ainsi absorbés.

Au sein de cette ligne, le spectromètre DELICIOUS 2 (voir Figure 8) a été construit pour la

spectroscopie de photo-ionisation d'atomes ou de molécules. Il a comme particularité de pouvoir détecter en coïncidence les électrons et les ions issus d'un même évènement, et ainsi obtenir des spectres PEPICO (PhotoElectron and PhotoIon in COincidence). Ceci permet d'en savoir plus sur la dynamique de relaxation, de fragmentation, et la spectroscopie des espèces étudiées. Celles-ci sont mises en phase gazeuse par chauffage dans un four relié à une conduite de gaz contenant de l'hélium à une pression d'1 bar, qui permet de les entraîner jusqu'à une buse de 50 μm de diamètre. Afin d'obtenir un signal de monomères suffisant, nous avons réglé la température du four à 160 °C. De la buse sort un jet supersonique continu dans une enceinte sous vide secondaire (10^{-5} mbar), qui refroidit ro-vibrationnellement les molécules. Afin de ne pas être gênés par un signal de dimères trop important, nous avons employé l'hélium comme gaz rare pour le jet supersonique, car celui-ci favorise moins l'agrégation que l'argon. Le rayonnement synchrotron arrive perpendiculairement à la direction du jet, et ionise les molécules. La zone d'interaction est un cylindre de 4 mm de long et 200 μm de diamètre. Dans la direction perpendiculaire aux directions du jet et du rayonnement, mais dans des sens opposés, un spectromètre à temps de vol de type Wiley-Mc Laren et un détecteur de type VMI (Velocity Map Imaging) permettent de détecter respectivement les ions et les électrons en coïncidence. Les photoélectrons émis selon un angle solide de 4π sont collectés grâce à deux lentilles Einzel et arrivent sur le détecteur (*cf.* Figure 9) avec une distance au centre qui augmente avec leur énergie cinétique. Le détecteur VMI étant sensible en position, on obtient des images où les photoélectrons de plus basse énergie sont situés au centre. Ces électrons de seuil sont intéressants car ils permettent de situer les états électroniques et vibrationnels de l'ion formé. La résolution en énergie des photoélectrons peut atteindre 0,8 meV dans le cas de l'argon par exemple (voir Figure 3). Les ions et les électrons sont accélérés par le même champ et dans la même direction mais dans des sens opposés. La résolution énergétique des électrons est d'autant plus grande que ceux-ci sont moins accélérés car ils ont le temps de parcourir une distance transverse plus grande, mais on augmente la résolution des ions en masse en augmentant le potentiel d'extraction. On doit donc en pratique faire un compromis lorsqu'on détecte des électrons et des ions en coïncidence. Pour la résolution en masse, nous avons uniquement besoin de distinguer une différence de masse de 1 Da, pour détecter une éventuelle perte d'hydrogène après photo-ionisation, donc une résolution de 100 suffisait, et la résolution en photo-électrons était de 15 meV, donc plus faible que dans le cas de l'argon où la résolution en masse n'a pas besoin d'être grande. Le haut flux de photons permet d'atteindre un taux de comptage supérieur à 10 kHz.

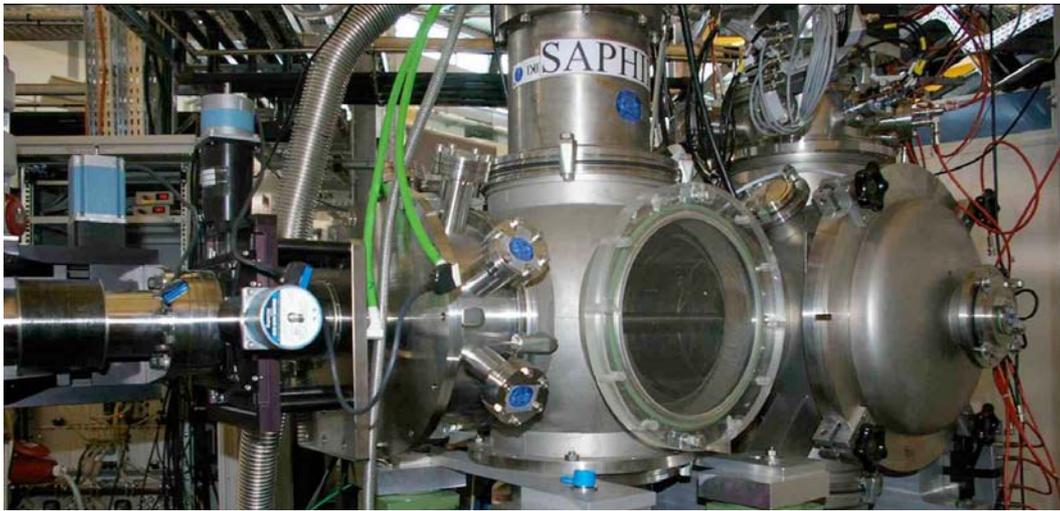


Figure 8: image du spectromètre DELICIOUS2 monté sur la ligne DESIRS.

La Figure 10 est issue des travaux de G. Garcia *et al.*, et montre un exemple d'image de photoélectrons issue de la photo-ionisation avec des photons d'énergie 16 eV d'un mélange d'atomes d'argon et de xénon. Cette énergie est supérieure à celle des premiers états électroniques des ions Ar^+ et Xe^+ , c'est-à-dire $3p^{-1}$ et $5p^{-1}$ (l'électron est émis d'une orbitale $3p$ et $5p$ de l'atome neutre). On voit sur l'image la projection des sphères de photoélectrons émis. Lorsqu'on sélectionne uniquement les électrons en coïncidence avec un ion de masse précise (PEPICO), on peut déterminer les contributions de chaque atome. On a sélectionné la masse du xénon dans la Figure 11 à gauche, et celle de l'argon à droite, on voit alors que les petits cercles sont dus à l'argon et les grands au xénon, ce qui en adéquation avec la plus faible énergie de liaison des électrons de valence dans l'argon, ce dernier ayant un numéro atomique plus élevé que le xénon. Pour passer des projections (parties gauches des images) aux coupes des sphères de photoélectrons (parties droites), contenant l'information sur l'énergie cinétique des photoélectrons, il faut appliquer une transformée d'Abel inverse aux images. Après, on peut distinguer aisément les cercles dus aux états de spin $\frac{1}{2}$ et $\frac{3}{2}$ pour chaque atome.

Dans le mode de détection des ions et des électrons en coïncidence, il faut s'assurer que le nombre de fausses coïncidences, c'est-à-dire la détection d'un électron et d'un ion ne venant pas du même évènement, est réduite autant que possible. Pour cela, on prend soin d'avoir un taux de comptage inférieur à la fréquence d'acquisition.

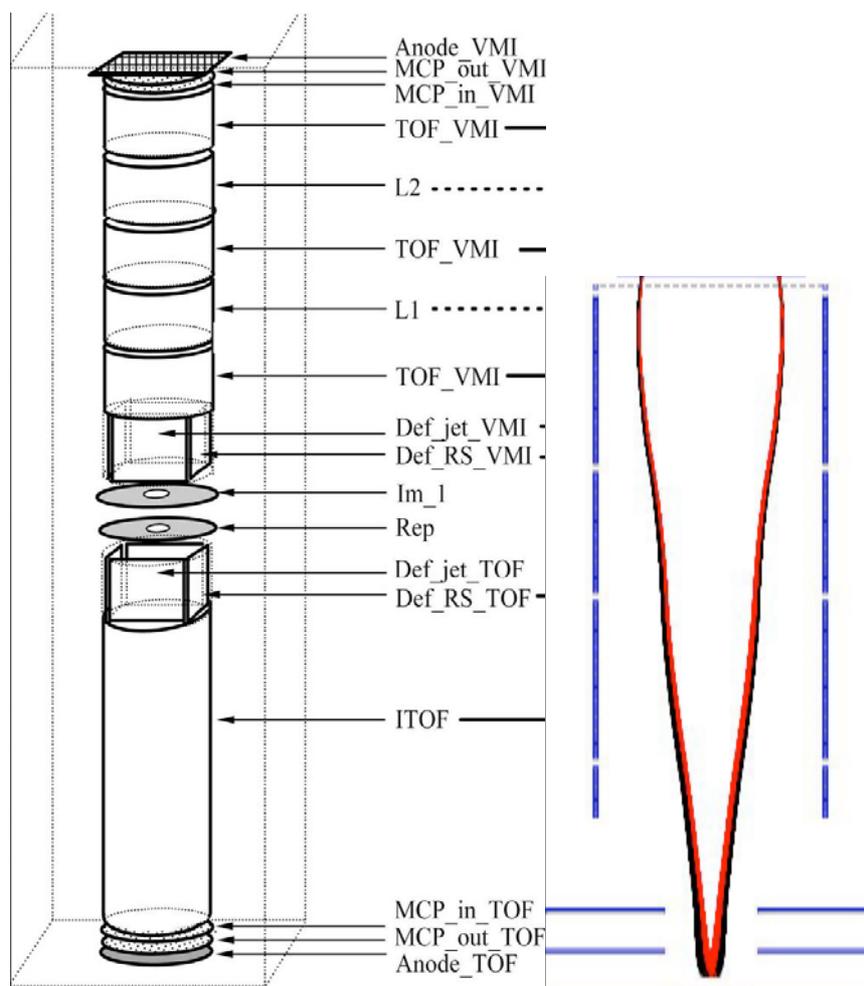


Figure 9: schéma du spectromètre DELICIOUS2, à gauche. On peut voir en bas le TOF-MS et en haut le détecteur d'électrons VMI. A droite sont représentées les trajectoires des photoélectrons dans le détecteur VMI, de bas en haut. (figures tirées de la référence ²)

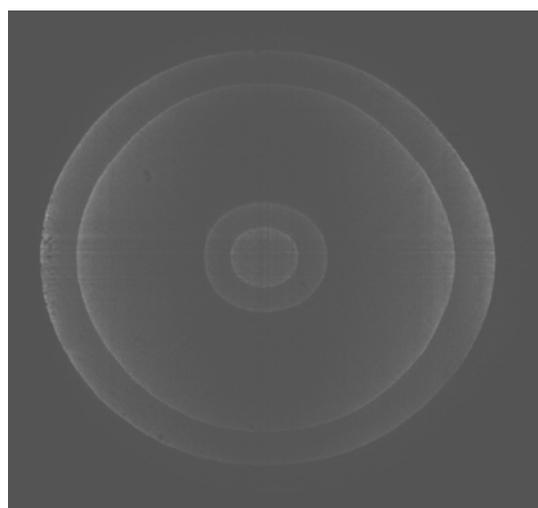


Figure 10: image donnée par le détecteur VMI des photoélectrons émis par ionisation d'un mélange Ar+Xe (figure tirée de la référence ²).

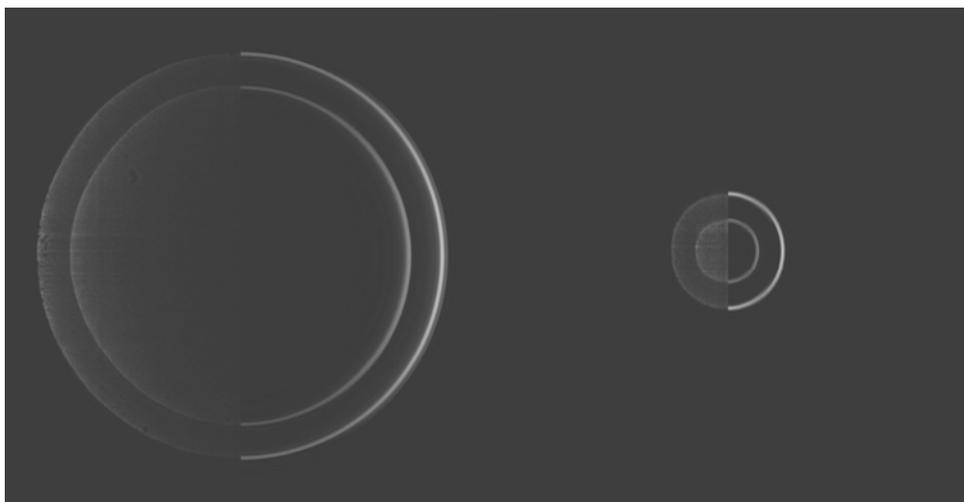


Figure 11: image provenant de la même expérience que pour la Figure 10 mais où seuls les photoélectrons détectés en coïncidence avec les ions Ar (à gauche) et Xe (à droite) apparaissent. Dans chaque image, la partie gauche représente les données brutes et la droite les données traitées (figures tirées de la référence ²).

3.4 Résultats et discussion

4.1 Spectres de photoélectrons 2D

Nous avons mesuré le spectre PEPICO de photoionisation du monomère de la 2-pyridone dans la gamme d'énergie de photons 8,3-10 eV. Comme nous ne pouvons pas sélectionner dans le jet supersonique l'un des deux tautomères, les deux contribuent au spectre, mais les photoélectrons sont détectés en coïncidence avec les ions formés, nous sommes donc sûrs qu'ils viennent bien de la photo-ionisation du monomère. Les données brutes se trouvent sous la forme d'images où l'on peut lire l'intensité des photoélectrons en fonction de la position sur le détecteur, et ce dans toute la gamme d'énergie des photons. Après avoir traité les données pour éliminer les fausses coïncidences, c'est-à-dire les photoélectrons et les ions [2-pyridone]⁺ arrivant en même temps sur les détecteurs mais ne provenant pas du même événement, il faut appliquer la transformée d'Abel inverse aux images pour en extraire une information exploitable et ainsi obtenir des images similaires à celles de la Figure 11. Il faut ensuite collecter toutes les images dans la gamme d'énergie des photons pour créer des spectres PEPICO en deux dimensions tels que celui présenté dans la Figure 12, à gauche. D'après les valeurs trouvées dans la littérature, le PI se situant vers 8.45 eV correspond à celui du tautomère kéto. Comme je l'ai dit dans l'introduction, la présence de lignes obliques nettes est le signe que l'auto-ionisation ne joue pas un grand rôle dans la photoionisation de ce tautomère. Afin de comparer les calculs de fréquences de vibration du cation avec l'expérience, il faut extraire un spectre TPES des données. Habituellement, celui-ci est obtenu en ne prenant que les électrons de basse énergie, par exemple inférieure à 10 meV. En effet, on se

rend bien compte que si l'on augmente trop cette valeur, les pics seront élargis et les valeurs des transitions moins précises. Cependant, le rapport signal/bruit doit être suffisant et donc le nombre d'électrons pris en compte aussi. Une astuce a donc été utilisée pour augmenter celui-ci tout en ne dégradant pas les pics des transitions vibrationnelles: l'image a été « redressée » (voir Figure 12, à droite). L'ordonnée n'a plus de sens, car on a plus de progression de l'énergie cinétique des électrons. On peut alors prendre en compte tous les photoélectrons venant d'un état donné, simplement en additionnant le signal sur une ligne verticale, à une abscisse donnée. Le spectre 2D redressé sur la gamme d'énergie complète est présenté dans la Figure 13.

Les calculs de D. Hammoutène montrent que la structure du cation de la forme kéto de la 2-pyridone est très proche de celle de l'espèce neutre. Selon le principe de Frank-Condon, la transition entre états fondamentaux vibrationnels et une ionisation directe seront favorisées. Ceci est cohérent avec nos mesures. Sur la Figure 13, on voit que les lignes verticales sont bien plus nettes dans la partie où les photons ont une énergie basse. L'intensité des photoélectrons augmente et des taches beaucoup plus diffuses apparaissent au-delà de 9 eV d'énergie de photons. On observe une bande intense autour de 8,94 eV: d'après les données de la littérature ceci correspond au PI de la forme énol de la 2-pyridone. Comme les taches diffuses sont le signe de la présence d'auto-ionisation (cf. paragraphe 3.1), celle-ci semble être plus présente pour ce tautomère.

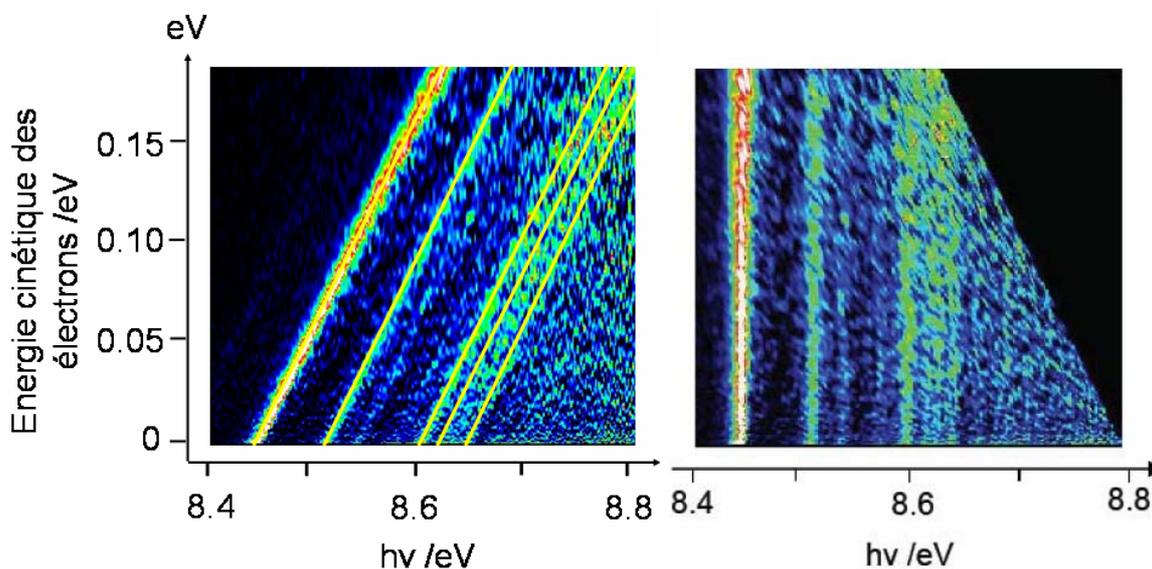


Figure 12: à gauche: spectre PEPICO en 2D de l'énergie cinétique des photoélectrons en fonction de l'énergie des photons pour la 2-pyridone. Le code couleurs est tel que l'intensité des électrons augmente du violet au rouge. Les lignes jaunes ont été ajoutées pour guider l'œil. A droite: même spectre redressé par le traitement.

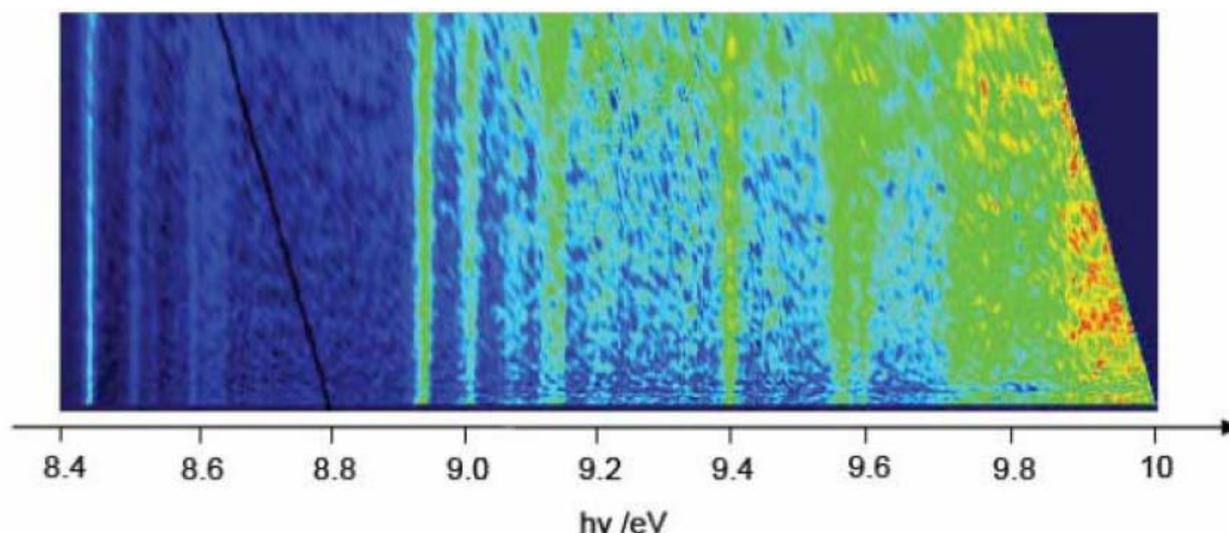


Figure 13: spectre PEPICO en 2D redressé de photoionisation de la 2-pyridone sur la gamme d'énergie des photons 8,4-10 eV. Le code couleur est le même que dans la Figure 12.

4.2 Spectre de rendement d'ions

Nous avons également mesuré le signal d'ions total correspondant au monomère dans la même gamme d'énergie que le spectre de la Figure 13, le IYS est donc présenté dans la Figure 14. On peut constater que le signal augmente de façon monotone, mais avec deux sauts marqués, à 8,443 et 8,927 eV: ce sont les PI des formes kéto et énol, respectivement. Ces deux valeurs sont en accord avec les mesures de la référence ²⁴ (8,4479 et 8,9384 eV), au regard de notre incertitude expérimentale de 15 meV. La position en énergie de l'état fondamental vibrationnel du premier état excité (1,15 eV au-dessus de l'état fondamental) calculée avec une méthode de chimie quantique extrêmement pointue (CASSCF/MRCI/cc-pVDZ) ²⁷ est notée sur le spectre.

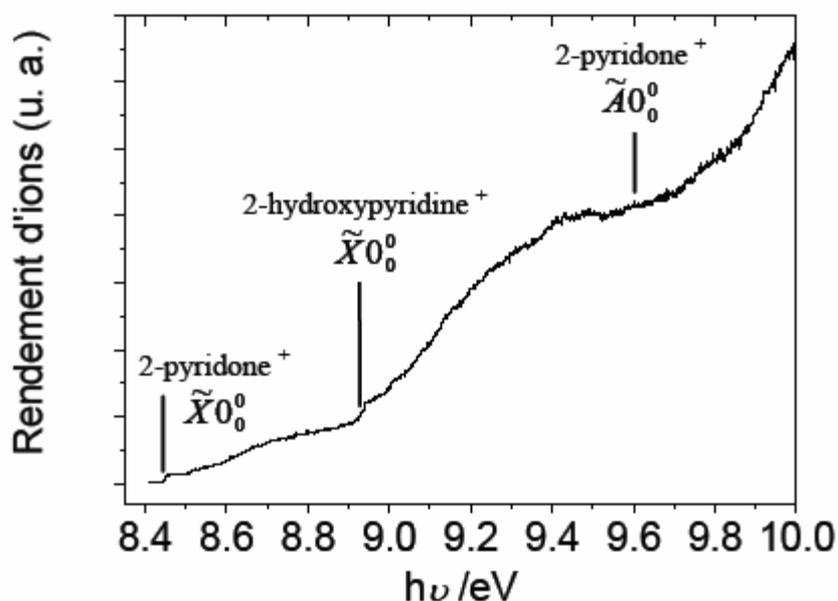


Figure 14: spectre du rendement d'ions obtenu par photo-ionisation de la 2-pyridone dans la gamme d'énergie 8,4-10 eV. Les positions des deux PI expérimentaux des tautomères ainsi que celle du premier état excité de la forme kéto calculé au niveau CASSCF/MRCI/cc-pVDZ sont notées par des barres verticales.

4.3 Spectres de photoélectrons 1D

Pour connaître précisément la position des transitions vibrationnelles des cations étudiés, il faut déduire des données le spectre de photoélectrons de seuil. Comme je l'ai expliqué précédemment, nous avons utilisé le spectre 2D redressé pour augmenter le rapport signal/bruit en additionnant les contributions des électrons d'énergie cinétique comprise entre 0 et 75 meV. Cela donne le spectre de la Figure 15, appelé SPES pour « Slow PhotoElectrons Spectrum ». Le contraste avec le spectre du rendement d'ions est saisissant: des pics très bien résolus sont visibles jusqu'à des énergies de l'ordre de 9,6 eV. Au-delà, les structures éventuelles sont noyées dans un fond très large. Les pics les plus intenses sont dus aux transitions vers les états fondamentaux vibrationnels des formes kéto et énol, notés sur le spectre par des barres verticales, mais l'excitation de certains modes de vibration est également visible. La 2-pyridone possède 30 modes, et afin d'attribuer ces pics à des modes précis, il faut connaître les règles de sélection des transitions en photo-ionisation. Celles-ci dépendent de la géométrie de l'espèce neutre et ionisée: dans le cas de la forme kéto, la molécule et l'ion sont tous deux plans, c'est-à-dire de symétrie C_s , toutes les transitions sont donc *a priori* autorisées. Par contre, il y a rupture de symétrie entre la forme énol neutre, qui est plane, et son cation, qui n'a pas de symétrie particulière. Seules sont autorisées des combinaisons de nombres pairs de quanta de vibration pour les modes de vibration dont les mouvements atomiques se situent dans le plan, c'est-à-dire les modes 22 à 30. Les modes 1 à 21 n'ont pas de restriction. La première partie du spectre, entre 8,4 et 8,9 eV, contient des transitions

dues à la forme kéto de la 2-pyridone. La transition 0-0 domine largement, ce qui est cohérent avec le fait que les géométries soient très proches dans le tautomère kéto neutre et ionisé. Les bandes de plus basse énergie et de très faible intensité sont le signe que les niveaux vibrationnels excités dans la molécule neutre sont très faiblement peuplés et donc que la température est basse dans le jet supersonique. Les transitions d'intensité moyenne entre 8,5 et 8,8 eV sont des absorptions de modes de vibration: l'attribution de la majorité des pics a pu être faite et elle est présentée dans le Tableau 1. Cela a été possible grâce aux calculs anharmoniques au niveau PBE0/6-311+G(d,p) réalisés par D. Hammoutène (résultats pas encore publiés). La position du pic à 8,450 eV dû à la transition 0-0 est en bon accord avec la valeur des mesures de photoélectrons de seuil (ZEKE) de 8,4479 eV. Comme on peut le constater dans le Tableau 1, les modes de vibration sont majoritairement excités une seule fois, même si les modes 20 et 18 présentent de brèves progressions. Ceci est la conséquence du fait que le facteur de Frank-Condon est bien plus élevé pour les transitions à partir du fondamental. Les valeurs expérimentales sont très proches de celles mesurées par la technique ZEKE (déviations inférieures à 5 cm^{-1}) mais un peu plus éloignées des calculs (11 cm^{-1} en moyenne).

La transition 0-0 de la forme énol ionisée a été mesurée à 8,9384 eV par Ozeki *et al.*²⁴ alors qu'elle apparaît à 8,940 eV dans le spectre SPES, ce qui est cohérent. Contrairement au cas de la forme kéto, les bandes dues à l'excitation de modes de vibration sont intenses. Le changement de géométrie et la rupture de symétrie après ionisation sont à l'origine de cette particularité. On peut également remarquer la présence d'un fond large qui est peut-être le signe d'états auto-ionisants à courte durée de vie similaires à ceux observés pour H_2S par les auteurs de la référence¹. Les bandes mesurées pour ce tautomère sont larges et composées de pics plus fins. La comparaison avec les calculs de D. Hammoutène et les propositions d'attribution sont présentées dans le Tableau 1. Contrairement au cas de l'autre tautomère, certains pics n'ont pas pu être attribués, et des transitions calculées ne sont pas observées, par exemple les quatre plus basses en énergie. Par contre, les déviations sont plus faibles (7 cm^{-1} en moyenne si l'on ne tient pas compte du mode 1, attribuable à l'élongation de la liaison OH, qui est prédit avec une erreur de 35 cm^{-1}) que pour la forme kéto. De plus, les progressions concernent plus de modes, soit 9 sur les 13 observés.

Les calculs au niveau CASSCF issus de la référence²⁷ prédisent que le premier état excité du tautomère kéto ionisé est situé à 1,150 eV au-dessus de l'état électronique fondamental. Or nous observons une bande large entre 9,5 et 9,6 eV qui peut donc être attribuée à cet état. Les bandes très intenses à plus haute énergie sont sans doute des transitions vibrationnelles de l'ion dans son premier état excité ou/et des états auto-ionisants de l'espèce neutre.

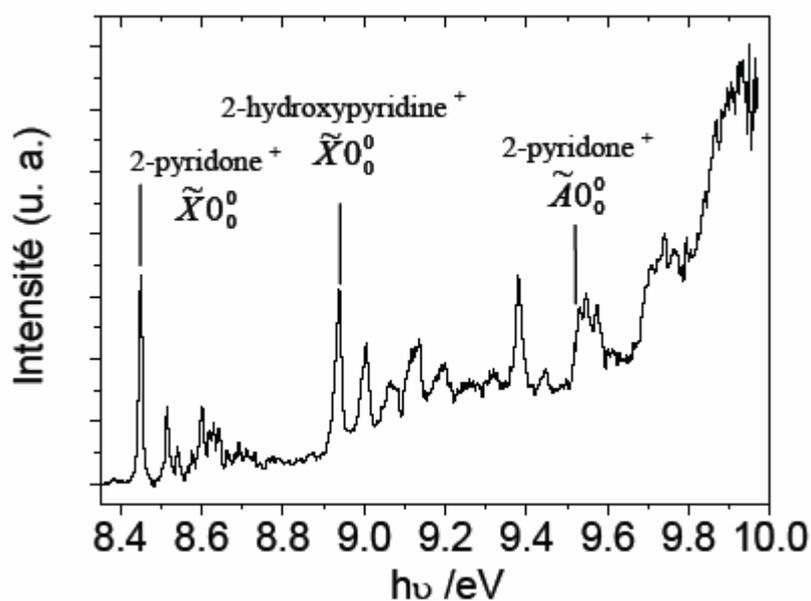


Figure 15: spectre SPES des deux tautomères de la 2-pyridone⁺ déduit de la Figure 13 pour les électrons d'énergie cinétique inférieure à 75 meV. Les pics révélant les états fondamentaux des deux tautomères ionisés ainsi que le premier état excité de la forme kéto sont indiqués par des barres verticales.

Tableau 1: attribution des bandes observées dans le spectre de la Figure 15.

2-Pyridone ⁺ (forme kéto)			2-Hydroxypyridine ⁺ (forme éno)		
Etat fondamental D ₀			Etat fondamental D ₀		
Attribution proposée	Energie des photons / eV	Nombre d'onde / cm ⁻¹	Attribution proposée	Energie des photons / eV	Nombre d'onde / cm ⁻¹
$\tilde{X}0_0^0$	8.450	0 ^c	$\tilde{X}0_0^0$	8.940	0 ^c
$\tilde{X}20_0^1$	8.515	520; 520 ^a ; 532 ^b	$\tilde{X}26_0^1$	9.005	534; 534 ^b
$\tilde{X}18_0^1$	8.542	739; 770 ^b	$\tilde{X}22_0^1$	9.032	750; 749 ^b
$\tilde{X}21_0^2$	8.566	932; 897 ^b	$\tilde{X}20_0^1$	9.044	847; 845 ^b
$\tilde{X}16_0^1$	8.575	1005; 1001 ^a ; 1019 ^b	$\tilde{X}18_0^1$	9.059	980; 981 ^b
$\tilde{X}20_0^2$	8.579	1041; 1064 ^b	$\tilde{X}16_0^1$	9.064	1016; 1015 ^b
$\tilde{X}13_0^1$	8.602	1223; 1219 ^a ; 1212 ^b	$\tilde{X}15_0^1$	9.076	1103; 1096 ^b
$\tilde{X}11_0^1$	8.618	1356; 1356 ^b	$\tilde{X}13_0^1$	9.082	1155; 1149 ^b

$\tilde{X}10_0^1$	8.630	1452; 1455 ^b	$\tilde{X}12_0^1$	9.103	1321; 1329 ^b
$\tilde{X}9_0^1$	8.630	1452; 1457 ^a ; 1458 ^b	$\tilde{X}10_0^1$	9.112	1393; 1413 ^b
$\tilde{X}18_0^2$	8.641	1537; 1541 ^b	$\tilde{X}9_0^1$	9.120	1454; 1450 ^b
$\tilde{X}8_0^1$	8.645	1573; 1572 ^a ; 1562 ^b	$\tilde{X}7_0^1$	9.136	1587; 1589 ^b
$\tilde{X}7_0^1$	8.645	1573; 1572 ^a ; 1568 ^b	$\tilde{X}20_0^2$	9.149	1696; 1690 ^b
$\tilde{X}24_0^1 25_0^1$	8.663	1719; 1724 ^b	$\tilde{X}19_0^2$	9.178	1924; 1931 ^b
$\tilde{X}20_0^1 8_0^1$	8.710	2094; 2094 ^b	$\tilde{X}16_0^2$	9.190	2021; 2030 ^b
$\tilde{X}20_0^1 7_0^1$	8.710	2094; 2101 ^b	$\tilde{X}15_0^2$	9.213	2202; 2192 ^b
Premier état excité D₁			$\tilde{X}12_0^2$	9.271	2674; 2658 ^b
$\tilde{A}0_0^0$	9.547	0 ^c	$\tilde{X}11_0^2$	9.277	2722; 2731 ^b
	9.574	347	$\tilde{X}9_0^2$	9.301	2916; 2900 ^b
			$\tilde{X}5_0^1$	9.319	3061; 3063 ^b
			$\tilde{X}6_0^2$	9.336	3194; 3189 ^b
			$\tilde{X}1_0^1$	9.379	3545; 3580 ^b
			$\tilde{X}1_0^1 26_0^1$	9.448	4102; 4114 ^b

^a Valeurs tirées des mesures ZEKE de la référence ²⁴.

^b Résultats des calculs au niveau PBE0/6-311+G(d,p).

^c Valeur prise comme référence pour les autres fréquences de vibration.

- (1) Hochlaf, M.; Weitzel, K.-M.; Ng, C. Y. *The Journal of Chemical Physics* **2004**, *120*, 6944.
- (2) Garcia, G. A.; Soldi-Lose, H.; Nahon, L. *Review of Scientific Instruments* **2009**, *80*, 023102.
- (3) Frey, R. L., Andreas Müller, Samuel Leutwyler, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1494.
- (4) Held, A.; Pratt, D. W. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 8629.
- (5) Matsuda, Y.; Ebata, T.; Mikami, N. *The Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 8397.
- (6) Muller, A.; Leutwyler, S. *Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108*, 6156.
- (7) Muller, A.; Losada, M.; Leutwyler, S. *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108*, 157.
- (8) SUKHODUB, L. F.; YANSON, I. K. *Nature* **1976**, *264*, 245.
- (9) Nimlos, M. R.; Kelley, D. F.; Bernstein, E. R. *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*, 643.
- (10) Scanlan, M. J.; Hillier, I. H. *Chemical Physics Letters* **1984**, *107*, 330.
- (11) Abdulla, H. I.; El-Bermani, M. F. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2001**, *57*, 2659.
- (12) Gallant, M.; Tan, P. V. M.; Wuest, J. D. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *113*, 721.
- (13) Hatherley, L. D.; Brown, R. D.; Godfrey, P. D.; Pierlot, A. P.; Caminati, W.; Damiani, D.; Melandri, S.; Favero, L. B. *Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 46.
- (14) Tanjaroorn, C.; Subramanian, R.; Karunatilaka, C.; Kukolich, S. G. *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, *108*, 9531.
- (15) Muller, A.; Talbot, F.; Leutwyler, S. *The Journal of Chemical Physics* **2002**, *116*, 2836.
- (16) Nowak, M. J.; Lapinski, L.; Fulara, J.; Les, A.; Adamowicz, L. *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 1562.
- (17) Lapinski, L.; Nowak, M. J.; Fulara, J.; Les, A.; Adamowicz, L. *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96*, 6250.
- (18) Frey, J. A.; Leist, R.; Tanner, C.; Frey, H.-M.; Leutwyler, S. *The Journal of Chemical Physics* **2006**, *125*, 114308.
- (19) Matsuda, Y.; Ebata, T.; Mikami, N. *The Journal of Chemical Physics* **2000**, *113*, 573.
- (20) Held, A.; Champagne, B. B.; Pratt, D. W. *The Journal of Chemical Physics* **1991**, *95*, 8732.
- (21) Barone, V.; Adamo, C. *The Journal of Physical Chemistry* **2002**, *99*, 15062.
- (22) Stefanovic, D.; Grützmacher, H. F. *Organic Mass Spectrometry* **1974**, *9*, 1052.
- (23) Cook, S. E.-A., A. R. Katritzky, C. Guimon and G. Pfister-Guillouzo. *Journal of the Chemical Society - Perkins Transactions 2* **1977**, 1652.
- (24) Ozeki, H.; Cockett, M. C. R.; Okuyama, K.; Takahashi, M.; Kimura, K. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 8608.
- (25) Lee, D.; Baek, S. J.; Choi, K.-W.; Choi, Y. S.; Kim, S. K. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2002**, *23*, 277.
- (26) Trikoupis, M. A.; Gerbaux, P.; Lavorato, D. J.; Flammang, R.; Terlouw, J. K. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *217*, 1.
- (27) Hammoutène, D.; Hochlaf, M.; Ciofini, I.; Adamo, C. *International Journal of Quantum Chemistry* **2009**, *accepted*.

Résumé : Les caractéristiques structurales et les interactions intra et/ou intermoléculaires non-covalentes jouent un rôle primordial dans l'activité des molécules d'intérêt biologique, notamment lors de la reconnaissance moléculaire entre un médicament et son récepteur. Par ailleurs, on peut connaître par les études en phase gazeuse (sans les effets du solvant) les propriétés intrinsèques des systèmes moléculaires. Des calculs de chimie quantique élaborés peuvent ainsi être comparés aux résultats des expériences pour en tirer des informations précises. L'équipe AMIBES tente ainsi de décrire les structures de peptides, d'oligonucléotides ou de complexes d'intérêt pharmaceutiques. Pour cela, nous prenons appui sur deux techniques expérimentales complémentaires, la spectroscopie IRMPD et la spectrométrie de mobilité ionique, dont les résultats sont comparés avec des simulations. Dans ce travail de thèse, j'ai d'abord testé les prédictions d'une méthode QM/MM en ce qui concerne le calcul des spectres IR d'espèces d'intérêt biologique isolées. J'ai ensuite utilisé cette méthode pour simuler les spectres IR de brins de la protéine amyloïde β en phase gazeuse. Il ressort de ces études que leur structure secondaire varie selon l'état de protonation et le solvant dans lequel ils sont dissous: un solvant polaire favorise les structures globulaires, alors qu'une constante diélectrique plus basse permet de conserver une structure en hélice α . Je me suis également intéressé aux changements de structure induits par la complexation d'un antibiotique, la vancomycine, avec un modèle de son récepteur. En mode positif, le site de fixation de celui-ci est différent de celui révélé par la cristallographie, mais les interactions spécifiques responsables de la grande constante d'affinité en solution sont conservées dans le complexe déprotoné.

Mots Clés : Protéine amyloïde β ; antibiotique vancomycine; reconnaissance moléculaire spécifique; spectroscopie IR; spectrométrie de mobilité ionique; spectrométrie de masse; calculs de chimie quantique.

Abstract: Structural properties and noncovalent interactions within biologically relevant molecular systems are crucial for their activity. They are especially important for the specific binding of drugs on receptors in living organisms. Besides, studying molecules in the gas phase allows measuring their intrinsic properties because of the absence of solvent effects. Precise information can then be extracted from the comparison between experimental data and state-of-the-art quantum chemistry calculations. Our research group aims to describe the structural changes occurring within peptides, oligonucleotides and pharmaceutically relevant complexes: we compare results from simulations and two complementary experimental techniques, IRMPD spectroscopy and ion mobility spectrometry. In this PhD thesis, I have tested for the first time the performances of a QM/MM method for the simulation of the IR spectra of isolated biomolecular systems. It allowed me to simulate the IR spectrum of amyloid β -protein strands containing more than 250 atoms. We found that the solvent in which these strands are diluted has a big influence on their gas-phase secondary structure: in the case of polar solvents, globular ones dominate, whereas a weak dielectric constant tends to favor helical structures. The structural changes upon receptor binding on vancomycin, a glycopeptide antibiotic, have also been studied. The receptor binding site in the protonated complexes is not the pocket which can be seen in X-ray scattering data, but the specific interactions responsible for the high binding constant of the complex in solution remains intact in the deprotonated species.

Keywords: amyloid β -protein; vancomycin antibiotic; specific molecular recognition; IR spectroscopy; ion mobility spectrometry; mass spectrometry; quantum chemistry calculations.