



**HAL**  
open science

# Etude conformationnelle de peptides et protéines par mesure de mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse

Florian Albrieux

## ► To cite this version:

Florian Albrieux. Etude conformationnelle de peptides et protéines par mesure de mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10097 . tel-00594601v2

**HAL Id: tel-00594601**

**<https://theses.hal.science/tel-00594601v2>**

Submitted on 17 Sep 2013

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

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

**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
Ecole doctorale de physique et astrophysique  
Pour l'obtention du  
**DIPLOME DE DOCTORAT**  
(arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 2010  
par

**Florian ALBRIEUX**

**Etude conformationnelle de peptides et protéines par  
mesure de mobilité ionique couplée à la spectrométrie  
de masse**

Directeur de thèse : Philippe Dugourd  
Co-directeur de thèse : Jérôme Lemoine

JURY :

Pr. Jean-marie Schmitter, rapporteur  
Dr. Gerard Bolbach, rapporteur  
Pr. Yury Tsybin, président du Jury  
Dr. Daniel Borgis, examinateur  
Dr. Fabien Chiro, examinateur  
Dr. Philippe Dugourd, directeur de thèse  
Pr. Jérôme Lemoine, co-directeur de thèse









**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
Ecole doctorale de physique et astrophysique  
Pour l'obtention du  
**DIPLOME DE DOCTORAT**  
(arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 2010  
par

**Florian ALBRIEUX**

**Etude conformationnelle de peptides et protéines par  
mesure de mobilité ionique couplée à la spectrométrie  
de masse**

Directeur de thèse : Philippe Dugourd  
Co-directeur de thèse : Jérôme Lemoine

JURY :

Pr. Jean-marie Schmitter, rapporteur  
Dr. Gerard Bolbach, rapporteur  
Pr. Yury Tsybin, président du Jury  
Dr. Daniel Borgis, examinateur  
Dr. Fabien Chiro, examinateur  
Dr. Philippe Dugourd, directeur de thèse  
Pr. Jérôme Lemoine, co-directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

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

Secrétaire Général

**M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard



# Remerciements

"Nous mourrons mais nos actes ne meurent pas, car ils se perpétuent dans leurs conséquences infinies. Passants d'un jour, nos pas laissent dans le sable de la route des traces éternelles. Rien n'arrive qui n'ait été déterminé par ce qui l'a précédé et l'avenir est fait des prolongements inconnus du passé."

Jules Verne

Je tiens tout d'abord à remercier Christian Bordas pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire.

Philippe Dugourd et Jérôme Lemoine ont dirigé cette thèse et m'ont donné goût à l'aventure scientifique. Leurs expériences, leurs compétences, leurs disponibilités et leurs écoutes m'ont permis d'avancer dans mon projet. Rodolphe Antoine a participé au développement de l'expérience et plus particulièrement aux différentes simulations d'optiques ioniques. Je tiens à le remercier pour son aide et pour toutes les discussions que l'on a pu avoir durant ces trois années. Je tiens également à remercier Fabien Chirot, le responsable de la plateforme MS+, qui a grandement participé à ce travail de thèse. Tant sur le plan humain que scientifique. J'ai également beaucoup appris à travers nos différentes discussions que ce soit au labo ou au bar des Charpenes, ce fut très agréable de travailler avec toi.

Je tiens à remercier Florent Calvo pour m'avoir initié aux joies de la chimie théorique et de m'avoir permis d'entrevoir le comportement des biomolécules en phase gazeuse.

Je tiens également à remercier Renaud Ballivian qui a participé au développement de l'expérience.

L'objectif premier étant de développer une expérience de mobilité ionique, toute ma gratitude va aux techniciens et aux ingénieurs qui ont permis de rendre ce développement possible : Marc Barbaire, Christian Clavier, Xavier Dagany et Jacques Maurelli.

Il y a également toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à cette étude. Tout d'abord l'équipe SpéctroBio : Michel Broyer, Driss Rayane, Isabelle Compagnon, Franck

Bertorelle, Bruno Bellina, Claire Brunet, Quentin Enjalbert, Ramzy Hamouda, Laure Joly, Amandine Racaud, Thibault Tabarin et Li Binh An Tran.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du LASIM.

Il faut savoir aussi sortir la tête de l'eau par moment et dans ce cas il n'y a rien de mieux que les amis : yoann, julien, alex, maze, truand, burt, roux, chose, mba, pat, pierra, Varg et dimenzion poznave.

La famille reste un pilier et permet de garder les pieds sur terre, je tiens à remercier mes parents sans qui cette aventure n'aurait pu avoir lieu, mais également mon frère et mes grands-mères.

A la fin de ce voyage scientifique il a fallu présenter mes résultats devant un jury de spécialiste. Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à tous les membres du jury pour leurs remarques pertinentes et les questions constructives qu'ils ont pu me poser durant ma soutenance. Tout particulièrement Yury Tsybin qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse ainsi que Jean-Marie Schmitter et Gérard Bolbach qui ont accepté de rapporter ce travail de thèse. Je tiens également à remercier Daniel Borgis qui a participé à mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier Marine, qui m'a réconforté dans les périodes de doutes. Elle a grandement participé à la correction du manuscrit. De plus elle m'a supporté au jour le jour durant la rédaction...

Enfin je remercie les personnes qui liront ce manuscrit.

*A Marcel,*





# SOMMAIRE :

<b>Introduction :</b> .....	1
<b>Chapitre1 : La mobilité ionique : théorie et techniques expérimentales</b> .....	9
I. Principe : .....	10
II. Théorie : .....	11
1. Mouvement des ions en régime de diffusion .....	11
2. Dispersion des ions et résolution.....	13
3. Limite du régime de diffusion.....	15
4. Relation entre mobilité ionique et section efficace de collision.....	16
III. Les techniques expérimentales.....	19
1. Les fondements (1850 et 1938).....	19
2. Les débuts de la mobilité ionique (1948 et 1970).....	19
3. Les composants d'une expérience de mobilité ionique.....	20
a. La source d'ionisation : .....	20
b. L'injection des ions : .....	25
c. L'analyseur:.....	27
d. Le détecteur : .....	30
4. Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IMMS) .....	30
IV. De la section efficace expérimentale à la détermination de structure :.....	33
1. La détermination de structures : .....	33
2. Géométries versus section efficace de collision.....	34
<b>Chapitre2 : Dispositif et développements instrumentaux</b> .....	41
I. Présentation générale : .....	42
II. MicroQTOF : .....	42
III. Développement instrumental : .....	47
1. Le modèle de simulation : .....	48
a. Simion 3D 7.0 : .....	48
b. Description du modèle : .....	49
2. Test de validité du modèle dans un champ électrique statique : .....	51
3. Test de validité du modèle dans un champ radiofréquence : .....	53
4. Piège ionique cylindrique fonctionnant à haute pression :.....	55
IV. Fonctionnement de l'expérience : .....	64
1. Principe : .....	64
2. Interfaces de contrôle : .....	65
3. Traitement des résultats : .....	67
4. Optimisation des paramètres : .....	70
V. Conclusion : .....	71
<b>Chapitre3 : Etude de l'influence du résidu central sur une série de polyalanines et de polyglycines</b> .....	73
I. Introduction : .....	74
II. Méthodes utilisées : .....	75
1. Synthèse des peptides : .....	75
2. Analyse par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse :.....	76
3. Simulations numériques : .....	76

III. Résultats :	77
1. Polyalanines :	77
2. Polyglycines :	84
IV. Discussion :	88
V. Conclusion :	91
Appendice A, Simulations numériques :	A

## **Chapitre4** : Etude de l'influence de la séquence sur la stabilisation de la structure secondaire d'un peptide

I. Introduction :	94
II. Systèmes étudiés :	96
III. Résultats préliminaires obtenus par ECD :	97
1. Dispositif expérimental :	97
2. Principe de l'ECD :	97
3. Résultats :	98
IV. Résultats de mobilité ionique :	100
1. Protocole expérimentaux et théorique :	100
2. Résultats expérimentaux :	100
3. Résultats des simulations REMD :	104
V. Discussion :	107
1. Comparaison des calculs avec les expériences :	107
2. Forme des profils expérimentaux de section efficace :	112
3. ECD vs mobilité ionique :	114
VI. Conclusion :	115

## **Chapitre5** : Etude de protéines en phase gazeuse

I. Introduction :	120
II. Structure des protéines en phase gazeuse :	122
1. Structure en fonction de l'état de charge et de la solution :	122
2. ESI vs ESSI :	124
III. Lysozyme, dépliement et repliement	128
1. Réversibilité du processus de dénaturation réduction et renaturation oxydation du lysozyme :	131
a. Protocole de réduction	131
b. Protocole d'oxydation :	134
2. Cyanilation des groupements sulfhydriles après réduction totale :	135
3. Piégeages des intermédiaires de réduction :	137
4. Perspectives :	139
IV. Conclusion :	140

## **Conclusions et perspectives**

ANNEXE 1 : Structure et diagramme de Ramachandran de la série des polyalanines	I
ANNEXE 2 : Structure et diagramme de Ramachandran de la série des polyglycines	VII
ANNEXE 3 : Diagrammes de fragmentation ECD pour la partie transmembranaire de la protéine M2 et de certains variants.	XIII
ANNEXE 4 : Publication Ocytocine-cuivre	XIX

# **Introduction**

Les protéines et les peptides sont des macromolécules composées d'une série d'acides aminés. Il existe 20 acides aminés naturels qui sont les briques élémentaires de ces polymères, leur formule générale est la suivante,

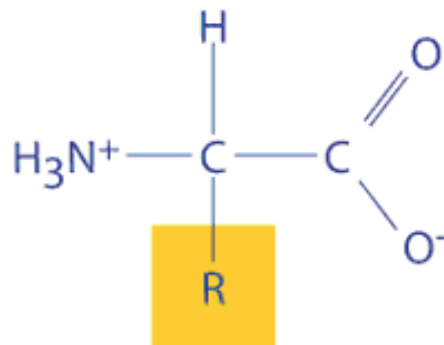


Figure 1 : Structure des acides aminés.

Chaque acide aminé a un groupement R différent qui lui confère une propriété physico-chimique particulière (acide, basique, hydrophile, hydrophobe, encombrement stérique, etc). Les acides aminés sont polymérisés via la liaison peptidique établie entre la fonction carboxyle et la fonction amine. Ces systèmes ont la propriété de se replier et d'adopter différentes conformations qui conditionne en partie leurs fonctions. Il existe différents niveaux de structuration, (i) primaire qui correspond à l'enchaînement d'acides aminés, (ii) secondaire qui correspond au repliement local de quelques acides aminés (hélices et feuillets béta principalement), (iii) tertiaire qui correspond à la structure en trois dimensions des différents sous domaines secondaires, (iv) et quaternaire qui correspond à l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques. Pour élucider le repliement des peptides et des protéines structurés différentes techniques analytiques existent, dont les plus courantes sont la diffraction des rayons X (DRX) et la résonance magnétique nucléaire<sup>1</sup> (RMN). De nouvelles méthodes, principalement en RMN, permettent de faire un suivi dynamique du repliement en temps réel, en utilisant les techniques de RMN en temps réel<sup>2,3</sup> et de H/D exchange pulsé. Nous pouvons aussi citer les méthodes spectroscopiques telles que le dichroïsme circulaire et la fluorescence. Les analyses en RMN sont réalisées en phase liquide, tandis que la DRX utilise un monocristal. La compréhension des mécanismes qui gouvernent la dynamique de repliement et la structuration des protéines est l'un des enjeux actuels de la biologie structurale. La stabilité d'une structure résulte d'un équilibre entre les interactions intrinsèques et extrinsèques. En phase liquide, le solvant, l'interaction avec des ions du milieu ou d'autres biomolécules, jouent un rôle crucial sur la stabilisation des structures. On assiste également à un développement des études en phase gazeuse, domaine dans lequel s'inscrit

mon travail de thèse. Ces études en phase gazeuse permettent d'observer les facteurs intrinsèques qui stabilisent ces structures. Une des méthodes utilisées en phase gazeuse est l'échange H/D<sup>4,5</sup>. Bien que l'échange soit réalisé en phase liquide et résulte d'une structure en solution, l'analyse est réalisée en spectrométrie de masse haute résolution en phase gazeuse. Le principe consiste à échanger les protons labiles par des deutériums et d'analyser le décalage en masse. On peut ainsi cartographier la surface accessible de la protéine. Ces études peuvent aussi délimiter les zones en interaction au sein de complexes supramoléculaires. La spectroscopie d'action infrarouge<sup>6-9</sup> est une méthode qui permet de faire des études très précises sur la structure de peptide. En effet la signature optique permet de déterminer les liaisons hydrogène présentes dans la structure observée. Cette spectroscopie est dite d'action, puisqu'en pratique on ne peut pas mesurer l'absorption en phase gazeuse à cause de la faible densité d'ions piégés. Une des techniques utilisées est l'enregistrement des spectres de masse en fonction de la longueur d'onde injectée en trappe. S'il y a absorption il y aura fragmentation de l'ion étudié. Ainsi on peut obtenir des spectres IR qui peuvent être comparés à des structures candidates obtenues par des calculs de dynamique moléculaire ou de chimie quantique. Une autre technique émergente est l'étude de la fluorescence en phase gazeuse<sup>10</sup>. Les mesures de fluorescence<sup>11</sup> en solution permettent de caractériser l'environnement des chromophores de la chaîne peptidique (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et sont notamment utilisées pour caractériser les changements de structure<sup>11</sup>. La méthode FRET<sup>12</sup> (Förster Resonance Energy Transfer) qui est basée sur de la fluorescence, permet de connaître la distance entre deux points marqués par des chromophores dans la protéine. Cette technique commence à être implémentée en phase gazeuse<sup>13</sup>. Une dernière technique qui fait l'objet de mes travaux de thèse est la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IM-MS). La mobilité ionique a été développée dans les années 1960 par Revercomb et Mason<sup>14,15</sup>. Le développement des sources d'ionisation douces<sup>16</sup> en spectrométrie de masse a permis d'étendre son utilisation aux biomolécules. Les travaux pionniers ont été menés par les équipes de M.J. Jarrold<sup>17,18</sup> et de M.T. Bowers<sup>19</sup> qui ont étudié la conformation de biomolécules grâce à l'IM-MS. Il existe deux types d'approches en IM-MS. La première est une étude de la conformation de systèmes choisis. La mobilité ionique permet alors de déterminer la section efficace de collision, et des calculs permettent de proposer des structures. En comparant théorie et expérience, on peut ainsi identifier des structures candidates. Cette approche a été utilisée par exemple par M.J. Jarrold<sup>20</sup> et M. Kappes<sup>21,22</sup> lors de l'étude d'agrégats atomiques<sup>23,24</sup>. Le groupe de M.T. Bowers a fait de nombreuses études sur la structure des biomolécules<sup>25-28</sup>.

La seconde approche consiste à utiliser la mobilité ionique comme méthode séparative dans l'étude d'échantillons complexes. Nous pouvons citer les travaux du groupe de H. Hill<sup>29,30</sup>, de R.D. Smith<sup>31,32</sup> de D.H. Russel<sup>33,34</sup> et de D. Clemmer<sup>35,36</sup>.

La plupart des appareils utilisés dans les études citées précédemment utilisent des dispositifs et montages expérimentaux conçus et développés par les laboratoires. La société Waters Corporation a cependant mis sur le marché depuis 2006 un spectromètre de masse, le Synapt, permettant de séparer des conformères en amont de l'analyse en masse. La technologie utilisée est un peu différente des tubes de mobilité classique, puisque les champs utilisés ne sont ni constants ni homogènes. Il est difficile avec le Synapt de mesurer directement la section efficace de collision. Néanmoins pour une approche séparative, cet appareil a une sensibilité compatible avec l'étude de produits biologiques. Cet instrument a permis l'étude de différents systèmes tels que les protéines amyloïdes qui sont associées à la maladie d'Alzheimer<sup>37</sup> mais aussi sur des complexes protéiques<sup>38</sup>. L'essor récent de cette technique ouvre la voie au développement de nouveaux instruments toujours plus résolutifs et sensibles<sup>39,40</sup>.

Lors de mon arrivée au LASIM en septembre 2007, l'expérience de mobilité ionique venait d'être assemblée mais aucun spectre de mobilité n'avait encore été enregistré, le signal d'ions étant trop faible. Pour palier ce problème nous avons réalisé des simulations avec le logiciel Simion afin de concevoir un piège ionique cylindrique accolé à un entonnoir à ions. Ce dispositif nous alors permis de réaliser les premières mesures après un an de développement. Après avoir calibré l'expérience sur des systèmes modèles, nous avons pu commencer l'étude de peptides et de protéines.

Une première étude a porté sur le complexe ocytocine-cuivre<sup>41</sup>, couplée à des observations spectroscopiques nous avons étudié l'action du cation sur la structure de cette hormone peptidique.

Plusieurs études conformationnelles ont également concerné des séries de peptides et ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Y. Tsybin de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL). La première concerne une série de polyalanines et de polyglycines de type RA<sub>4</sub>XA<sub>4</sub>K et RG<sub>4</sub>XG<sub>4</sub>K (où X est l'un des vingt acides aminés). Le but dans cette étude était d'observer l'influence de l'acide aminé centrale sur la structure secondaire observée. La seconde portait sur l'étude de la stabilité d'une hélice du domaine transmembranaire de la protéine M2 du virus de la grippe A et de certains variants.

Enfin nous avons initié une étude sur le repliement des protéines en utilisant le modèle du Lysozyme. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes de repliement sous l'influence de l'état d'oxydation de ces ponts disulfures.

Le manuscrit présente tout d'abord un premier chapitre de revue générale sur la mobilité ionique décrivant dans un premier temps les aspects théoriques puis, dans un second temps, les différents composants d'un tel dispositif. La fin du chapitre est consacrée à la mesure d'une section efficace de collision et aux méthodes de dynamique moléculaire qui permettent de proposer une structure et une section efficace théorique.

Le second chapitre présente le développement expérimental et les simulations réalisées. Une première partie est consacrée à l'appareillage, puis une seconde partie aux simulations réalisées. Enfin la dernière partie explique le principe de fonctionnement de l'expérience.

Les trois derniers chapitres sont consacrés aux résultats de trois études que j'ai choisies de vous présenter. Le chapitre 3 concerne les études des séries de peptides homologues, polyalanines et polyglycines, réalisées en collaboration avec l'équipe de Y.Tsybin. Le chapitre 4 porte quant à lui sur l'étude de la stabilité de l'hélice du domaine transmembranaire de la protéine M2 et de ses mutants. Enfin, le dernier chapitre présente les résultats concernant l'étude conformationnelle des protéines en phase gazeuse et plus particulièrement sur le repliement oxydatif du lysozyme.



1 K. Wuthrich, *Nature Structural Biology* **8**, 923-925 (2001).  
2 J. Balbach, V. Forge, N. A. J. Vannuland, S. L. Winder, P. J. Hore, and C. M. Dobson,  
3 *Nature Structural Biology* **2**, 865-870 (1995).  
4 P. Schanda and B. Brutscher, *Journal of the American Chemical Society* **127**, 8014-  
5 8015 (2005).  
6 S. W. Englander, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **17**, 1481-  
7 1489 (2006).  
8 Z. Q. Zhang and D. L. Smith, *Protein Science* **2**, 522-531 (1993).  
9 W. Chin, F. Piuze, I. Dimicoli, and M. Mons, *Physical Chemistry Chemical Physics*  
10 **8**, 1033-1048 (2006).  
11 J. A. Stearns, C. Seaiby, O. V. Boyarkin, and T. R. Rizzo, *Physical Chemistry*  
12 *Chemical Physics* **11**, 125-132 (2009).  
13 A. Abo-Riziq, B. O. Crews, M. P. Callahan, L. Grace, and M. S. de Vries,  
14 *Angewandte Chemie-International Edition* **45**, 5166-5169 (2006).  
15 D. Semrouni, O. P. Balaj, F. Calvo, C. F. Correia, C. Clavaguera, and G. Ohanessian,  
16 *J Am Soc Mass Spectrom* **21**, 728-38.  
17 J. T. Khoury, S. E. Rodriguez-Cruz, and J. H. Parks, *Journal of the American Society*  
18 *for Mass Spectrometry* **13**, 696-708 (2002).  
19 B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, and R. Y. Tsien, *Science* **312**, 217-  
20 224 (2006).  
21 B. Schuler, E. A. Lipman, and W. A. Eaton, *Nature* **419**, 743-747 (2002).  
22 M. Dashtiev, V. Azov, V. Frankevich, L. Scharfenberg, and R. Zenobi, *Journal of the*  
23 *American Society for Mass Spectrometry* **16**, 1481-1487 (2005).  
24 E. W. McDaniel, edited by J. Wiley (New York, 1964), p. pp. 67-76.  
25 H. E. Revercomb and E. A. Mason, *Analytical Chemistry* **47**, 970-983 (1975).  
26 M. Yamashita and J. B. Fenn, *Journal of Physical Chemistry* **88**, 4451-4459 (1984).  
27 D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, and M. F. Jarrold, *Journal of the American Chemical*  
28 *Society* **117**, 10141-10142 (1995).  
K. B. Shelimov, D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, and M. F. Jarrold, *Journal of the*  
*American Chemical Society* **119**, 2240-2248 (1997).  
G. Vonhelden, T. Wyttenbach, and M. T. Bowers, *Science* **267**, 1483-1485 (1995).  
P. Dugourd, R. R. Hudgins, D. E. Clemmer, and M. F. Jarrold, *Review of Scientific*  
*Instruments* **68**, 1122-1129 (1997).  
F. Furche, R. Ahlrichs, P. Weis, C. Jacob, S. Gilb, T. Bierweiler, and M. M. Kappes,  
*Journal of Chemical Physics* **117**, 6982-6990 (2002).  
P. Weis, T. Bierweiler, S. Gilb, and M. M. Kappes, *Chemical Physics Letters* **355**,  
355-364 (2002).  
R. R. Hudgins, P. Dugourd, J. M. Tenenbaum, and M. F. Jarrold, *Physical Review*  
*Letters* **78**, 4213-4216 (1997).  
J. M. Hunter and M. F. Jarrold, *Journal of the American Chemical Society* **117**,  
10317-10324 (1995).  
T. Wyttenbach, G. vonHelden, and M. T. Bowers, *Journal of the American Chemical*  
*Society* **118**, 8355-8364 (1996).  
S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, A. Baumketner, J. E. Shea, G. Bitan, D. B. Teplow,  
and M. T. Bowers, *Journal of the American Chemical Society* **127**, 2075-2084 (2005).  
N. F. Dupuis, C. Wu, J. E. Shea, and M. T. Bowers, *Journal of the American Chemical*  
*Society* **131**, 18283-18292 (2009).  
M. Grabenauer, C. Wu, P. Soto, J. E. Shea, and M. T. Bowers, *Journal of the*  
*American Chemical Society* **132**, 532-539.

- 29 M. Zhu, B. Bendiak, B. Clowers, and H. H. Hill, Jr., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**, 1853-1867 (2009).
- 30 P. Dwivedi, P. Wu, S. J. Klopsch, G. J. Puzon, L. Xun, and H. H. Hill, *Metabolomics* **4**, 63-80 (2008).
- 31 E. S. Baker, E. A. Livesay, D. J. Orton, R. J. Moore, W. F. Danielson, D. C. Prior, Y. M. Ibrahim, B. L. LaMarche, A. M. Mayampurath, A. A. Schepmoes, D. F. Hopkins, K. Q. Tang, R. D. Smith, and M. E. Belov, *Journal of Proteome Research* **9**, 997-1006.
- 32 T. O. Metz, J. S. Page, E. S. Baker, K. Q. Tang, J. Ding, Y. F. Shen, and R. D. Smith, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **27**, 205-214 (2008).
- 33 F. A. Fernandez-Lima, C. Becker, A. M. McKenna, R. P. Rodgers, A. G. Marshall, and D. H. Russell, *Analytical Chemistry* **81**, 9941-9947 (2009).
- 34 B. T. Ruotolo, K. J. Gillig, E. G. Stone, D. H. Russell, K. Fuhrer, M. Gonin, and J. A. Schultz, *International Journal of Mass Spectrometry* **219**, 253-267 (2002).
- 35 S. J. Valentine, M. D. Plasencia, X. Y. Liu, M. Krishnan, S. Naylor, H. R. Udseth, R. D. Smith, and D. E. Clemmer, *Journal of Proteome Research* **5**, 2977-2984 (2006).
- 36 R. T. Kurulugama, S. J. Valentine, R. A. Sowell, and D. E. Clemmer, *Journal of Proteomics* **71**, 318-331 (2008).
- 37 S. L. Bernstein, N. F. Dupuis, N. D. Lazo, T. Wyttenbach, M. M. Condrón, G. Bitan, D. B. Teplow, J. E. Shea, B. T. Ruotolo, C. V. Robinson, and M. T. Bowers, *Nature Chemistry* **1**, 326-331 (2009).
- 38 B. T. Ruotolo, J. L. P. Benesch, A. M. Sandercock, S. J. Hyung, and C. V. Robinson, *Nature Protocols* **3**, 1139-1152 (2008).
- 39 P. R. Kemper, N. F. Dupuis, and M. T. Bowers, *International Journal of Mass Spectrometry* **287**, 46-57 (2009).
- 40 S. I. Merenbloom, R. S. Glaskin, Z. B. Henson, and D. E. Clemmer, *Analytical Chemistry* **81**, 1482-1487 (2009).
- 41 L. Joly, R. Antoine, F. Albrieux, R. Ballivian, M. Broyer, F. Chirot, J. Lemoine, P. Dugourd, C. Greco, R. Mitric, and V. Bonacic-Koutecky, *Journal of Physical Chemistry B* **113**, 11293-11300 (2009).



# Chapitre 1 :

## La mobilité ionique :

### Théorie et techniques expérimentales

I.	Principe :	10
II.	Théorie :	11
1.	Mouvement des ions en régime de diffusion	11
2.	Dispersion des ions et résolution	13
3.	Limite du régime de diffusion	15
4.	Relation entre mobilité ionique et section efficace de collision	16
III.	Les techniques expérimentales	19
1.	Les fondements (1850 et 1938)	19
2.	Les débuts de la mobilité ionique (1948 et 1970)	19
3.	Les composants d'une expérience de mobilité ionique	20
a.	La source d'ionisation :	20
b.	L'injection des ions :	25
c.	L'analyseur:	27
d.	Le détecteur :	30
4.	Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IMMS)	30
IV.	De la section efficace expérimentale à la détermination de structure :	33
1.	La détermination de structures :	33
2.	Géométries versus section efficace de collision	34

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps présenter le principe de la mobilité ionique. Dans une deuxième partie, nous présenterons la théorie de la mobilité ionique. Puis, nous parlerons des techniques expérimentales. Enfin nous parlerons des techniques de détermination de structures et des calculs permettant de comparer les sections efficaces de collision expérimentales et théoriques.

## I. Principe :

La mobilité ionique est la mesure de la vitesse d'un ion dans un gaz sous l'influence d'un champ électrique homogène. L'ion est entraîné par le champ électrique et ralenti par les collisions avec le gaz (comme représenté sur la figure I-1).

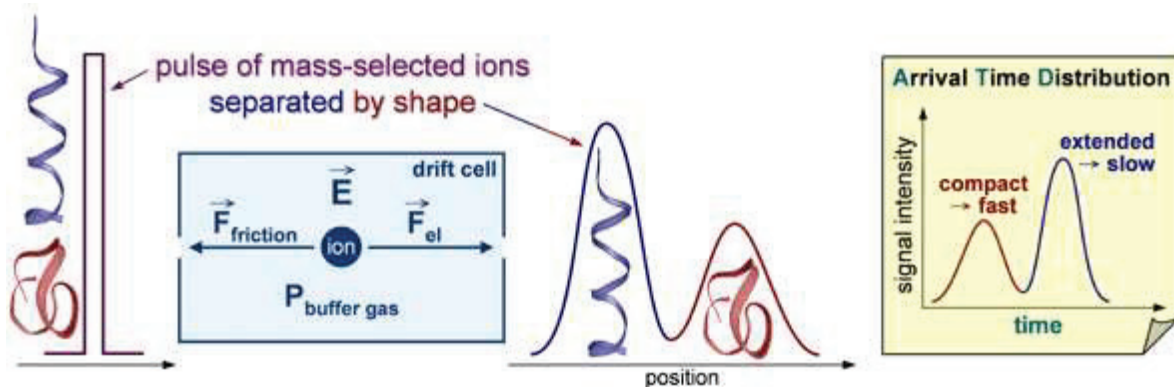


Figure I-1 : Principe de la mesure de mobilité ionique

Une mesure de mobilité ionique consiste à déterminer le temps nécessaire à un ion pour parcourir la distance du tube. Les ions se déplacent à une vitesse constante, leurs temps de diffusion dépendront de leurs sections efficaces de collision et donc de leurs conformations. Plus sa conformation est dépliée, c'est-à-dire plus sa section efficace de collision est élevée, plus la force de frottement sera grande.

La mobilité ionique est une technique analytique qui permet (i) de faire de la séparation d'ions en fonction de leurs conformations (ii) de déterminer la section efficace de collision d'un ion et de remonter ainsi à sa géométrie. Cette technique, couplée à la spectrométrie de masse<sup>1,2</sup> est un outil puissant notamment dans la résolution d'isomères conformationnelles<sup>3,4</sup>, dans l'étude de complexes protéiques<sup>5</sup> ainsi que dans le repliement de protéines.

## II. Théorie :

### 1. Mouvement des ions en régime de diffusion

En première approximation, le régime de mobilité est un régime de diffusion, les collisions sont des collisions élastiques. Dans ces conditions le temps de dérive (drift time :  $t_d$ ) d'un ion à travers le tube de mobilité ionique ne dépend que du nombre de collision avec le gaz tampon, du champ électrique, de la température et de la pression. La vitesse moyenne d'un ion dans un gaz est appelée la vitesse de diffusion ( $v_d$ ), elle est proportionnelle à l'intensité du champ électrique (E):

$$v_d = KE \quad \text{eq. II-1}$$

Le coefficient de proportionnalité K est appelé mobilité ionique. Le temps de dérive est ainsi inversement proportionnel à K. Cette grandeur est dépendante de la température, de la nature du gaz tampon et de la pression.

On atteint très vite le régime à vitesse constante. La démonstration suivante permet d'obtenir un ordre de grandeur du temps pour lequel cette vitesse est atteinte. Si la vitesse est constante on a d'après le théorème fondamental de la dynamique,

$$\vec{a} = \frac{d\vec{v}}{dt} = 0 = \frac{\sum \vec{F}_{ext}}{m} \quad \text{eq. II-2}$$

Il y a deux forces exercées sur le système, une force due au champ électrique et une force de friction (Cf. Figure I-1),

$$q\vec{E} = \gamma\vec{v}_d \quad \text{eq. II-3}$$

Avec q la charge de l'ion, E le champ électrique,  $\gamma$  le coefficient de friction et  $v_d$  la vitesse de diffusion. En projetant les vecteurs selon l'axe x (qui est l'axe de déplacement des ions et du champ électrique) et en utilisant l'équation II-1 on obtient,

$$\frac{q}{\gamma} = K \quad \text{eq. II-4}$$

Si on se place maintenant dans le régime transitoire, la variation de la vitesse en fonction du temps est donnée par,

$$\frac{dv}{dt} = \frac{qE}{m} - \frac{\gamma v}{m} \quad \text{eq. II-5}$$

En utilisant l'équation II-4 et en l'injectant dans II-5 on obtient,

$$\frac{dv}{dt} = \frac{qE}{m} - \frac{q}{Km} v \quad \text{eq. II-6}$$

Ainsi  $Km/q = \tau$ , avec  $\tau$  le temps caractéristique de la variation de la vitesse par rapport au temps. En prenant  $10\tau$  on a un ordre de grandeur sur le temps à partir duquel la vitesse devient constante. Pour l'application numérique on utilise les grandeurs physiques relatives à l'ion bradykinine deux fois chargées ( $m=1060\text{uma}$  et  $K=3.7.10^{-2} \text{ V}^{-1}.\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  pour une pression de 10Torr et une température de 298 K). On obtient  $2\mu\text{s}$  en faisant l'application numérique, ce qui par rapport au temps de diffusion de notre expérience (48ms pour l'ion  $2+$  de la bradykinine) est négligeable.

On peut s'affranchir de la pression (P) et de la température (T) dans le tube, en introduisant la mobilité réduite  $K_0$ ,

$$K_0 = K \frac{PT_0}{TP_0} \quad \text{eq. II-7}$$

Avec  $T_0$  et  $P_0$  la température et pression dans les conditions standards.

Le coefficient de mobilité  $K$  peut être relié à la valeur du coefficient de diffusion  $D$  de l'ion dans le gaz qui décrit le mouvement brownien d'un ion dans un gaz. On considère qu'il n'y a pas de gradient de température et la densité des ions est telle que l'on néglige la répulsion coulombienne. Un gradient de concentration  $\nabla_n$  engendre un courant d'ions : les ions vont migrer des régions à forte concentration vers des zones à faible concentration à un taux proportionnel à l'intensité du gradient de concentration, en accord avec la loi de Fick :

$$J = -D\nabla_n \quad \text{eq. II-8}$$

Où  $J$  est le nombre d'ions qui diffuse à travers une unité d'aire par unité de temps.  $J$  est égal au produit de la vitesse de diffusion des ions ( $v$ ) et du nombre d'ions par unité de volume ( $n$ ),

$$J = vn \quad \text{eq. II-9}$$

En combinant les deux dernières équations on obtient,

$$vn = -D\nabla_n \quad \text{eq. II-10}$$

Le gradient de concentration pour la diffusion selon la direction du champ électrique est défini par  $dn/dx$ . En se plaçant en régime stationnaire on obtient,

$$vn = -D \frac{dn}{dx} = KEn \quad \text{eq. II-11}$$

Le champ électrique dérive du potentiel  $V$  ainsi  $F = -dV/dx$ . Les particules, à l'équilibre thermodynamique, sont alors réparties selon une statistique de Maxwell-Boltzmann,

$$n(x) = n_0 \cdot e^{-\frac{V}{kT}} \quad \text{eq. II-12}$$

Avec  $k$  la constante de Boltzmann. En introduisant ceci dans l'équation II-12 on obtient,

$$v \cdot n_0 e^{-\frac{V}{kT}} = -\frac{D}{kT} \cdot \frac{dV}{dx} \cdot n_0 \cdot e^{-\frac{V}{kT}} \quad \text{eq. II-13}$$

Par réarrangement on obtient la relation de Nernst-Einstein,

$$v = \frac{DF}{kT} \quad \text{eq. II-14}$$

Avec  $v = KE$  et  $F = qE$  on obtient la relation de Nernst-Townsend-Einstein,

$$K = \frac{qD}{kT} \quad \text{eq. II-15}$$

## 2. Dispersion des ions et résolution

La mesure de mobilité ionique donne un profil des temps d'arrivés des ions. A cause du mouvement de diffusion aléatoire ce profil a une largeur temporelle. La densité d'ions à la position  $x$  dans le tube et à un instant  $t$  est donnée par,

$$n(x, t) = \frac{I}{2\sqrt{\pi Dt}} e^{-[x-x_d(t)]^2/4Dt} \quad \text{eq. II-16}$$

Où  $x_d = v_d t$  est la position du maximum,  $I$  est le nombre total d'ions injectés par unité de surface. La largeur à mi-hauteur de la gaussienne pour une constante de diffusion  $D$  et un temps d'injection infiniment court est donnée par,

$$\sigma_{1/2}(t) = 4\sqrt{Dt \ln(2)} \quad \text{eq. II-17}$$

Soit  $\Delta t$  la largeur à mi-hauteur du profil en temps d'arrivé d'un ion donné, ce qui correspond à une largeur spatiale,

$$\sigma_{1/2} = v_d \Delta t \quad \text{eq. II-18}$$

En utilisant la relation de Nernst-Townsend-Einstein (Eq. II-15) et l'équation précédente on a,



$$\Delta t = \frac{\sigma_{1/2}(t_d)}{v_d} = 4 \left( \frac{kT \ln(2)}{Ve} \right)^{1/2} \frac{t_d}{z^{1/2}} \quad \text{eq. II-19}$$

Où  $V=EL$  est la différence de potentiel appliquée sur le tube de mobilité. On obtient pour la résolution,

$$\frac{t_d}{\Delta t} \propto \left( \frac{V}{T} \right)^{1/2} \quad \text{eq. II-20}$$

Pour accroître la résolution il faut augmenter la tension ou diminuer la température. Cette résolution est la résolution intrinsèque à l'expérience, il faut la considérer comme une limite théorique. Un autre paramètre intervient sur la résolution, il s'agit du temps d'injection du paquet d'ions (qui a été considéré infiniment court dans la démonstration précédente). Comme nous l'avons dit précédemment, il faut injecter des paquets d'ions à un temps donné pour calculer leur temps de dérive. Ce temps d'injection a une influence sur le profil obtenu. En prenant l'équation II-16, et en posant  $x_d=v_d t_d$  pour le déplacement des ions sur une longueur  $L$  on peut définir le profil temporel des ions définis par,

$$I(t) = I_0 e^{-\left(\frac{t-t_d}{\sigma}\right)^2} \quad \text{eq. II-21}$$

avec  $\sigma = 2\sqrt{Dt_d}$  et  $I_0 = \frac{1}{\sigma\sqrt{\pi}}$ . Si on définit une porte d'injection de largeur  $2\delta$  on a le flux d'ions injectés à  $t=t_0$  et arrivés à  $t_d$  qui s'écrit,

$$J(t, t_0) = \begin{cases} I_0 e^{-\left(\frac{t-t_0-t_d}{\sigma}\right)^2} & \text{Si } -\delta < t_0 < +\delta \\ 0 & \text{Sinon} \end{cases} \quad \text{eq. II-22}$$

Pour l'intensité totale on intègre entre  $-\delta$  et  $+\delta$  ce qui donne,

$$S(t) = \int_{-\delta}^{+\delta} dt_0 J(t, t_0) = I_0 \int_{-\delta}^{+\delta} dt_0 e^{-\left(\frac{t-t_0-t_d}{\sigma}\right)^2} \quad \text{eq. II-23}$$

En faisant le changement de variable suivant, soit  $\theta = \frac{t-t_0-t_d}{\sigma}$  d'où  $d\theta = -\frac{dt_0}{\sigma}$  on a,

$$\text{Si } \begin{cases} t_0 = -\delta & \theta_1 = \frac{t+\delta-t_d}{\sigma} \\ t_0 = +\delta & \theta_2 = \frac{t-\delta-t_d}{\sigma} \end{cases} \quad \text{eq. II-24}$$

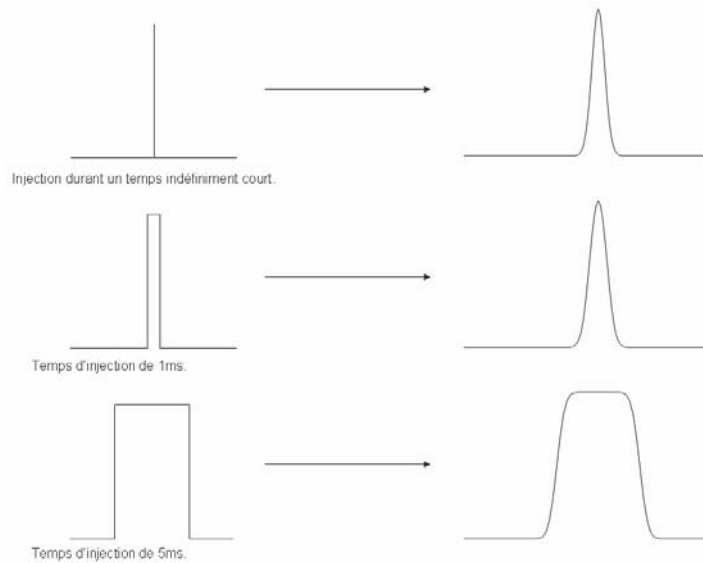
On peut réécrire l'intégrale de la manière suivante,

$$S(t) = -I_0 \sigma \int_{\theta_1}^{\theta_2} d\theta e^{-\theta^2} = \sigma I_0 \left( \int_0^{\theta_1} d\theta e^{-\theta^2} - \int_0^{\theta_2} d\theta e^{-\theta^2} \right) \quad \text{eq. II-25}$$

En définissant la fonction erf comme suit,  $\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-x^2} dx$ , on peut réécrire l'équation II-25,

$$S(t) = \sigma I_0 \frac{\sqrt{\pi}}{2} [\text{erf}(\theta_1) + \text{erf}(\theta_2)] \quad \text{eq. II-26}$$

Ainsi on remarque, comme montré sur la figure suivante, que lorsque la durée de la porte d'injection est inférieure à la largeur de la distribution limite (typiquement de l'ordre de 1ms) on obtient un profil gaussien élargi. Dès lors que ce temps est dépassé, le profil obtenu est déformé et a une largeur correspond à la durée de la porte d'injection. Le temps d'injection est donc un paramètre clef sur la résolution du profil obtenu.



**Figure II-1 : Profils simulés en temps d'arrivés selon la largeur temporel du paquet d'ions injecté pour un même coefficient de diffusion**

### 3. Limite du régime de diffusion

Pour être en régime de diffusion et donc que les équations ci-dessus soient valables, il faut que l'énergie emmagasinée par l'ion due au champ électrique entre deux collisions soit négligeable devant son énergie thermique.

$$eE\lambda \ll kT \quad \text{eq. II-27}$$

Avec  $\lambda$  le libre parcours moyen entre deux collisions. Ainsi,  $eE\lambda$  est l'énergie gagnée par un ion de charge  $e$  se déplaçant sous l'influence d'un champ électrique  $E$  entre deux collisions et  $kT$  est l'énergie thermique. Si nous prenons comme hypothèse que le gaz se comporte comme un gaz parfait, le libre parcours moyen est égal à l'inverse du produit entre la densité du gaz ( $N$ ) et la section efficace de collision ( $\Omega$ ), l'équation II-27 peut se réécrire de la façon suivante,

$$eE \ll kTN\Omega \quad \text{eq. II-28}$$

Par réarrangement de l'équation précédente on obtient,

$$E/N \ll kT\Omega/e \quad \text{eq. II-29}$$

Cette équation peut être réécrite de la manière suivante selon la formule donnée par Revercomb et al.<sup>6</sup>,

$$E/N \ll \frac{d^2}{z} \quad \text{eq. II-30}$$

Où  $d$  est la somme des rayons de l'ion et de la molécule en Angströms et  $z$  le nombre de charge élémentaire sur l'ion. Le rapport  $E/N$  est en Townsend (Td), qui est une unité utilisée en mobilité ionique correspondant à  $10^{-17} \text{ V.cm}^2$ . En règle générale les expériences de mobilité ionique à champ homogène se situent à une valeur de 2Td.

Pour des valeurs de rapport  $E/N$  supérieures les équations qui régissent le mouvement des ions ne sont plus les mêmes. En effet l'équation II-1 s'écrit sous la forme,

$$v_d = K(E) \times E \quad \text{eq. II-31}$$

En utilisant le  $K_0(E)$  relatif au  $K(E)$  on obtient une série infinie de termes pairs<sup>7</sup>,

$$K_0(E) = K_0(0) \left[ 1 + \alpha(E/N)^2 + \beta(E/N)^4 + \gamma(E/N)^6 + \varepsilon(E/N)^8 + \dots \right] \quad \text{eq. II-32}$$

Avec  $K_0(0)$  la mobilité à champ faible. Ainsi la vitesse n'est plus directement proportionnelle au champ électrique.

#### 4. Relation entre mobilité ionique et section efficace de collision

Les collisions entre les particules sont contrôlées par les forces exercées entre elles, la mobilité dépend de la force d'interaction ion-molécule. Dans la démonstration qui suit, on néglige les collisions à plus de deux corps et les collisions ion/ion. Les ions se déplacent à une vitesse constante, ainsi le transfert moyen net de quantité de mouvement ( $\Delta P$ ) par le champ

électrique et par les collisions est nul. La perte moyenne de  $\Delta P$  dans le gaz due aux collisions est donc égale au gain moyen du au champ entre deux collisions, ainsi,

$$M\langle\vec{V}' - \vec{V}\rangle = q\vec{E}\delta t \quad \text{eq. II-33}$$

Avec  $\delta t$  la durée entre deux collisions,  $V$  et  $V'$  vitesses avant et après collision. Or en moyenne avant collision  $V=0$  ainsi  $V'-V=V'$ .

$$M\langle\vec{V}'\rangle = q\vec{E}\delta t \quad \text{eq. II-34}$$

On considère les collisions isotropes, c'est à dire qu'après une collision la vitesse relative entre l'ion et la molécule de gaz est en moyenne nulle.

$$\vec{v}'_r \equiv \langle\vec{v}' - \vec{V}'\rangle = 0 \quad \text{eq. II-35}$$

$$\langle\vec{V}'\rangle = \langle\vec{v}'\rangle \quad \text{eq. II-36}$$

Où  $v'$  est la vitesse de l'ion après collision. En considérant la conservation de la quantité de mouvement moyen on a :

$$m\langle\vec{v}\rangle + M\langle\vec{V}\rangle = m\langle\vec{v}'\rangle + M\langle\vec{V}'\rangle \quad \text{eq. II-37}$$

Or  $\langle\vec{v}\rangle \equiv v_d$ ,  $\langle\vec{V}\rangle = 0$ , et  $\langle\vec{V}'\rangle = \langle\vec{v}'\rangle$ , ainsi l'équation précédente s'écrit,

$$\langle\vec{v}\rangle = v_d = \left(1 + \frac{M}{m}\right)\langle\vec{V}'\rangle \quad \text{eq. II-38}$$

En utilisant l'équation précédente et l'équation II-34 on a,

$$v_d = \frac{qE\delta t}{M} + \frac{qE\delta t}{m} \quad \text{eq. II-39}$$

Le premier terme est l'énergie moyenne perdue par collision et le second est l'énergie moyenne gagnée entre deux collisions dues au champ électrique.

En utilisant la théorie cinétique des gaz<sup>8</sup> nous pouvons définir la durée entre deux collisions de la manière suivante,

$$\delta t = \frac{1}{\langle v_r \rangle N \Omega_D} \quad \text{eq. II-40}$$

Avec  $N$  le nombre de collisions par unité de temps, et  $\Omega_D$  la section efficace de collision. En substituant cette équation dans l'équation II-39 on a,

$$v_d = \frac{qE}{N} \left( \frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right) \frac{1}{\langle v_r \rangle \Omega_D} \quad \text{eq. II-41}$$

La vitesse moyenne peut être approximée de manière raisonnable par sa racine carrée, ainsi

$$\langle v_r \rangle^2 \approx \langle v_r \rangle = \left\langle |\vec{v} - \vec{V}|^2 \right\rangle = \langle v^2 \rangle + \langle V^2 \rangle - 2\langle \vec{v} \cdot \vec{V} \rangle = \langle v^2 \rangle + \langle V^2 \rangle \quad \text{eq. II-42}$$

Où  $\langle \vec{v} \cdot \vec{V} \rangle = 0$  parce que la vitesse  $\vec{V}$  est égale dans toutes les dimensions de l'espace (distribution isotropique des vitesses moléculaires). La valeur de  $\langle V^2 \rangle$  provenant de l'énergie thermique des molécules est définie tel que,

$$\frac{1}{2} M \langle V^2 \rangle = \frac{3}{2} kT \quad \text{eq. II-43}$$

Si le champ appliqué est faible, c'est-à-dire que la vitesse des ions est thermique on a,

$$\frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle = \frac{3}{2} kT \quad \text{eq. II-44}$$

On a donc,

$$\langle v_r \rangle^2 = \frac{3kT}{m} + \frac{3kT}{M} \quad \text{eq. II-45}$$

Ainsi l'équation II-41 devient,

$$v_d = \frac{1}{3^{1/2}} \frac{qE}{N} \left( \frac{1}{M} + \frac{1}{m} \right)^{1/2} \left( \frac{1}{kT} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega_D} \quad \text{eq. II-46}$$

Avec  $K = v_d/E$  on a

$$K = \frac{1}{3^{1/2}} \frac{q}{N} \left( \frac{1}{M} + \frac{1}{m} \right)^{1/2} \left( \frac{1}{kT} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega_D} \quad \text{eq. II-47}$$

On trouve une relation entre la mobilité ionique et la section efficace de collision, cette démonstration, pour la simplifier, a été faite sur les valeurs moyennes des vitesses. Si on avait pris des profils de vitesse il aurait fallu utiliser une intégration de type Monte-Carlo qui aurait permis de retrouver l'équation II-48 donnée par Revercomb et Mason<sup>6</sup>, la seule différence intervient sur le facteur numérique,

$$K = \frac{3}{16} \frac{q}{N} \left( \frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{1/2} \left( \frac{2\Pi}{kT} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega_D} \quad \text{eq. II-48}$$

La section efficace de collision est une grandeur relative à la géométrie de l'ion étudié. Cette relation est valable si la masse de l'ion étudié est très supérieure à la masse du gaz tampon.

Ainsi on peut à partir d'une expérience de mobilité ionique remonter à la section efficace de l'ion étudié avec le gaz tampon.

### **III. Les techniques expérimentales**

#### **1. Les fondements (1850 et 1938)**

Nous pouvons citer trois axes de recherches qui ont permis le développement de la mobilité ionique.

Tout d'abord un travail théorique et expérimental effectué par Langevin portant sur l'ionisation des gaz et sur la théorie cinétique<sup>9,10</sup>. Langevin a défini l'aspect collision de la mobilité ainsi que le rôle des forces attractives sur la section efficace de collision, il a aussi développé une première description des interactions ion-molécule et l'influence de ces dernières sur la mobilité.

La seconde a été l'étude rationnelle de l'influence du champ électrique et de la pression sur la mobilité ionique. Des travaux sur la diffusion de cations dans l'azote ont été développés par Mitchell et Ridler<sup>11</sup>. L'étude de la mobilité en fonction du rapport  $E/N$  a permis de définir les différents types de régimes (faible champ où  $K$  est une constante et à haut champ où  $K$  est dépendante du champ électrique).

Ensuite, nous pouvons citer des travaux portant sur les innovations techniques, les optiques ioniques, les techniques de vide et la détection des ions. Ceci a permis le développement de la physique expérimentale. On peut citer des études portant sur l'injection de paquets d'ions en utilisant des portes à ions (ions shutters) qui sont du même type que celles utilisées à l'heure actuelle pour injecter les ions dans les tubes de mobilité ionique. Ces premières portes à ions ont été décrites en 1929 par Cravath<sup>12</sup> et van de Graaff<sup>13</sup>. Bradburry<sup>14</sup> a développé cette méthode par la suite avec un champ linéaire entre deux plaques.

#### **2. Les débuts de la mobilité ionique (1948 et 1970)**

Le développement des instruments de mobilité ionique est principalement dus à Mason et McDaniel qui ont théorisé le processus de diffusion des ions en phase gazeuse sous l'influence d'un champ électrique<sup>15,16</sup>. Ils ont développé des expériences de mobilité ionique qui sont à la base des instruments actuels. A partir de ces travaux les premiers appareils

commerciaux ont pu voir le jour. L'intérêt pour cette technique prend de l'ampleur à partir du début des années 70. Karasek et al.<sup>17,18</sup> démarrent des études sur différents composés organiques qui contribueront à l'émergence de la mobilité ionique comme outil analytique. D'autre part les applications militaires utilisant cette technique sont nombreuses (détections d'explosifs, de gaz, etc). Ceci va permettre le développement de nouveaux appareils portatifs pour être utilisés sur le terrain.

Cet intérêt croissant va permettre aussi le développement de couplage avec d'autres techniques analytiques. Nous pouvons citer la chromatographie gazeuse et la spectrométrie de masse sur laquelle nous reviendrons par la suite.

### 3. Les composants d'une expérience de mobilité ionique

Il y a quatre parties principales dans une expérience de mobilité ionique, la source d'ionisation, l'injection des ions, l'analyseur et le détecteur. Nous allons présenter quelques exemples pour chacune de ces parties.

#### **a. La source d'ionisation :**

Il existe de nombreuses sources d'ionisation qui sont utilisées selon le type d'échantillons à analyser et le type d'ions que l'on veut obtenir (ions atomiques, moléculaires, complexes moléculaires, etc...). Le développement des sources d'ionisation appliquées à la spectrométrie de mobilité ionique a été le même que pour la spectrométrie de masse. Nous allons nous focaliser sur l'ionisation des biomolécules, puisque nous nous intéresserons à ce type de système dans cette étude. Les premières sources développées permettaient d'obtenir des ions atomiques ou des ions moléculaires sur des systèmes de petites tailles (hydrocarbures, petites molécules organiques ou sels inorganiques) nous pouvons citer la source radioactive au <sup>63</sup>Ni. Cette source a permis de réaliser les premières mesures de mobilité ionique. L'échantillon doit être préalablement vaporisé, la source radioactive émet des électrons, qui en interaction avec la vapeur d'analyte créent des ions chargés négativement ou positivement.

Il faut attendre la fin du 20<sup>ème</sup> siècle pour que de nouvelles sources permettant d'obtenir des ions moléculaires de biomolécules apparaissent.

La première à être développée est l'APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) en 1975 par Carroll et al.<sup>19</sup>. Ce développement a eu lieu dans le but de coupler la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse.

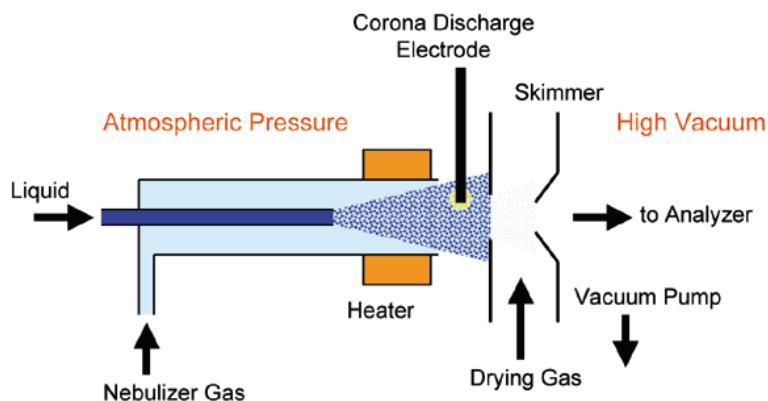


Figure III-1 : Source APCI

Le principe est le suivant, l'échantillon est nébulisé et ionisé en utilisant une décharge corona comme montré sur la figure suivante (au départ l'ionisation était réalisée en utilisant une source au  $^{63}\text{Ni}$ ). Cette technique d'ionisation est dite douce mais elle produit quelques fragments.

Puis la technique Fast Atom Bombardement (FAB) en 1981 par Barber et al.<sup>20</sup>. Cette technique est basée sur le bombardement d'atomes rapides de type Xe, Ar. Il n'est plus nécessaire de vaporiser l'échantillon. L'échantillon est dilué dans une matrice (glycerol), il est bombardé par des atomes rapides (Cf. figure suivante) qui produisent des ions protonés, déprotonés et cationisés ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,...). Cette technique a comme avantage de produire des ions relativement stables ce qui lui confère une bonne sensibilité.

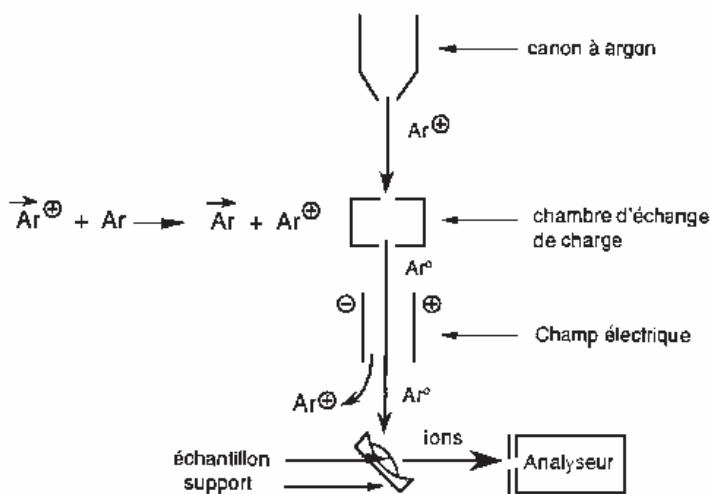


Figure III-2 : Source FAB



En 1984, John Fenn<sup>21</sup> développe la source electrospray (ESI) ce qui lui vaudra le prix Nobel en 2002. Cette technique permet de produire des ions moléculaires de grandes tailles protonés ou deprotonés plusieurs fois. Cette technique a permis l'émergence de la spectrométrie de masse dans l'analyse de biomolécules. Elle permet de faire passer en phase gazeuse des ions moléculaires. Ce processus d'ionisation des molécules se déroule à pression atmosphérique. Nous allons maintenant présenter les trois principales étapes du processus d'ionisation dans une source electrospray puisque c'est cette source qui sera utilisée dans cette étude.

-Nébulisation : Production de gouttelettes chargées :

On injecte une solution comportant l'analyte à un débit d'une centaine de microlitre par heure dans un capillaire, de 100µm de diamètre, qui est lui-même dans un deuxième capillaire, d'un diamètre 200µm, dans lequel circule de l'azote. Ce système est appelé nébuliseur et permet la formation d'un spray composé de fines gouttelettes chargées (positivement ou négativement selon le potentiel appliqué au niveau du nébuliseur).

La présence d'un fort potentiel de quelques kV entre le nébuliseur et le capillaire crée une accumulation de charges à la pointe du nébuliseur. A l'interface liquide pointe du nébuliseur, une réaction d'oxydation se produit, favorisant l'échange de charges et la formation d'ions. Sous l'effet du champ et de la forte densité de charge, le ménisque se déforme et optimise sa surface en prenant la forme du cône de Taylor<sup>22</sup>.

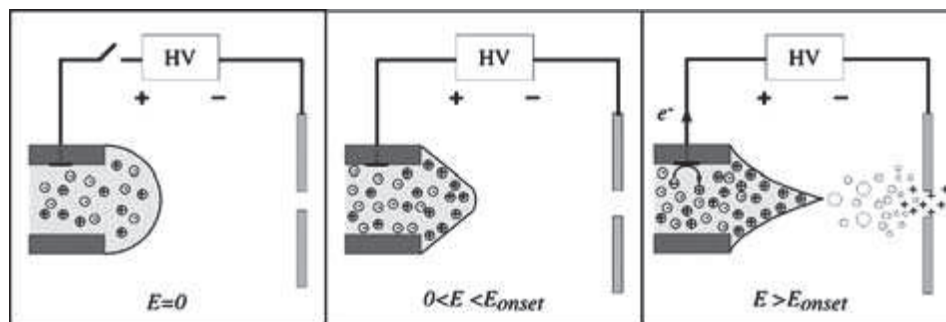


Figure III-3 : Principe de formation du cône de Taylor

Puis la pointe de ce cône se déforme jusqu'à rupture de l'équilibre entre les tensions de surface du fluide et les forces dues aux répulsions de charges. De cette manière, de fines gouttelettes chargées de quelques µm de diamètre sont libérées.

-Désolvatation et réduction des gouttelettes chargées :

L'application d'une différence de potentiel entre le nébuliseur et le capillaire, ainsi que la différence de pression entre l'entrée et la sortie de ce capillaire permet de guider ces gouttelettes à travers ce capillaire. Pendant ce déplacement, les charges présentes dans les gouttelettes vont se répartir à la surface (répulsion électrostatique). Les gouttelettes de quelques micromètres de diamètre diminuent progressivement de taille par la perte de molécule de solvant sous l'effet du chauffage. Lorsque la tension superficielle, qui maintient la gouttelette en état, devient plus petite que la répulsion électrostatique (due à la présence des charges), la limite de Rayleigh est atteinte : il y a fission asymétrique de la gouttelette, c'est l'explosion coulombienne. Cette explosion produit une gouttelette principale ainsi qu'une dizaine de gouttelettes secondaires. La production de ces petites gouttelettes proches de la limite de Rayleigh va accélérer le processus de fission. Ce processus d'évaporation et d'explosion se répète plusieurs fois, il y a ainsi une réduction massive et rapide de la taille des gouttelettes.

-Formation d'ions en phase gazeuse :

La dernière étape du processus est la plus polémique. Deux mécanismes tentent d'expliquer à ce jour la formation d'ions.

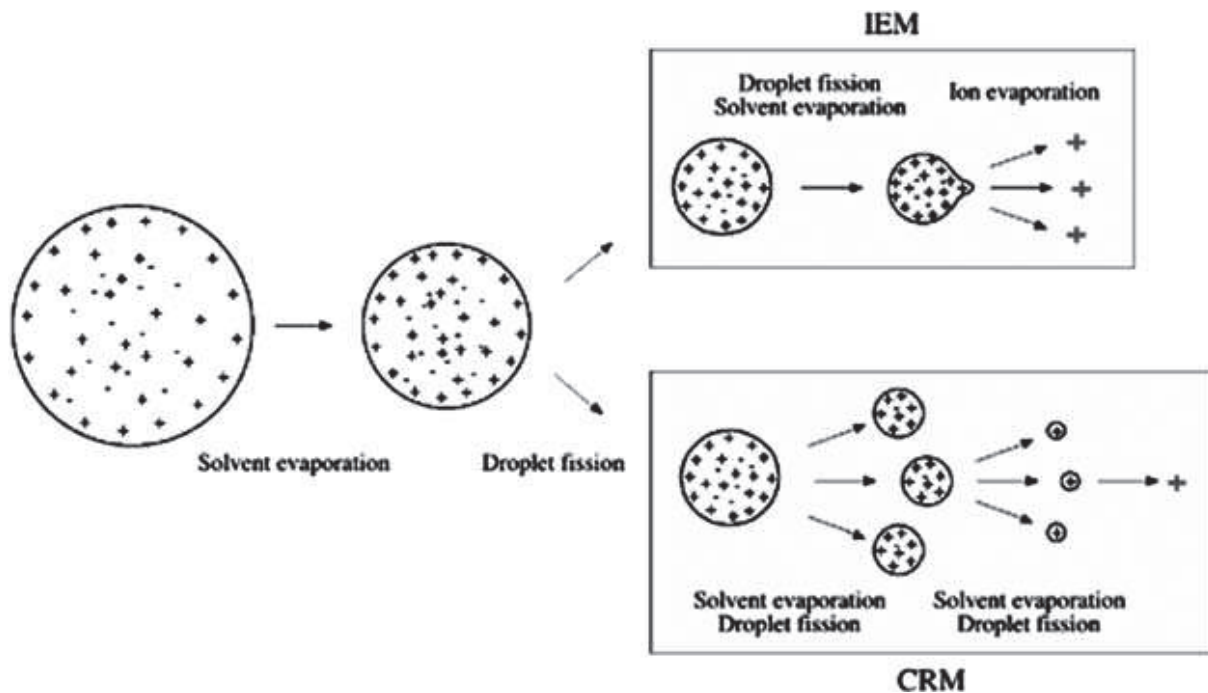


Figure III-4 : Mécanismes de production d'ions en phase gazeuse

Dans le modèle de l'évaporation ionique (IEM) développé par Iribarne et Thomson<sup>23</sup>, les ions en phase gazeuse sont directement extraits, à partir de la surface de la gouttelette, lorsque le diamètre de celle-ci est suffisamment petit (<10nm). Dans le modèle de la charge résiduelle (CRM) développé par Dole et al.<sup>24</sup>, le schéma évaporation-fission de la gouttelette se poursuit jusqu'à obtention d'une gouttelette fille d'environ 1nm ne contenant plus qu'un seul ion. La validité du modèle dépend de la nature de l'ion (ion atomique inorganique, molécules multiprotonées, etc...). Il a été suggéré que le mécanisme CRM serait prédominant pour l'ionisation des biomolécules<sup>25</sup> alors que le mécanisme IEM serait quant à lui prédominant pour les analytes de petites tailles<sup>26</sup>.

Des études récentes de Nemes et al.<sup>27</sup> ont permis de faire des observations sur la forme des gouttelettes avant ionisation. La figure suivante présente l'image qu'ils ont pu produire avec leur dispositif expérimental.

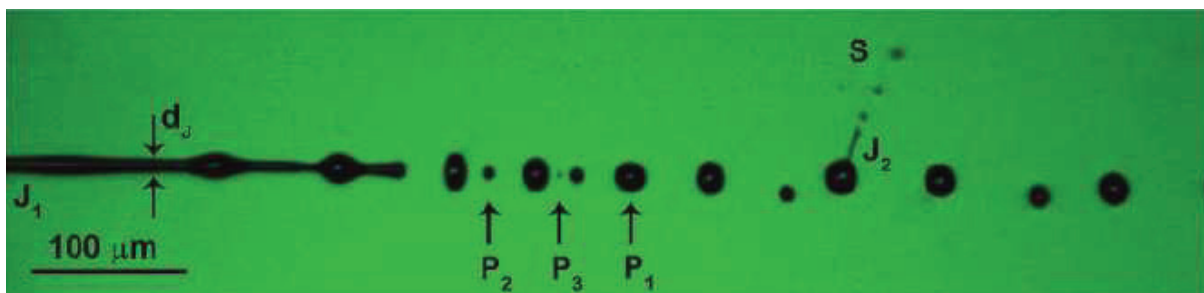


Figure III-5 : Formation des ions par electrospray

Sur cette figure nous pouvons observer des gouttelettes de diverses tailles provenant du jet J1 (P1, P2 et P3), ceci montre une diversité de formes et de tailles des gouttelettes formées. Ce phénomène se reproduit sur une gouttelette (jet J2) en donnant un nouveau groupe de gouttelettes plus petites. Ce mécanisme se répète jusqu'à formation d'ions désolvatés en phase gazeuse.

En 1988 Karas et Hillenkamp<sup>28,29</sup> développent une technique d'ionisation par désorption laser (dans le domaine UV) sur une matrice absorbant l'énergie laser et permettant de désorber et de ioniser les analytes. Cette technique permet d'ioniser des espèces ayant une masse moléculaire supérieure à 10000Da. Au même moment Tanaka et al.<sup>30</sup> développent une technique de désorption laser avec un laser N<sub>2</sub>. Cette technique est le MALDI (matrix-assisted laser desorption ionisation) et lui vaudra le prix Nobel en 2002 (partagé avec J. Fenn).

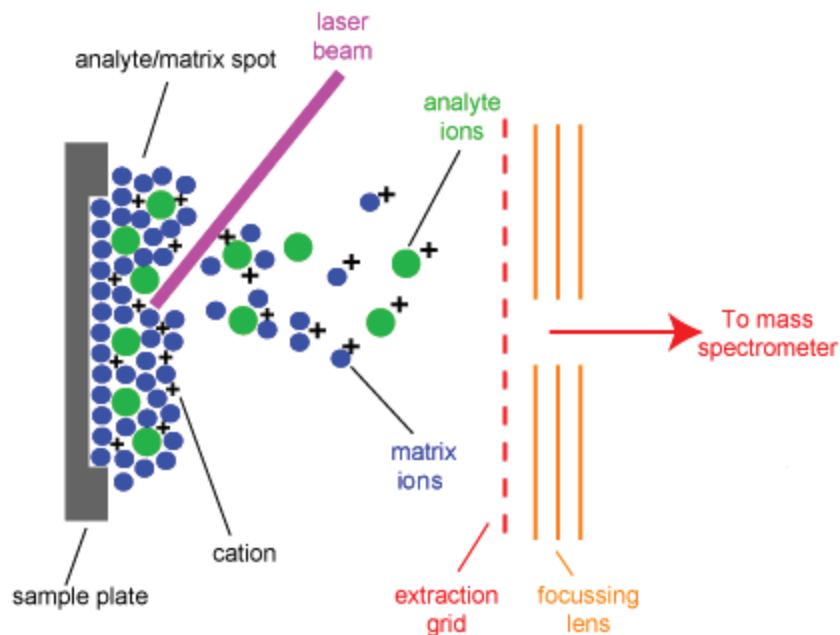


Figure III-6 : Source MALDI

Ces deux dernières techniques l'ESI et le MALDI sont à l'origine du développement de la spectrométrie de mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse pour l'étude des biomolécules au début des années 1990.

### b. L'injection des ions :

L'injection des ions dans le drift tube est une étape clef dans une expérience de mobilité ionique. Comme nous l'avons vu précédemment les différentes sources d'ionisation sont principalement continues, il faut donc injecter les ions à un temps donné pour mesurer leurs temps de diffusions. De plus il faut que le temps d'injection soit le plus court possible pour avoir la meilleure résolution.

La première technique utilisée a été la porte à ions de Bradbury-Nielson et Tyndall. Le fonctionnement de cette porte à ions est le suivant. A la sortie de la source deux plaques percées avec des grilles parallèles sont placées, la seconde électrode est placée à un potentiel supérieur à la première pour pouvoir empêcher les ions d'entrer dans le tube. Lorsque l'on

veut injecter un paquet d'ions on abaisse le potentiel de la seconde électrode à une valeur correspondant au gradient de tension standard de l'expérience pendant un temps très court. Cette technique permet d'avoir des pulses contrôlés en temps avec un cycle de répétition important. Son principal désavantage est qu'elle permet d'injecter une faible quantité d'ions. En effet les ions injectés correspondent à ceux qui sont entre les deux plaques pendant le pulse, les autres sont perdus.

Pour gagner en sensibilité il faut piéger les ions en amont du tube puis les injecter sous forme de paquets, ainsi aucun ion n'est perdu. Ce type d'approche a été développée par exemple par Smith et al.<sup>31</sup>, avec l'utilisation d'entonnoirs à ions. Son fonctionnement sera détaillé dans le chapitre suivant. Brièvement il s'agit d'un assemblage d'électrodes cylindriques concentriques sur lesquelles sont appliquées une tension continue (DC) et une tension radiofréquence (RF). La tension RF change de phase à chaque plaque de la manière suivante, sur la première plaque  $+180^\circ$  sur la deuxième  $-180^\circ$  sur la troisième  $+180^\circ$  etc,... Ce dispositif permet de refocaliser les ions mais aussi de les piéger dans sa partie avale pour les injecter ensuite dans le tube de mobilité ionique. Ces optiques ont permis un gain important de sensibilité.

Un nouveau système couplant entonnoir à ions et un piège à ions a été développé par Smith et al.<sup>32</sup>, la figure suivante montre le système qui est composé d'une partie entonnoir à ions, une partie piégeage et une dernière partie entonnoir à ions.

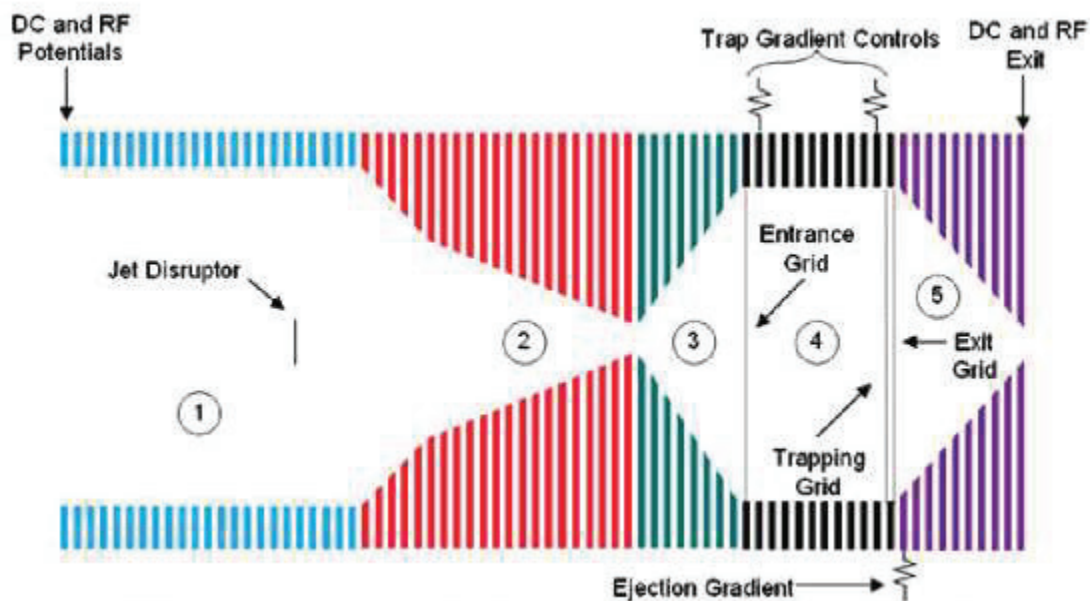


Figure III-7 : Entonnoir à ions avec système de piégeage

Les ions sont refocalisés dans la zone 2, la zone 3 permet de les injecter dans la zone de piégeage 4. De part et d'autre de la zone 4 il y a des grilles (une en amont et deux en aval)

pour que les potentiels soient définis de correctement. Pendant le piégeage les tensions des deux grilles sont égales, pour l'éjection on abaisse le potentiel de la seconde grille (exit grid). Enfin la partie 5 permet de refocaliser les ions avant leur introduction dans le tube de mobilité ionique. Cette technique permet d'avoir un gain accru en sensibilité. C'est la technique la plus utilisée sur les expériences récentes.

D'autres types de pièges peuvent être utilisés, un piège cylindrique sera détaillé dans le chapitre suivant.

### **c. L'analyseur:**

Plusieurs technologies existent. Les tubes de mobilité ionique avec un champ électrique homogène (IMS), les tubes de mobilité ionique à haut champ asymétrique aussi appelés spectrométrie de mobilité différentielle (DMS, FAIMS) et spectrométrie de mobilité ionique à champ oscillant (TWIMS ou TWIG).

Les premiers développements expérimentaux ont été réalisés sur des tubes de mobilité à champ constant, ce sont les mieux compris<sup>17</sup>. Ils sont composés d'une série d'électrodes cylindriques séparées par des isolants, entre chaque électrode une résistance est placée. On applique une différence de potentiel de part et d'autre du tube, la résultante correspond à un champ électrique homogène. Au sein du tube règne une pression de gaz tampon connue et contrôlée par l'injection et le pompage de ce dernier. Les ions sont injectés par la porte à ions, ils ont une vitesse constante durant leur diffusion, connaissant leur temps de dérive et la longueur du tube on a facilement accès à la constante de mobilité et donc à la section efficace de collision.

La mobilité différentielle est une technique qui s'est développée aux débuts des années 1990 en Russie par Buryakov et al.<sup>33</sup>. En mobilité différentielle on applique de forts champs électriques oscillants ainsi la relation I-3 n'est plus valable, le coefficient  $K_0$  dépend du champ électrique (Cf. Eq. II-32). Le dispositif expérimental est constitué par exemple de deux plaques parallèles, où est appliqué un champ oscillant asymétrique sur l'une des deux plaques alors que la seconde est à la masse, comme montré sur la figure III-8.

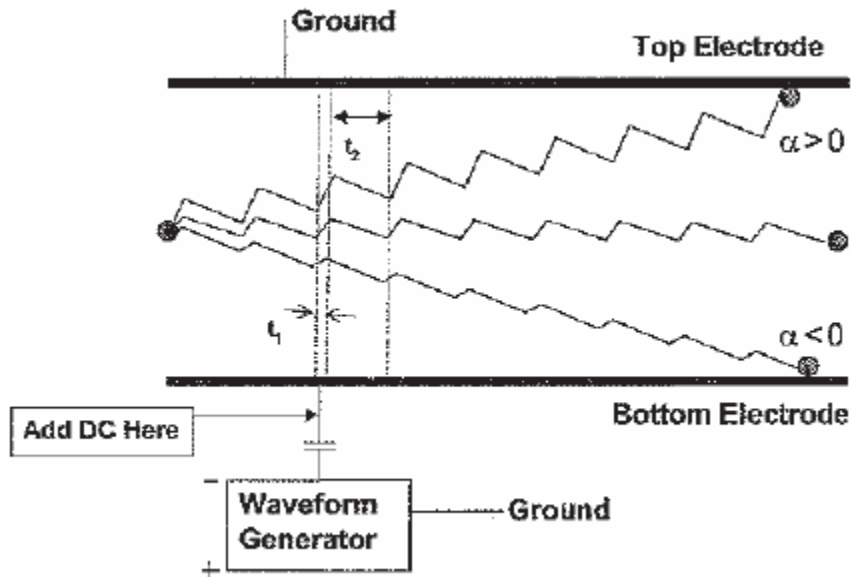


Figure III-8 : Principe de la technique FAIMS

Les ions se déplacent entre ces deux plaques avec des trajectoires oscillantes. Le champ électrique  $E(t)$  appliqué entre les deux plaques est perpendiculaire au déplacement des ions et satisfait les deux relations suivantes :

$$\frac{1}{T} \int_0^T E(t) dt = \langle E(t) \rangle = 0 \quad \text{eq. III-1}$$

$$\langle E^{2n+1}(t) \rangle \neq 0 \quad \text{eq. III-2}$$

Où  $T$  est la période d'oscillation ( $T=t_1+t_2$ ),  $n$  un entier supérieur à 1.

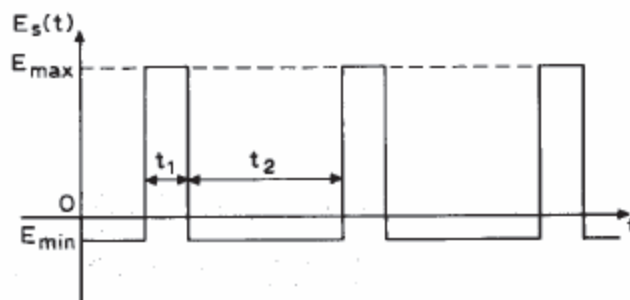


Figure III-9 : Exemple de forme de champ oscillant utilisé en FAIMS

Ce type de champ va faire osciller les ions dans la direction transverse selon une période  $T$  (Cf. Fig. III-8). La vitesse de chaque ions durant la semi période  $t_1$  et  $t_2$  dépend de  $E_{\min}$ ,  $E_{\max}$ , et  $\alpha(E/N)$ . Une tension continue compensatoire ( $E_0$ ) peut être ajoutée au champ asymétrique

comme montré sur la figure III-8. Pendant les deux demi périodes  $t_1$  et  $t_2$  la vitesse des ions est régie par,

$$\begin{aligned} v_{d1} &= K_{(E_{\max} - E_0)} \cdot (E_{\max} - E_0) \\ v_{d2} &= K_{(E_{\min} - E_0)} \cdot (E_{\min} - E_0) \end{aligned} \quad \text{eq. III-3}$$

En utilisant l'éq. II-32 et en se limitant au terme de deuxième ordre on peut réécrire les équations précédentes comme suit,

$$\begin{aligned} v_{d1} &= K \frac{N_0}{N} \left[ 1 + \alpha \left( \frac{E_{\max} - E_0}{N} \right)^2 \right] \cdot (E_{\max} - E_0) \\ v_{d2} &= K \frac{N_0}{N} \left[ 1 + \alpha \left( \frac{E_{\min} - E_0}{N} \right)^2 \right] \cdot (E_{\min} - E_0) \end{aligned} \quad \text{eq. III-4}$$

Pendant une période le déplacement des ions suivant l'axe y est égal à,

$$\Delta y = \int_0^{t_1+t_2} v dt = v_{d1} t_1 - v_{d2} t_2 \quad \text{eq. III-5}$$

En développant l'équation précédente, en utilisant l'équation III-4 et en prenant  $E_0 \ll E_{\max}$  et  $E_{\min}$  on a,

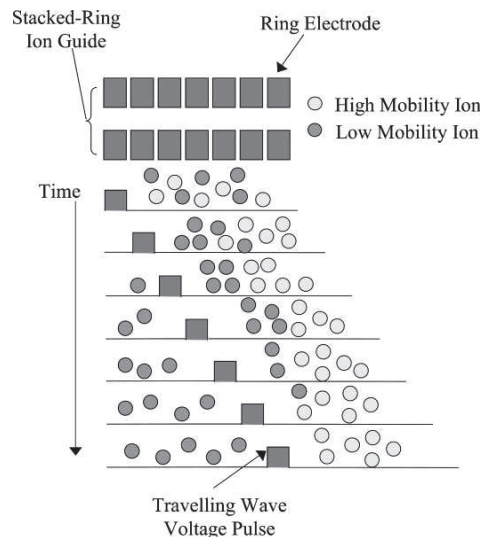
$$\Delta y = \alpha \left( \frac{E_{\max}}{N} \right)^2 - \alpha \left( \frac{E_{\min}}{N} \right)^2 \quad \text{eq. III-6}$$

L'ion traverse le dispositif sans heurter les électrodes si  $\Delta y=0$ , il faut donc que  $\alpha \left( \frac{E_{\max}}{N} \right)^2$  soit égale à  $\alpha \left( \frac{E_{\min}}{N} \right)^2$ . En faisant varier la tension compensatrice les ions peuvent ou ne peuvent

pas passer à travers le dispositif de manière séquentielle. Différents types de champs ont été utilisés<sup>34</sup> pour modifier les paramètres de séparations. Cet appareil peut être utilisé en amont d'un spectromètre de masse pour sélectionner certains ions. Il ne permet pas de remonter directement à la section efficace de collision comme avec la méthode précédente.

La mobilité ionique à champ oscillant est proche de la mobilité à champ constant. Cette technique a été développée par Giles et al.<sup>35,36</sup>. L'analyseur est composé d'une série d'électrodes cylindriques, sur lesquelles est appliqué une tension sinusoïdale, qui se propage selon l'axe du dispositif par utilisation d'une tension continue pulsée comme montré sur la figure suivante.





**Figure III-10 : Tension sinusoïdale pulsée utilisée en mobilité ionique à champ oscillant**

Les ions vont se déplacer selon cet axe par l'action de l'onde. La vitesse des ions dépendra de leur mobilité. En revanche il est difficile d'obtenir une relation simple entre la vitesse de diffusion de l'ion et sa section efficace de collision. Cette technique a été commercialisée par Waters corporation sous le nom de Synapt. L'oscillation du champ électrique permet d'avoir une meilleure sensibilité (meilleure transmission des ions) et a permis l'émergence de l'utilisation de la mobilité ionique à visées biologiques<sup>5,37,38</sup>.

#### **d. Le détecteur :**

Dans la plupart des expériences de mobilité ionique des plaques de faraday servent de détecteurs. On mesure le courant induit par le flux d'ions en fonction du temps. A l'heure actuelle la spectrométrie de masse est utilisée comme analyseur des ions et détecteurs. Nous allons nous attacher à développer ce couplage.

### **4. Mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse (IMMS)**

Nous avons vu dans la partie précédente qu'il existait trois types d'analyseur en spectrométrie de mobilité ionique. Pour la spectrométrie de masse il existe une variété importante d'analyseur, nous citerons seulement ceux qui sont couplés à l'heure actuelle avec la spectrométrie de mobilité ionique. Les principaux sont le temps de vol et le quadripôle. Les sources d'ionisation utilisées pour les biomolécules sont principalement les sources MALDI et ESI. Différents types de couplage existent, nous allons en présenter quelques uns qui ont permis l'étude de biomolécules.

Une étude sur la conformation de polymères et d'un nona-peptide (la bradykinine) ont permis de montrer la puissance du couplage IMMS<sup>39</sup> pour la résolution de structures en phase gazeuse de molécules biologiques.

Un des premiers montages qui a permis l'observation de conformères protéiques par IMMS est l'expérience de M.J Jarrold<sup>2</sup>. Clemmer et al.<sup>40</sup> ont pu observer les différents conformères du Cytochrome C. Cette expérience est composée d'une source electrospray (ou MALDI), d'une zone de désolvatation, d'un quadripôle d'injection qui permet de sélectionner les ions que l'on souhaite analyser dans le tube de mobilité, un tube de mobilité et d'un analyseur quadripolaire. La spécificité de cette expérience est que la cellule de mobilité est thermalisée et permet de travailler sur des gammes de température de -40 à 400°C. Cette possibilité permet de faire des études de dynamique de repliement de protéines, des déterminations de constantes d'association de complexe protéine-ligand ou encore l'étude de systèmes métastables<sup>41</sup>.

En mobilité à champ homogène les schémas expérimentaux classiques sont composés d'une source electrospray, d'optique ionique d'injection (ion funnel ou porte de Bradbury-Nielsen), d'une cellule de diffusion, puis d'un analyseur en masse (Q-TOF pour la plupart). Des modifications ont été apportées à certains appareils pour des études spécifiques.

Un appareil commercial, le Synapt, utilisant la technologie TWIMS a été développé par la société Waters corporation. Ce montage couple une source electrospray, un quadripôle, un tube de mobilité TWIMS et un analyseur en masse à temps de vol (comme montré sur la figure suivante).

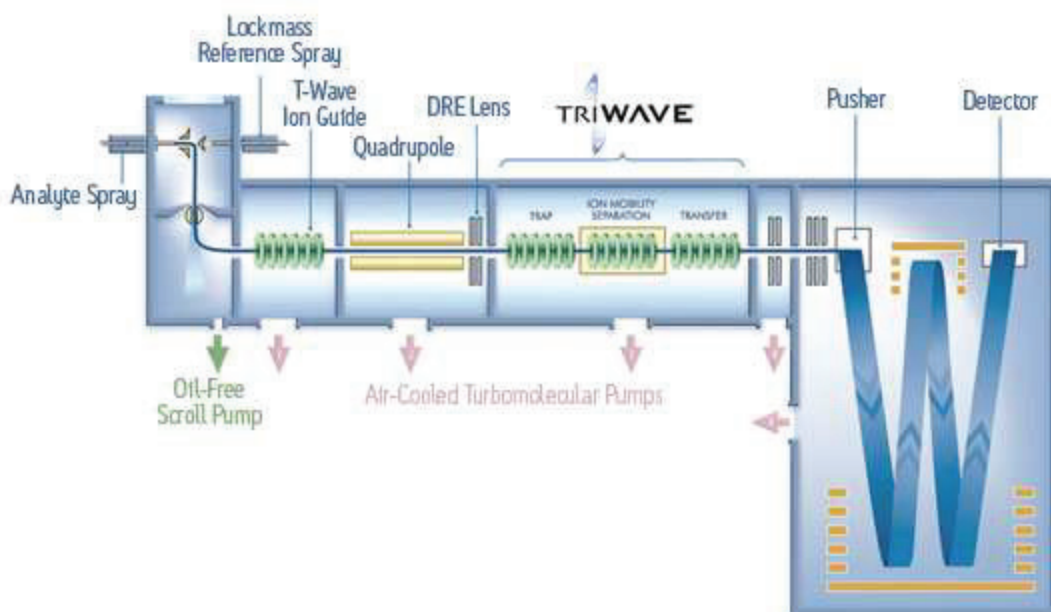


Figure III-11 : Schéma du dispositif Synapt

Cet appareil a l'avantage d'être très sensible. Par contre la résolution de l'analyseur TWIMS est très inférieure par rapport aux appareils de mobilité à champ homogène. De plus cette technique ne permet pas de remonter à la section efficace de collision, puisqu'il est difficile de trouver une relation simple entre la vitesse des ions et le champ électrique. Cette technique est donc surtout utilisée pour faire de la séparation d'isomères conformationnels. Elle peut être utilisée en complément d'analyse faite sur une expérience de mobilité à champ homogène. Dernièrement des études menées sur l'agrégation des protéines, en utilisant ces deux techniques ont permis de comprendre la formation de plaquettes impliquées dans la maladie d'Alzheimer<sup>42</sup>.

Clemmer et al<sup>43</sup> ont développé une expérience où l'on peut augmenter le facteur de séparation et la résolution en augmentant le nombre de cycle. Ceci a été rendu possible en utilisant une géométrie circulaire, ainsi on peut allonger la longueur de la cellule de mobilité (comme représenté sur la figure suivante).

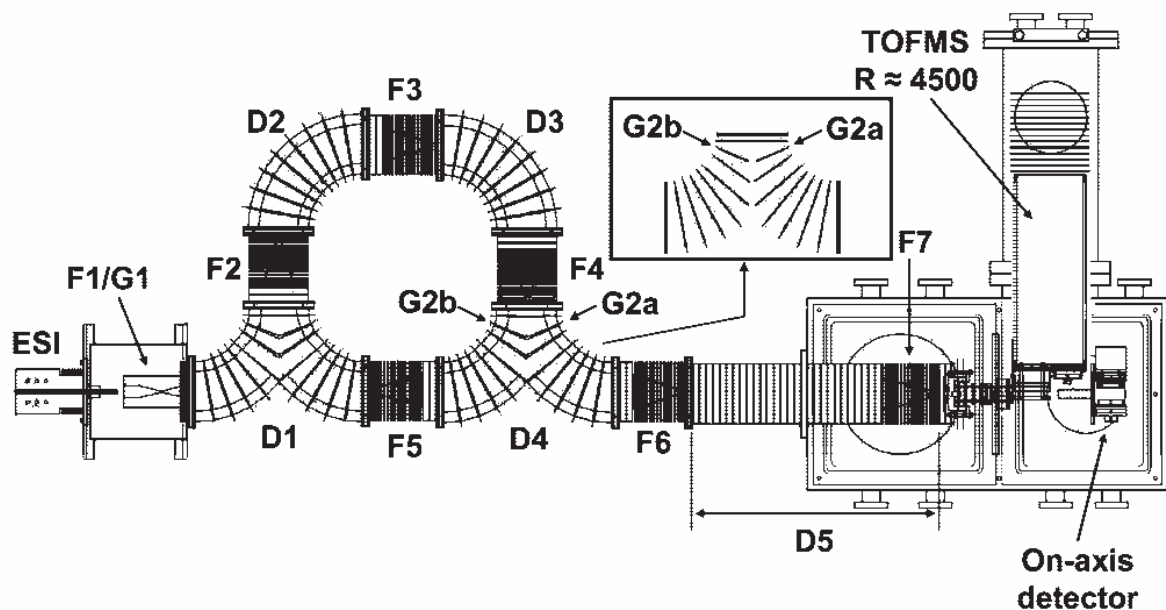


Figure III-12 : Schéma du dispositif de mobilité cyclotronique

Cette expérience est composée d'une source electrospray, d'un entonnoir à ions (de type funnel plus piège, Cf. Fig III-7) puis d'une série de cellule de mobilité séparée par des entonnoirs à ions.

## IV. De la section efficace expérimentale à la détermination de structure :

Lorsque l'on fait une mesure de mobilité ionique on détermine la section efficace de collision de l'ion étudié. Pour pouvoir remonter à sa géométrie, il faut comparer cette section efficace expérimentale avec une section efficace calculée sur des géométries d'essais déterminées par un calcul moléculaire.

### 1. La détermination de structures :

Pour déterminer un échantillon de structures représentatives il existe plusieurs méthodes. Le choix du calcul à utiliser se fait selon la taille du système étudié (nombre d'atomes) et le niveau de détail recherché (effets quantiques, effets de polarisation,...). Plus le système est complexe (biomolécules) plus il est difficile de déterminer une structure fiable. Pour les systèmes de petite taille, les calculs *ab initio* sont généralement utilisés. Pour les systèmes biologiques (généralement  $n > 100$  atomes) des champs de forces couplés à la dynamique moléculaire sont plus adaptés. Cela permet dans des temps raisonnables d'explorer le paysage conformationnel. Le champ de force utilisé dans cette étude est AMBER 99<sup>44</sup> (Assisted Model Building and Energy Refinement). Différentes méthodes d'optimisation permettent d'obtenir un échantillon de structures, nous pouvons citer la méthode du recuit simulé<sup>45</sup> (simulated annealing) qui donne l'ensemble des structures de basses énergies et la méthode d'échange de réplique<sup>46</sup> (replica-exchange) qui donne un ensemble de structure à une température donnée (Cf. Fig. IV-1).

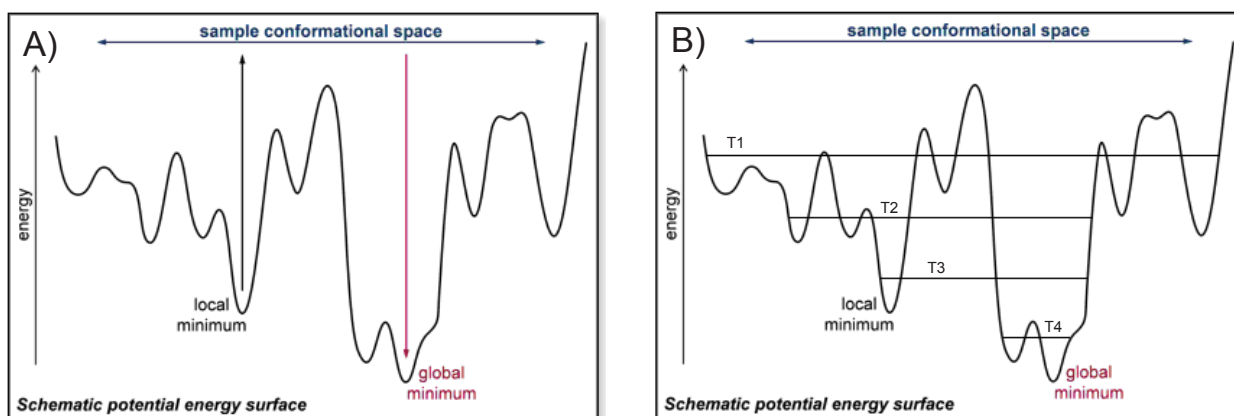


Figure IV-1 : A) Exploration des puits de potentiel par la méthode simulated annealing. B) Exploration des puits de potentiel par la méthode réplique-exchange.

Le recuit simulé tente de reproduire le processus naturel de cristallisation. En abaissant graduellement la température d'une substance fondue, on peut en principe obtenir un cristal parfait correspondant au minimum global d'énergie. Pratiquement, cette méthode consiste en plusieurs refroidissements et recuits successifs. Partant d'une température suffisamment élevée pour parcourir largement l'espace des phases, on refroidit lentement le système pour trouver les configurations les plus stables. Périodiquement, on chauffe pour permettre au système de quitter les minimas locaux dans lesquels il serait piégé.

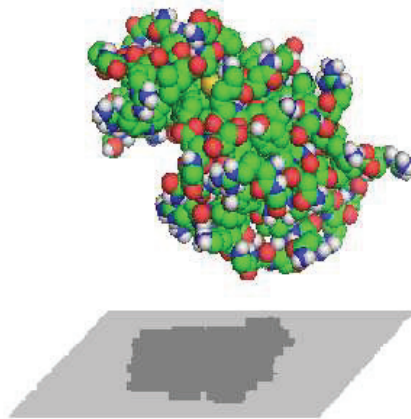
La méthode de réplique d'échange est très utilisée dans l'étude de biomolécules. Elle consiste à faire  $M$  copies indépendantes (répliques) du système à  $M$  températures fixées. A une température  $T_m$  donnée, une nouvelle configuration est créée à partir de l'ancienne. Ainsi en répétant cette opération un grand nombre de fois on peut explorer le paysage conformationnel et trouver un ensemble de structures à une température donnée. Cette méthode sera détaillée dans le chapitre 3.

## 2. Géométries versus section efficace de collision

Dès lors que l'on a obtenu un échantillon de structures en utilisant dans notre cas la dynamique moléculaire, il faut calculer les sections efficaces de collision de ces dernières. On dispose de plusieurs méthodes : projection de sphères dures<sup>47</sup>, calcul des trajectoires de diffusion exactes avec un modèle de sphères dures<sup>48</sup> et le calcul des trajectoires de diffusion en utilisant un potentiel intermoléculaire réaliste<sup>49</sup>. Nous allons maintenant préciser chacune des méthodes.

- Projection de sphères dures :

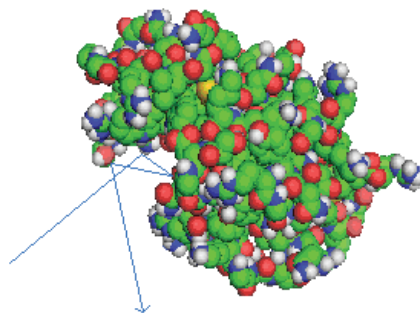
On considère le système étudié comme un ensemble de sphères rigides où chaque atome est considéré comme une sphère de rayon dépendant du type d'atome. Une rotation aléatoire dans toutes les dimensions de l'espace est appliquée au système et on moyenne la surface projetée. Cette méthode n'est pas très réaliste puisqu'elle ne prend en compte aucune interaction à longue distance entre l'ion et les molécules de gaz tampon. La valeur de section efficace calculée est la projection géométrique (Cf. Figure IV-2). Cette méthode est valable pour les petits systèmes de 10 à 100 atomes. Pour les grands systèmes elle n'est pas fiable puisqu'elle ne sonde pas en détail la surface. Si le gaz tampon utilisé est polarisable ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,...) cette méthode donne des résultats particulièrement faussés.



**Figure IV-2 : Projection de sphères dures**

- Calcul des trajectoires de diffusion exactes avec un modèle de sphères dures :

Le système est encore considéré comme un ensemble de sphères rigides. Mais dans cette méthode de calcul on va utiliser les trajectoires de diffusion, c'est-à-dire que l'on va considérer les collisions entre les atomes de gaz et les ions comme des réflexions spéculaires (transfert d'impulsion). Cette méthode est un peu plus réaliste que la précédente pour certaine géométrie (de type concave). On néglige toujours les interactions à longue distance, mais on tient compte de la forme de la surface de la molécule étudiée. Elle est utilisée pour des systèmes de grande taille supérieure à 1000 atomes.

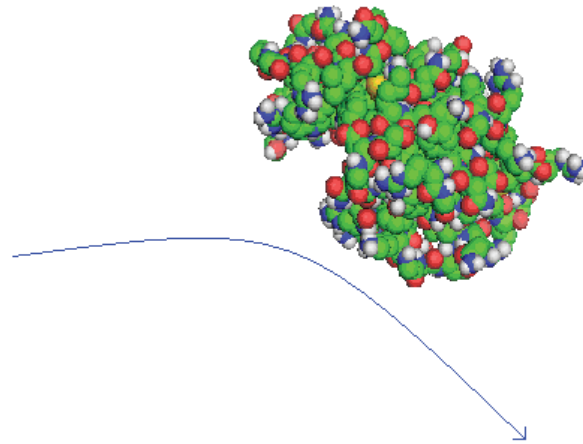


**Figure IV-3 : Calcul des trajectoires de diffusion exactes avec un modèle de sphères dures**

- Calcul des trajectoires de diffusion en utilisant un potentiel intermoléculaire réaliste :

Cette dernière méthode est la plus réaliste puisqu'elle utilise un potentiel intermoléculaire qui permet de prendre en compte les interactions à distance entre les molécules de gaz et les ions (C'est la seule méthode valable si le gaz tampon est polarisable). Ces potentiels sont de type

Lennard-Jones et ion-dipôle induit qui sont centrés à la position de chaque atome. Pour chaque trajectoire le transfert d'impulsion de l'atome de gaz tampon à l'ion étudié est déterminé (Cf. Fig. IV-4). Il va falloir calculer ces trajectoires pour l'ensemble des orientations possibles de l'ion et l'ensemble des paramètres d'espace. Ce calcul est plus couteux mais beaucoup plus précis. En particulier il prend en compte l'existence de trajectoires attractives à longue distance.



**Figure IV-4 : Calcul des trajectoires de diffusion en utilisant un potentiel intermoléculaire**



1. Bowers, M. T., Kemper, P. R., Vonhelden, G. & Vankoppen, P. A. M. Gas-Phase Ion Chromatography - Transition-Metal State Selection and Carbon Cluster Formation. *Science* **260**, 1446-1451 (1993).
2. Dugourd, P., Hudgins, R. R., Clemmer, D. E. & Jarrold, M. F. High-resolution ion mobility measurements. *Review of Scientific Instruments* **68**, 1122-1129 (1997).
3. Dwivedi, P. et al. Gas-phase chiral separations by ion mobility spectrometry. *Analytical Chemistry* **78**, 8200-8206 (2006).
4. Clowers, B. H., Dwivedi, P., Steiner, W. E., Hill, H. H. & Bendiak, B. Separation of sodiated isobaric disaccharides and trisaccharides using electrospray ionization-atmospheric pressure ion mobility-time of flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **16**, 660-669 (2005).
5. Ruotolo, B. T. et al. Ion mobility-mass spectrometry reveals long-lived, unfolded intermediates in the dissociation of protein complexes. *Angewandte Chemie-International Edition* **46**, 8001-8004 (2007).
6. Revercomb, H. E. & Mason, E. A. Theory of Plasma Chromatography Gaseous Electrophoresis - Review. *Analytical Chemistry* **47**, 970-983 (1975).
7. Whealton, J. H. & Mason, E. A. Transport-Coefficients of Gaseous Ions in an Electric-Field. *Annals of Physics* **84**, 8-38 (1974).
8. Kennard, E. H. *Kinetic Theory of Gases* (McGraw-Hill, New York, 1938).
9. Langevin, P. The ionisation of gases. *Annales De Chimie Et De Physique* **28**, 289-384 (1903).
10. Langevin, P. A fundamental formula of kinetic theory. *Annales De Chimie Et De Physique* **5**, 245-288 (1905).
11. Ridler, J. H. M. a. K. E. W. The Speed of Positive Ions in Nitrogen. *Proceedings of the Royal Society* **146**, 911-921 (1934).
12. Cravath, A. M. The rate of formation of negative ions by electron attachment. *Physical Review* **33**, 0605-0613 (1929).
13. de Graaff, R. J. V. The mobility of ions in gases. *Nature* **124**, 10-11 (1929).
14. Bradbury, N. E. & Nielsen, R. A. Absolute values of the electron mobility in hydrogen. *Physical Review* **49**, 0388-0393 (1936).
15. Edward A. Mason, E. W. M. *Transport Properties of Ions in Gases* (Wiley, New York, 1988).
16. McDaniel, E. W. (ed. Wiley, J.) pp. 67-76 (New York, 1964).
17. Cohen, M. J. & Karasek, F. W. Plasma Chromatography - a New Dimension for Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **8**, 330-& (1970).
18. Karasek, F. W. & Fong, I. Analysis of Chlorinated Benzene Compounds by Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **9**, 497-& (1971).
19. Carroll, D. I., Dzidic, I., Stillwell, R. N., Haegele, K. D. & Horning, E. C. Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometry - Corona Discharge Ion-Source for Use in Liquid Chromatograph Mass Spectrometer-Computer Analytical System. *Analytical Chemistry* **47**, 2369-2373 (1975).
20. Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgwick, R. D. & Tyler, A. N. Fast Atom Bombardment of Solids as an Ion-Source in Mass-Spectrometry. *Nature* **293**, 270-275 (1981).
21. Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. *Journal of Physical Chemistry* **88**, 4451-4459 (1984).
22. Rohner, T. C., Lion, N. & Girault, H. H. Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**, 3056-3068 (2004).
23. Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *Transactions-American Geophysical Union* **56**, 992-993 (1975).



24. Dole, M., Mack, L. L. & Hines, R. L. Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics* **49**, 2240-& (1968).
25. de la Mora, J. F. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Analytica Chimica Acta* **406**, 93-104 (2000).
26. Kebarle, P. & Peschke, M. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta* **406**, 11-35 (2000).
27. Nemes, P., Marginean, I. & Vertes, A. Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays. *Analytical Chemistry* **79**, 3105-3116 (2007).
28. Karas, M., Bachmann, D. & Hillenkamp, F. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet-Laser Desorption Mass-Spectrometry of Organic-Molecules. *Analytical Chemistry* **57**, 2935-2939 (1985).
29. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Analytical Chemistry* **60**, 2299-2301 (1988).
30. Tanaka K, W. H., Ido Y, et al., Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser desorption of non-volatile compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2** (1988).
31. Shaffer, S. A. et al. A novel ion funnel for focusing ions at elevated pressure using electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**, 1813-1817 (1997).
32. Clowers, B. H. et al. Enhanced ion utilization efficiency using an electrodynamic ion funnel trap as an injection mechanism for ion mobility spectrometry. *Analytical Chemistry* **80**, 612-623 (2008).
33. Buryakov, I. A., Krylov, E. V., Nazarov, E. G. & Rasulev, U. K. A New Method of Separation of Multi-Atomic Ions by Mobility at Atmospheric-Pressure Using a High-Frequency Amplitude-Asymmetric Strong Electric-Field. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **128**, 143-148 (1993).
34. Shvartsburg, A. A., Mashkevich, S. V. & Smith, R. D. Feasibility of higher-order differential ion mobility separations using new asymmetric waveforms. *Journal of Physical Chemistry A* **110**, 2663-2673 (2006).
35. Giles, K. et al. Applications of a travelling wave-based radio-frequencyonly stacked ring ion guide. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 2401-2414 (2004).
36. Pringle, S. D. et al. An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument. *International Journal of Mass Spectrometry* **261**, 1-12 (2007).
37. Leary, J. A. et al. Methodology for Measuring Conformation of Solvent-Disrupted Protein Subunits using T-WAVE Ion Mobility MS: An Investigation into Eukaryotic Initiation Factors. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20**, 1699-1706 (2009).
38. Ruotolo, B. T., Benesch, J. L. P., Sandercock, A. M., Hyung, S. J. & Robinson, C. V. Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nature Protocols* **3**, 1139-1152 (2008).
39. Vonhelden, G., Wyttenbach, T. & Bowers, M. T. Conformation of Macromolecules in the Gas-Phase - Use of Matrix-Assisted Laser-Desorption Methods in Ion Chromatography. *Science* **267**, 1483-1485 (1995).
40. Clemmer, D. E., Hudgins, R. R. & Jarrold, M. F. Naked Protein Conformations - Cytochrome-C in the Gas-Phase. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 10141-10142 (1995).
41. Hudgins, R. R., Dugourd, P., Tenenbaum, J. M. & Jarrold, M. F. Structural transitions in sodium chloride nanocrystals. *Physical Review Letters* **78**, 4213-4216 (1997).

42. Bernstein, S. L. et al. Amyloid-beta protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nature Chemistry* **1**, 326-331 (2009).
43. Merenbloom, S. I., Glaskin, R. S., Henson, Z. B. & Clemmer, D. E. High-Resolution Ion Cyclotron Mobility Spectrometry. *Analytical Chemistry* **81**, 1482-1487 (2009).
44. Wang, J. M., Cieplak, P. & Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry* **21**, 1049-1074 (2000).
45. Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D. & Vecchi, M. P. Optimization by Simulated Annealing. *Science* **220**, 671-680 (1983).
46. Hansmann, U. H. E. Parallel tempering algorithm for conformational studies of biological molecules. *Chemical Physics Letters* **281**, 140-150 (1997).
47. Vonhelden, G., Hsu, M. T., Gotts, N. & Bowers, M. T. Carbon Cluster Cations with up to 84 Atoms - Structures, Formation Mechanism, and Reactivity. *Journal of Physical Chemistry* **97**, 8182-8192 (1993).
48. Shvartsburg, A. A. & Jarrold, M. F. An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions. *Chemical Physics Letters* **261**, 86-91 (1996).
49. Mesleh, M. F., Hunter, J. M., Shvartsburg, A. A., Schatz, G. C. & Jarrold, M. F. Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 16082-16086 (1996).



# Chapitre 2 :

## Dispositif et développements instrumentaux.

I.	Présentation générale :	42
II.	MicroQTOF :	42
III.	Développement instrumental :	47
1.	Le modèle de simulation :	48
a.	Simion 3D 7.0 :	48
b.	Description du modèle :	49
2.	Test de validité du modèle dans un champ électrique statique :	51
3.	Test de validité du modèle dans un champ radiofréquence :	53
4.	Piège ionique cylindrique fonctionnant à haute pression :	55
IV.	Fonctionnement de l'expérience :	64
1.	Principe :	64
2.	Interfaces de contrôle :	65
3.	Traitement des résultats :	67
4.	Optimisation des paramètres :	70
V.	Conclusion :	71

## I. Présentation générale :

L'expérience MS+ couple un spectromètre de masse (MS) commercial (MicroQTOF Bruker) à un tube de mobilité ionique (IMS) développé au laboratoire (construction SMGOP Grenoble). Le dispositif expérimental est schématisé sur la figure I-1 :

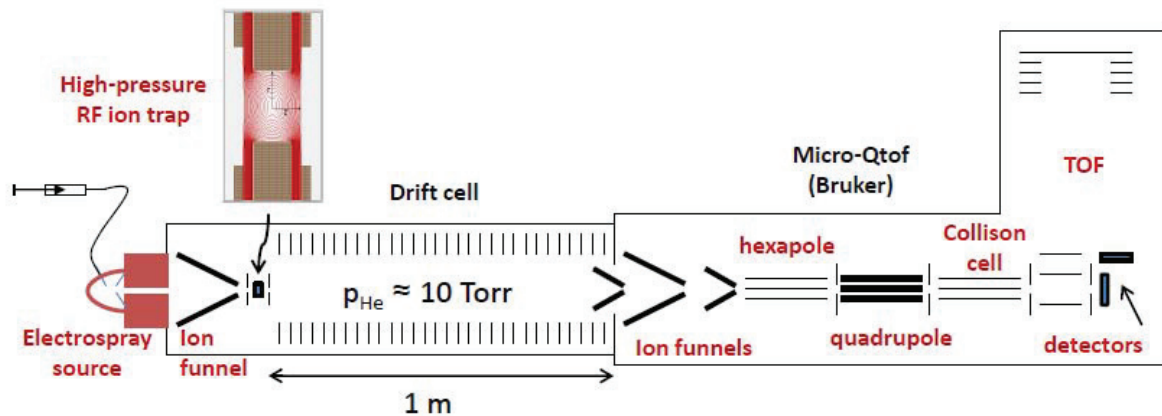


Figure I-1 : Expérience MS+ : Schéma des éléments constituant le couplage IMS/MS.

Le tube de mobilité ionique a été inséré entre la source électrospray et les entonnoirs à ions du spectromètre de masse. Les ions produits en continu par la source sont injectés, périodiquement et par paquet, dans le tube de mobilité ionique. Leurs stockages et leurs injections sont réalisés par le piège à ions. L'enregistrement des spectres de masse en fonction du temps, à intervalle régulier, permet de construire des spectres de mobilité et de remonter aux temps de diffusion résolus en rapport  $m/z$ . Nous allons présenter l'appareil commercial dans un premier temps, puis nous présenterons la partie tube de mobilité ionique qui a été développée au laboratoire ainsi que les simulations réalisées. Enfin nous parlerons du fonctionnement et des caractéristiques de l'expérience.

## II. MicroQTOF :

Le MicroQTOF Bruker est un spectromètre de masse qui comporte une source électrospray, deux entonnoirs à ions, un hexapôle, un quadripôle, une cellule de collision ainsi qu'un spectromètre de masse à temps de vol avec réflectron. Le schéma de l'appareil commercial est présenté sur la figure II-1.

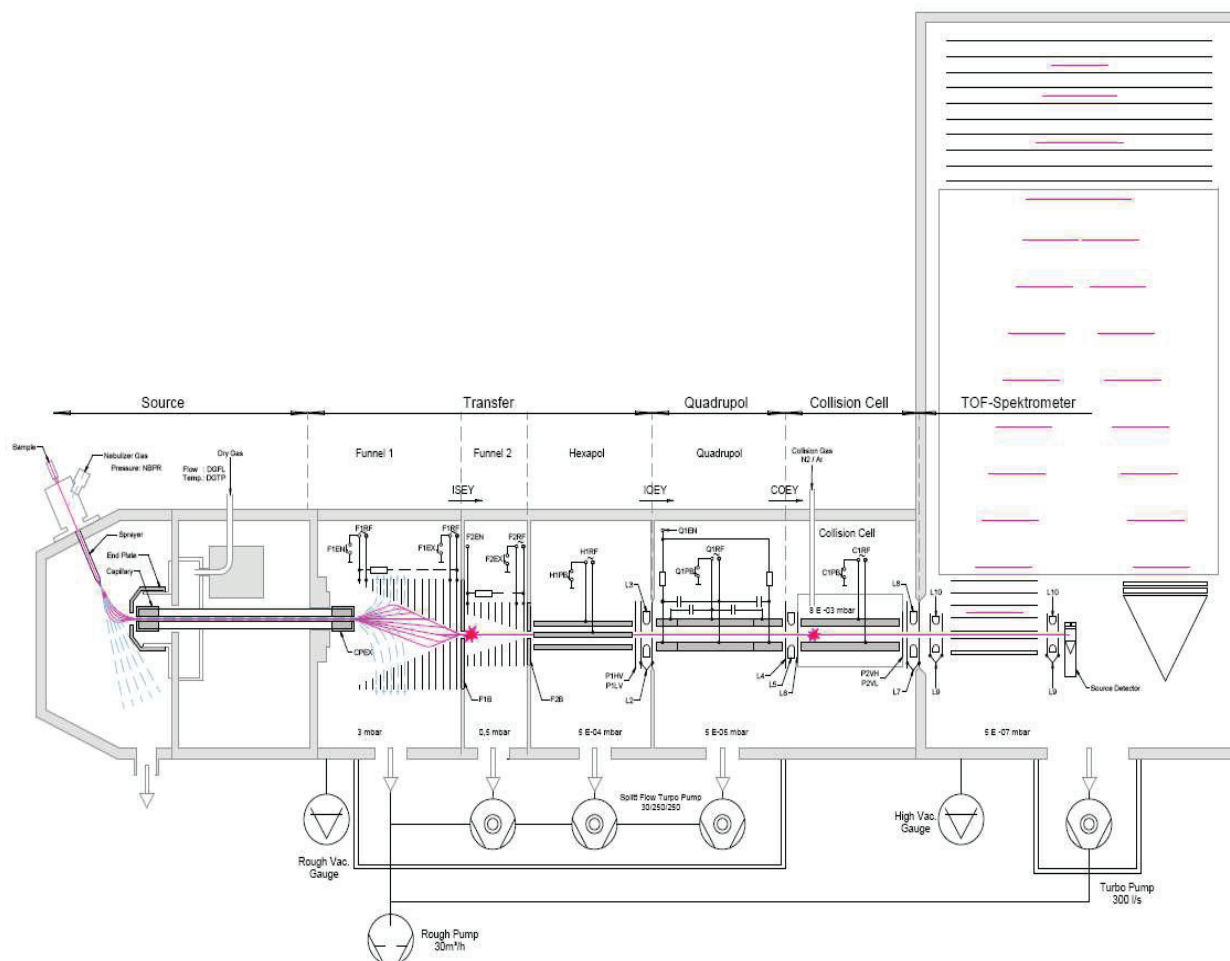


Figure II-1 : Schéma du MicroQTOF Bruker<sup>1</sup>

Cet appareil est principalement utilisé pour faire des analyses en mode MS/MS. C'est-à-dire qu'un ion parent est sélectionné par le quadripôle, il est fragmenté dans la cellule de collision et les fragments fils obtenus sont analysés par le spectromètre à temps de vol. La technique de MS/MS est très utilisée en analyse de biomolécules et principalement de protéines pour les séquencer et les identifier.

La source electrospray, dont le principe a été détaillé dans le chapitre précédent, est composée d'un nébuliseur composé de deux capillaires. Le premier qui est en inox, a un diamètre intérieur de 100µm dans lequel circule la solution comportant l'analyte. L'échantillon est infusé avec un débit d'une centaine de µL par heure. Ce premier capillaire se trouve à l'intérieur d'un second, qui a un diamètre intérieur de 200µm, dans ce dernier circule un flux d'azote. Ce nébuliseur permet la formation de fines gouttelettes chargées. La différence de potentiel entre le nébuliseur et le capillaire est de 5kV. Le capillaire qui est en verre, est chauffé par un gaz séchant, la température peut varier de la température ambiante à 250°C. Cette source permet une ionisation dans des conditions douces qui sont bien adaptées à l'analyse de systèmes biologiques. L'électronébulisation s'opère à pression atmosphérique

alors que l'analyse par le spectromètre de masse à temps de vol est réalisée dans un vide de  $5.10^{-7}$  mbar. Il y a donc plusieurs étages de pompage accompagné d'un pompage différentiel comme représenté sur la figure II-1. Le vide primaire est obtenu par une pompe à palette, le vide secondaire est quant à lui obtenu à l'aide de pompes turbomoléculaires.

Pour transmettre les ions dans les zones où la pression est relativement élevée (3mbar) les entonnoirs à ions sont bien adaptés. Ils ont été développés par Smith et al.<sup>2</sup>. Comme représentés sur la figure II-2, ils sont composés d'électrodes dont le diamètre interne diminue régulièrement. Un gradient de potentiel est appliqué pour transmettre les ions à travers l'édifice électrostatique, un champ radiofréquence (RF) est appliqué sur chaque électrode (deux électrodes successives ont une tension RF en opposition de phase) pour refocaliser les ions.

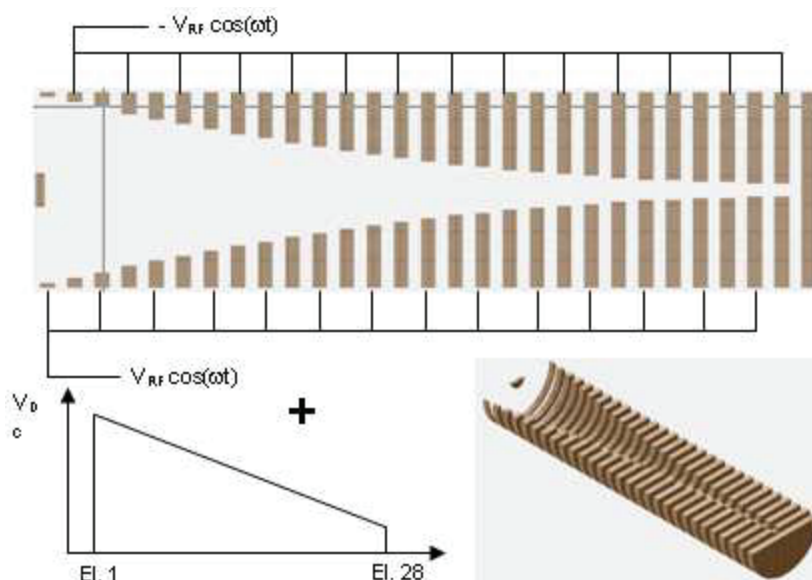


Figure II-2 : Schéma et vue 3D de l'entonnoir à ions et tensions DC et RF.

Il y a deux entonnoirs à ions à la suite sur le MicroQTOF, ainsi les ions peuvent être transmis en migrant dans des zones où la pression varie (3mbar sur funnel 1, 0.5mbar sur funnel 2). Comme on peut le constater sur la figure suivante, le capillaire de la source electrospray est décalé de 5mm par rapport à l'axe du funnel, ceci dans le but d'éliminer les espèces non ionisées présentes à la sortie du capillaire. Après les deux entonnoirs à ions il y a un hexapôle, qui a comme rôle de guider les ions jusqu'au quadripôle. Son efficacité dépend de la pression, dans l'expérience il se trouve dans une zone où la pression est de  $3.10^{-4}$  mbar. Son fonctionnement repose sur le guidage d'ions dans des champs RF multipolaires<sup>3</sup>. La partie entonnoirs à ions et hexapôle constitue la zone de transfert des ions (Cf. Fig. II-3).

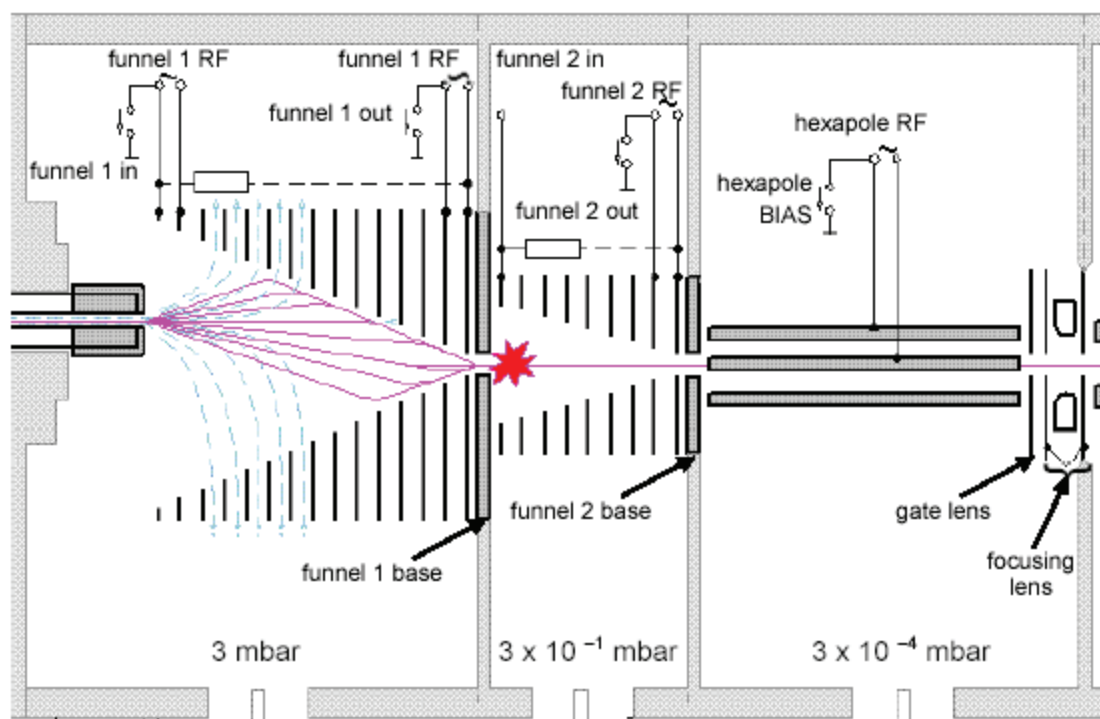


Figure II-3 : Transfert des ions.

Le quadripôle peut être utilisé comme guide à ions ou comme filtre de masse. L'analyseur quadripolaire est un ensemble de deux paires d'électrodes métalliques parallèles et équidistantes de l'axe central, comme représenté sur la figure II-4.

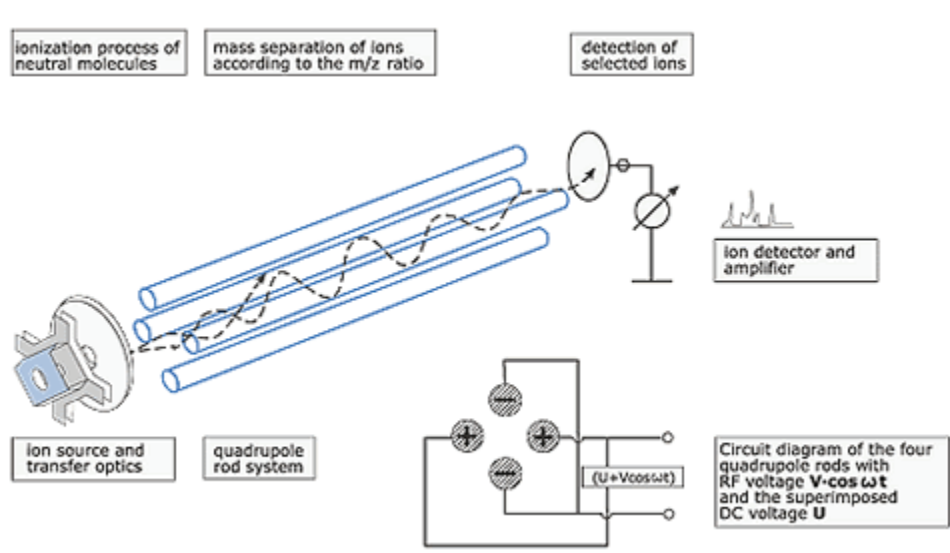


Figure II-4 : Quadripôle Vue en 3D et tensions DC et RF appliquées sur les électrodes

Chaque paire d'électrodes diamétralement opposées est portée à un même potentiel et de signe opposé à l'autre paire d'électrodes. La superposition d'une composante continue et d'une composante sinusoïdale :  $\pm(U+V\cos(\omega t))$ , impose aux ions une trajectoire oscillante



(cf. fig. II-4). Pour un rapport  $m/z$  donné, il est possible de définir une région de stabilité en fonction de  $U$  et de  $V$  (Cf. Figure II-5), pour laquelle la trajectoire de l'ion sera stable. Ce diagramme de stabilité est obtenu par résolution des équations de Mathieu (détaillées par la suite) dont les solutions sont des coordonnées proportionnelles à  $U$  et  $V$  pour un ion de rapport  $m/z$  donné.

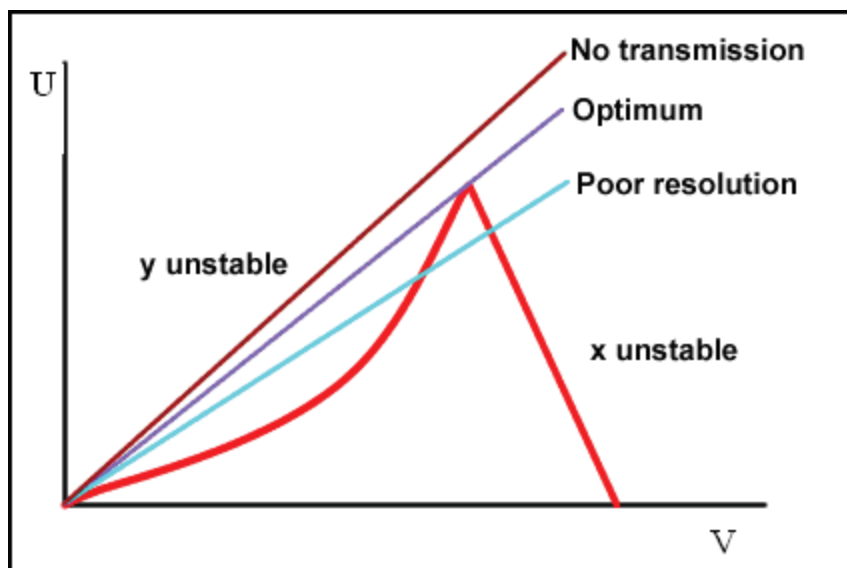


Figure II-5 : Diagramme de stabilité d'un ion dans un quadripôle

A la suite du quadripôle il y a une cellule de collision qui est un quadripôle dans lequel on peut introduire une pression d'argon. Les collisions avec ce gaz vont fragmenter les ions qui auront été préalablement sélectionnés par le quadripôle. Cette technique est la dissociation induite par collision (CID)<sup>4</sup>. Le quadripôle et la cellule de collision sont dans une zone où la pression est de  $5 \cdot 10^{-5}$  mbar.

Un spectromètre de masse de type temps de vol<sup>5</sup> est composé de deux parties, une première zone d'accélération perpendiculaire et une zone de vol libre sous un vide poussé  $5 \cdot 10^{-7}$  mbar. La mesure du temps de vol d'un ion permet de remonter à sa vitesse. Cette vitesse étant directement proportionnelle au rapport  $(m/z)^{1/2}$ . L'utilisation d'une première zone d'extraction puis de zone d'accélération permet de compenser la dispersion spatiale initiale des ions<sup>6</sup>.

L'utilisation d'un réflectron<sup>7</sup> (Cf. Fig II.6), permet d'augmenter la résolution en masse en compensant l'élargissement des pics du à la dispersion initiale d'énergie cinétique. La résolution maximale est de 15000. Le TOF peut fonctionner à une fréquence de 10kHz pour une gamme de rapport  $m/z$  de 50 à 6000.

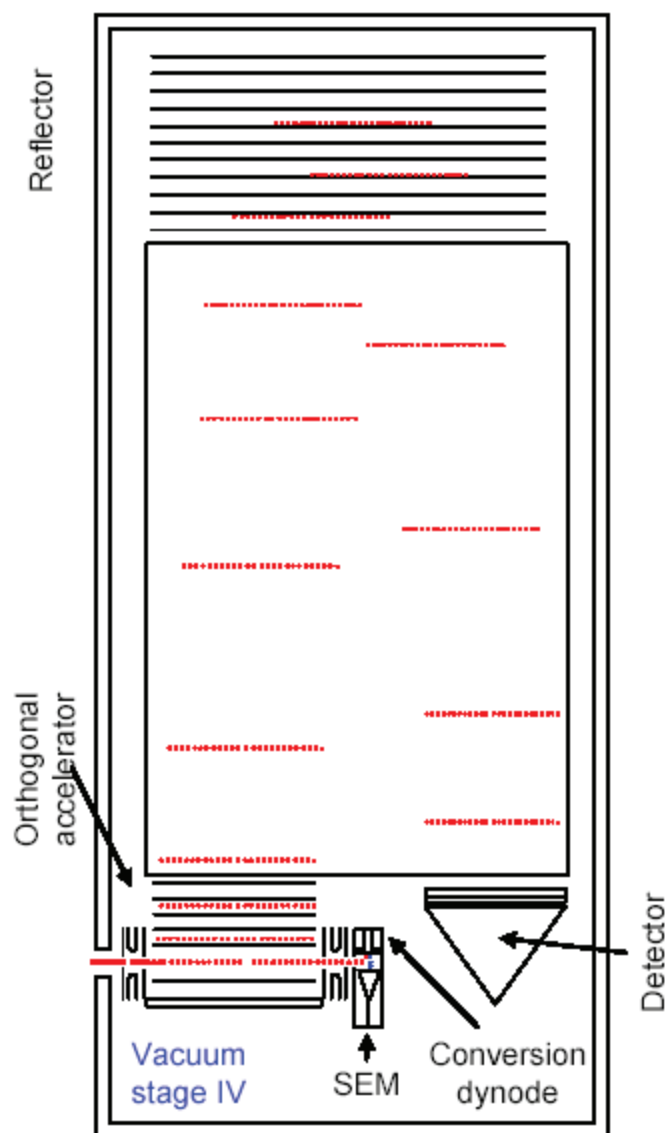


Figure II-6 : Temps de vol avec réflectron, les pointillés rouges correspondent aux trajectoires des ions dans le réflectron (U inversé).

### III. Développement instrumental :

L'expérience MS+ a été développée en couplant le MicroQTOF avec un tube de mobilité ionique placé entre la source electrospray et les deux entonnoirs à ions servant à l'injection des ions dans le spectromètre de masse.

Il y a trois principales contraintes sur cette expérience. La première est de garder une bonne sensibilité malgré l'ajout d'un tube de mobilité de 1m de long. La seconde est de ne pas perturber la mesure de diffusion dans la partie MicroQTOF, c'est-à-dire sans perdre la temporalité. La troisième est de pouvoir injecter des paquets d'ions dans le tube de mobilité provenant de la source electrospray qui produit les ions en continue. Pour répondre à ces contraintes nous avons développé des entonnoirs à ions pour augmenter la transmission des

ions, donc la sensibilité. Le premier sert à transmettre et à refocaliser les ions provenant de la source electrospray, le second est placé à la sortie du tube de mobilité et permet de refocaliser les ions qui diffusent dans le tube. Nous avons également conçu un piège ionique fonctionnant à haute pression pour pouvoir stocker et injecter des paquets d'ions sur des temps courts (environ 1ms). Pour dimensionner et appréhender le comportement des ions dans ces optiques ioniques nous avons dû réaliser des simulations. Dans un premier temps nous allons présenter le modèle de simulation qui a été utilisé, puis nous montrerons les résultats de simulations qui ont permis de valider le modèle utilisé enfin nous présenterons le dimensionnement du piège ionique.

## 1. Le modèle de simulation :

### a. *Simion 3D 7.0<sup>8</sup>* :

Simion est un logiciel permettant de simuler la trajectoire d'ions ou de particules chargées dans un environnement électromagnétique. En pratique trois étapes sont nécessaires pour faire ces simulations. Tout d'abord la création d'un ensemble d'électrodes et la définition des potentiels imposés à ces électrodes. Ensuite le calcul du potentiel électrostatique dans tout l'espace soumis à l'influence des électrodes. Cette étape se fait par résolution numérique de l'équation de Laplace. Enfin le calcul et la visualisation des trajectoires des ions sous l'influence de ce champ électrostatique. Dans cette dernière étape il est possible d'implémenter un programme qui permet d'avoir une interactivité avec le logiciel, cette partie sera détaillée par la suite.

Le logiciel Simion repose, comme la plupart des logiciels de simulation numérique, sur une discrétisation de l'espace à modéliser en un ensemble de points qui constituent le maillage. Le potentiel en chaque point à l'intérieur de l'assemblage électrostatique peut être obtenu en résolvant l'équation de Laplace; ceci en tenant compte des conditions limite imposées par les potentiels des électrodes. L'équation de Laplace (Eq. III-1) est résolue en prenant une densité volumique de charge nulle, c'est à dire sans tenir compte de la charge d'espace. Le potentiel en tout point de l'espace, est défini grâce aux propriétés du potentiel au voisinage.

$$\Delta V = 0 \quad \text{eq. III-1}$$

Dans un espace discret bidimensionnel, l'équation de Laplace est satisfaite lorsque le potentiel de chaque point est estimé comme une moyenne des quatre potentiels des plus proches voisins sur le maillage considéré (Eq. III-2) :

$$V = \frac{V_1 + V_2 + V_3 + V_4}{4} \quad \text{eq. III-2}$$

La précision de la résolution numérique de l'équation de Laplace en tout point dépend de la définition de l'échelle de maillage (qui est définie comme des mm par unité de grille). Cette résolution numérique est réalisée par une technique itérative de différence finie. Ces techniques nécessitent beaucoup de mémoire ce qui limite la taille des maillages utilisés.

Ce logiciel est très utilisé dans le dimensionnement des optiques ioniques des appareils de spectrométrie de masse, microscopes électroniques, de multiplicateurs d'électrons et autres instruments scientifiques mettant en jeu des ions ou électrons dans des environnements électriques et/ou magnétiques.

Simion utilise, pour simuler la trajectoire des ions dans les vides, un pas de temps ( $\Delta t$ ) durant lequel les ions se déplacent dans l'édifice électrostatique d'une distance  $\Delta\gamma(x,y,z)$ . L'incrément de temps est variable et est géré par Simion. Il dépend de la valeur de champ électrique et du gradient de champ électrique au point considéré  $(x,y,z)$ . Dans notre modèle le pas de temps utilisé sera fixe.

### ***b. Description du modèle :***

Pour simuler notre expérience un programme additionnel rédigé en langage SL (Simion) a été implémenté dans Simion. Ce programme permet de définir les trajectoires d'ions à haute pression (5-25Torr). Ce modèle s'inspire de celui proposé par Jarrold et al.<sup>9</sup> pour simuler des trajectoires dans des entonnoirs à ions, il est basé sur l'hypothèse que le nombre de collisions est important pendant une oscillation (1000 collisions) et la limite des champs faibles. Dans ce modèle, on définit un pas de temps ( $\Delta t$ ) correspondant à l'inverse des fréquences de collisions (libre parcours moyen).  $\Delta t$  correspond donc au déplacement de l'ion entre deux collisions. Ce pas de temps est défini par la théorie cinétique des gaz (Eq. III-3), il dépend donc des conditions de pression, de la température, du gaz, etc...

$$\Delta t \approx 4 \left( n v_{gas} \pi d_{ion}^2 \right)^{-1} \quad \text{eq. III-3}$$

La trajectoire des ions dépend du champ électrique ainsi que du terme de diffusion qui décrit le mouvement stochastique des ions. La diffusion est définie par la loi de Townsend-Einstein,

$$D = kTK/(ze) \quad \text{eq. III-4}$$

La diffusion est modélisée en bougeant un ion dans une direction aléatoire dans les trois dimensions de l'espace d'une distance donnée par l'équation III-5 :

$$d^1_{x,y,z} = +/- (2\Delta t D)^{1/2} \quad \text{eq. III-5}$$

Simultanément la trajectoire de l'ion est modifiée par sa réponse au champ électrique DC et/ou RF :

$$d^2_{x,y,z} = eD/kT\Delta t(E_{dc} + E_{rf})_{x,y,z} \quad \text{eq. III-6}$$

Le mouvement d'un ion pendant  $\Delta t$  est donc donné par la somme des deux équations précédente. Dans ces équations D est la constante de diffusion, e est la charge ionique, k est la constante de Boltzmann,  $\Delta t$  est le pas de temps, T est la température du gaz, K est la mobilité ionique et  $E_{dc}$  et  $E_{rf}$  sont respectivement le champ électrique dc et rf. Ce modèle est valable pour un régime de mobilité. Le diagramme suivant présente un organigramme du programme utilisé.

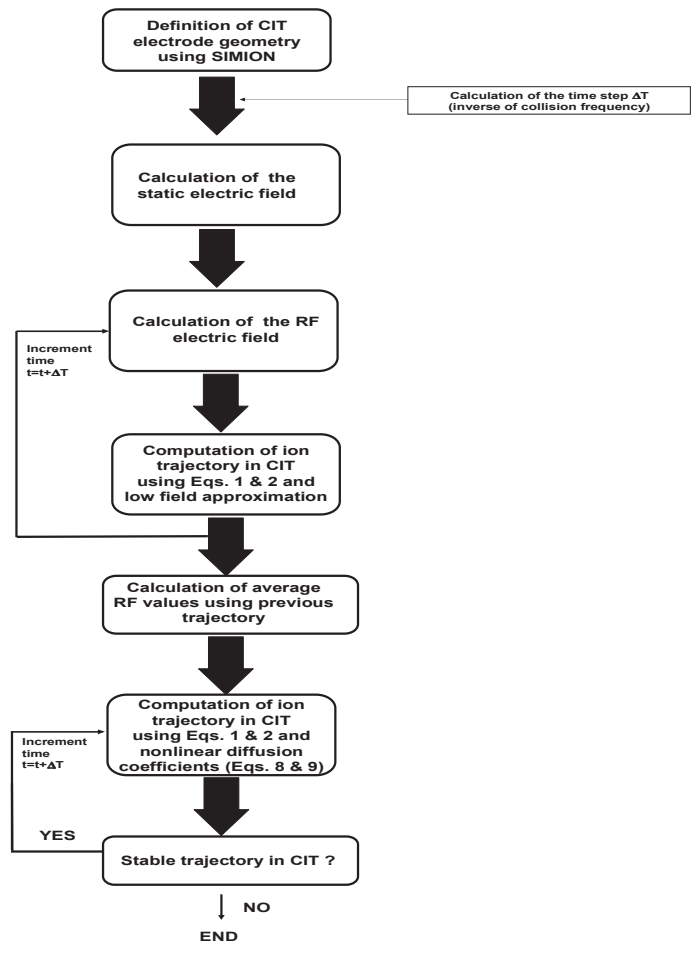


Figure III-1 : Organigramme du programme de simulation utilisé.

## 2. Test de validité du modèle dans un champ électrique statique :

Les premières simulations ont été réalisées sur le tube de mobilité ionique. Le tube de mobilité fait de 1m de long et comporte 101 électrodes séparées de 1 cm par un isolant (PEEK). Dans ce tube règne un champ électrique homogène de 10V/cm et une pression de l'ordre d'une dizaine de Torr. La figure suivante représente le tube de mobilité ionique :

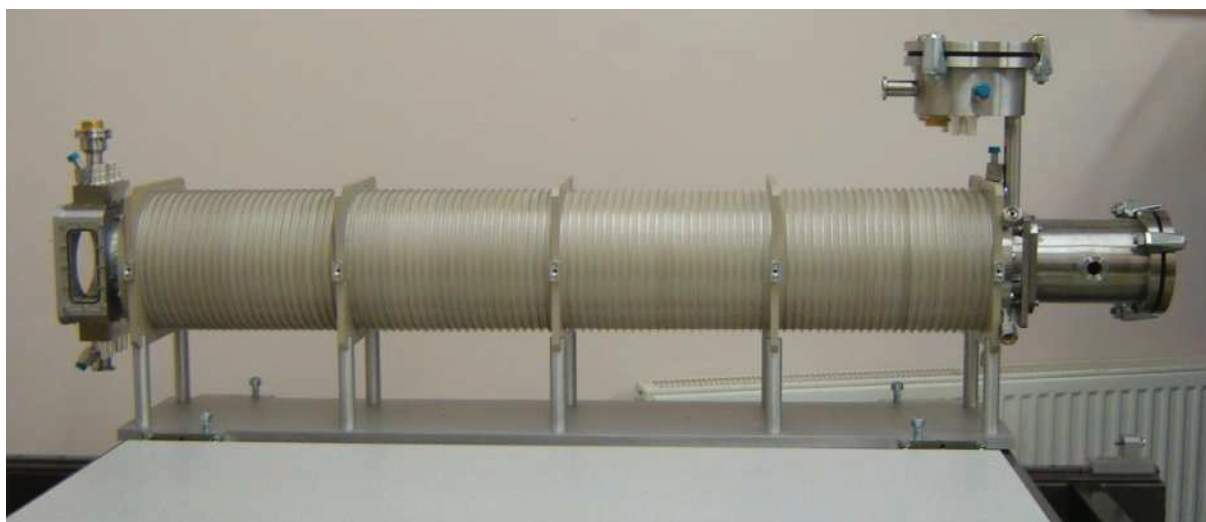
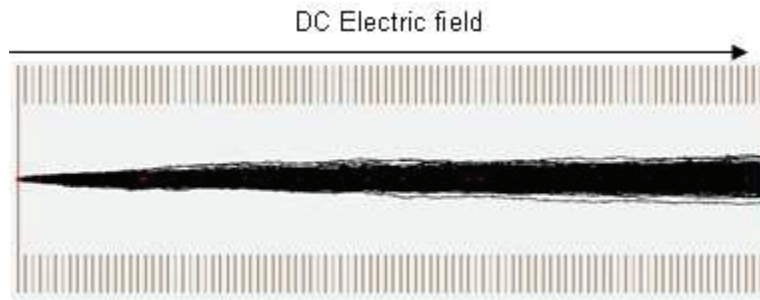


Figure III-2 : Le tube de mobilité ionique.

Les simulations réalisées miment l'expérience et vont nous permettre de valider notre modèle de diffusion. L'ion modèle qui a été utilisé pour ces simulations est la bradykinine chargée deux fois. Ce système a été choisi car c'est un peptide modèle que nous utiliserons pour calibrer ultérieurement l'expérience. Le tableau suivant présente les paramètres utilisés dans ces simulations.

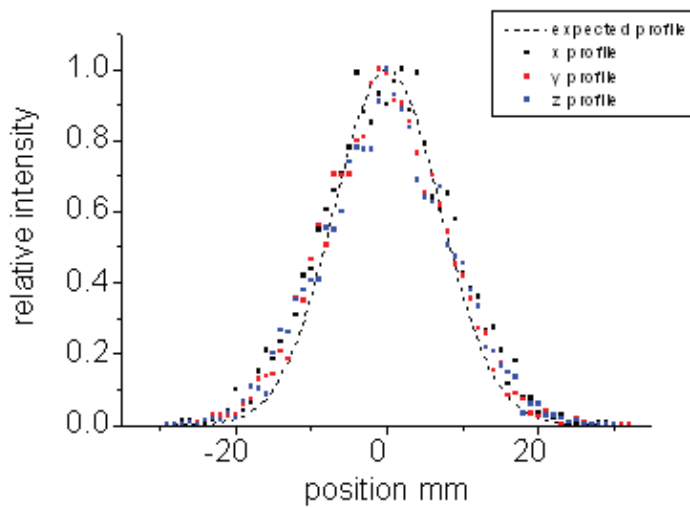
Masse de la bradykinine	1060 g/mol
Charge de la bradykinine	2+
Masse du gaz tampon	4 g/mol
Mobilité réduite de la Bradykinine	4.42 cm <sup>2</sup> /V.s
Rayon de l'ion	8.85 Å
Température	293 K
Pression	10 Torr
Champ électrique	10V/cm

3000 ions ont été injectés un par un dans le tube de mobilité ionique et leurs coordonnées d'arrivée ont été déterminées, la figure III-3 présente leurs trajectoires.



**Figure III-3 : Trajectoires simulées dans le tube de mobilité ionique. Conditions initiales  $x=y=z=0$  et  $V_x=V_y=V_z=0$ .**

Ainsi on peut tracer pour les trois dimensions de l'espace les profils d'arrivés en positions (Cf. fig. III-4).



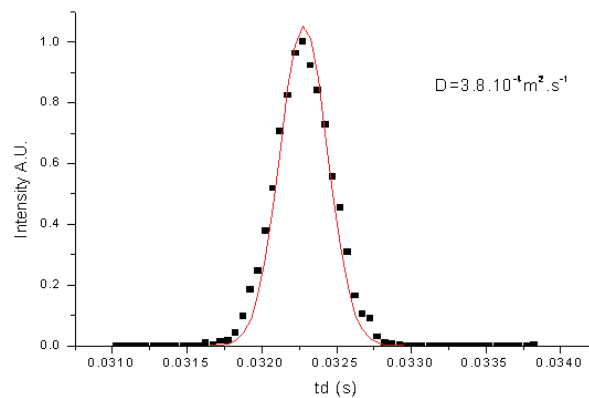
**Figure III-4 : Comparaison des dispersions obtenues par simulation avec la loi de Fick**

Ces profils ont été comparés à la loi de Fick, qui permet de recalculer la diffusion d'un nuage de particules en fonction du temps. A  $t$  donné la probabilité de trouver une particule à la distance  $x$  de sa position initiale est donnée par l'équation suivante (Cf. chapitre1) :

$$p(x)dx = \frac{dx}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad \text{eq. III-7}$$

On remarque que les profils sont tout à fait similaires ce qui permet de valider notre modèle.

Le profil du temps d'arrivée des ions est présenté sur la figure III-5.



**Figure III-5 : Profil de temps comparé à la loi de Fick**

La comparaison de nos résultats avec la loi de Fick sont en accord. Cette dispersion en temps dans le tube de mobilité ionique a été expliquée dans le premier chapitre et explique le fait que l'on ait une résolution limite pour une température, une tension et un gaz donné. Nous reviendrons sur cette résolution dans les caractéristiques de l'expérience.

### **3. Test de validité du modèle dans un champ radiofréquence :**

Les entonnoirs à ions ont été développés par R. D. Smith en 1997<sup>2,10</sup>. La transmission des ions produits à pression atmosphérique vers les spectromètres de masse qui travaillent à pression réduite est un défi de taille. Ces entonnoirs à ions ont la particularité de pouvoir transmettre de manière significative les ions tout en les refocalisant. Ils sont composés d'un empilement d'électrodes avec un diamètre interne décroissant (cf. Fig. III-6). La combinaison de champ DC et RF ainsi que la géométrie en forme d'entonnoir font de ces édifices électrostatiques un guide d'ions parfaitement adapté à fonctionner à des pressions de 1 à 10 Torr. Une tension RF est utilisée pour focaliser les ions et une tension DC pour les entrainer. Deux entonnoirs à ions, placés après la source electrospray et à la sortie du tube, ont été développés pour augmenter la sensibilité de l'expérience.

La figure III-6 présente les trajectoires des ions au sein de ces entonnoirs à ions :



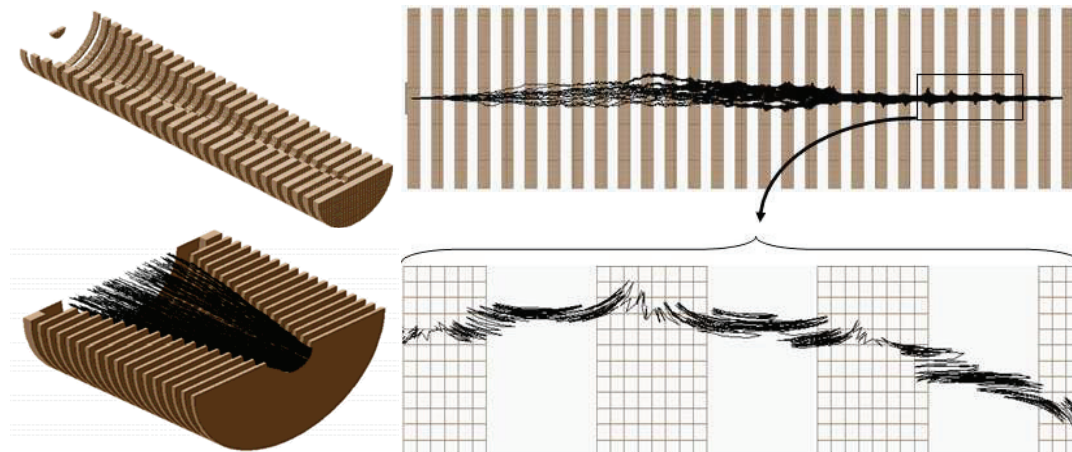


Figure III-6 : Trajectoires des ions dans les entonnoirs à ions

Sur cette figure on observe bien l'alternance des trajectoires oscillantes entre chaque électrodes, ceci est dû au fait que deux électrodes successives sont en opposition de phase. Le premier entonnoir à ions est composé de 28 électrodes de 1mm d'épaisseur séparées d'1mm par du PEEK. Les 21 premières électrodes ont un diamètre interne qui suit un profil parabolique descendant et les 7 dernières ont un diamètre interne de 4 mm. Les simulations ont été réalisées en mesurant la transmission des ions en fonction de l'amplitude de la tension RF pour différentes pressions. Les résultats des simulations sont présentés sur la figure III-7 et sont comparés aux valeurs expérimentales obtenues par Smith et al.<sup>2,10</sup>.

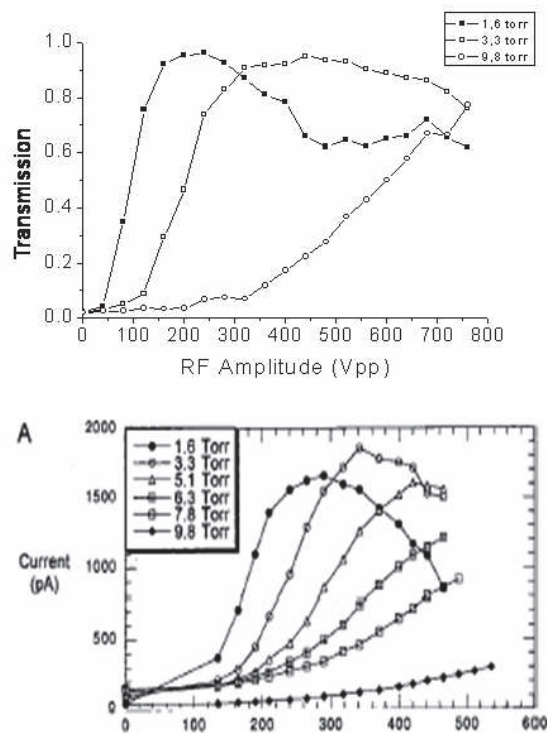


Figure III-7 : Comparaison des profils de transmission du funnel d'injection en fonction de l'amplitude RF et de la pression

On remarque que l'allure des courbes est la même. A faible pression on a un maximum de signal pour une RF de 100Vp-p et une diminution du taux de transmission au-delà. Alors qu'à haute pression le taux de transmission augmente avec l'amplitude RF. L'amplitude RF fait osciller les ions, lorsque la pression de gaz est faible il faut que ses oscillations soient faibles sinon les ions vont s'écraser contre les électrodes. Par contre à haute pression les collisions avec le gaz vont permettre d'amortir ces oscillations. Pour travailler à 12 Torr il faut donc des amplitudes RF de 600Vp-p. Par contre on remarque un certain décalage entre la simulation et l'expérience ceci est principalement dû à trois facteurs. (i) La charge d'espace n'est pas prise en compte dans la simulation, (ii) l'effet hydrodynamique n'est pas non plus pris en compte et (iii) les ions analysés dans l'expérience ne sont pas sélectionnés en masse, il se peut que certains soient solvatés.

L'entonnoir à ions de sortie du tube de mobilité ionique a été aussi simulé, on observe des résultats similaires au premier. Il est composé de 19 électrodes cylindriques concentriques plus une vingtième électrode de forme conique avec une ouverture de 1mm, afin d'obtenir un vide différentiel entre le tube de mobilité et le spectromètre de masse.

#### **4. Piège ionique cylindrique fonctionnant à haute pression :**

La grandeur mesurée en spectrométrie de mobilité ionique est le temps de diffusion des ions dans un gaz. Les ions proviennent d'une source electrospray, qui les produit en continu. L'injection de paquets d'ions dans le tube de mobilité est donc une étape clef de l'expérience. En effet, elle régit d'une part la sensibilité de la mesure par le nombre d'ions injectés à chaque pulse et d'autre part la résolution, qui dépend en partie de la durée de l'injection. Afin d'optimiser ces deux paramètres, nous avons choisi d'utiliser un piège cylindrique quadripolaire qui permet de stocker des ions et de les éjecter sur un temps très court. Le dimensionnement de pièges quadripolaires classiques est assez aisé, puisque les trajectoires des ions in vacuo sont régies par les équations de Mathieu qui permettent de déterminer les conditions de piégeage<sup>11</sup> : géométrie du piège, conditions de tensions DC et RF à appliquer en fonction du système étudié.

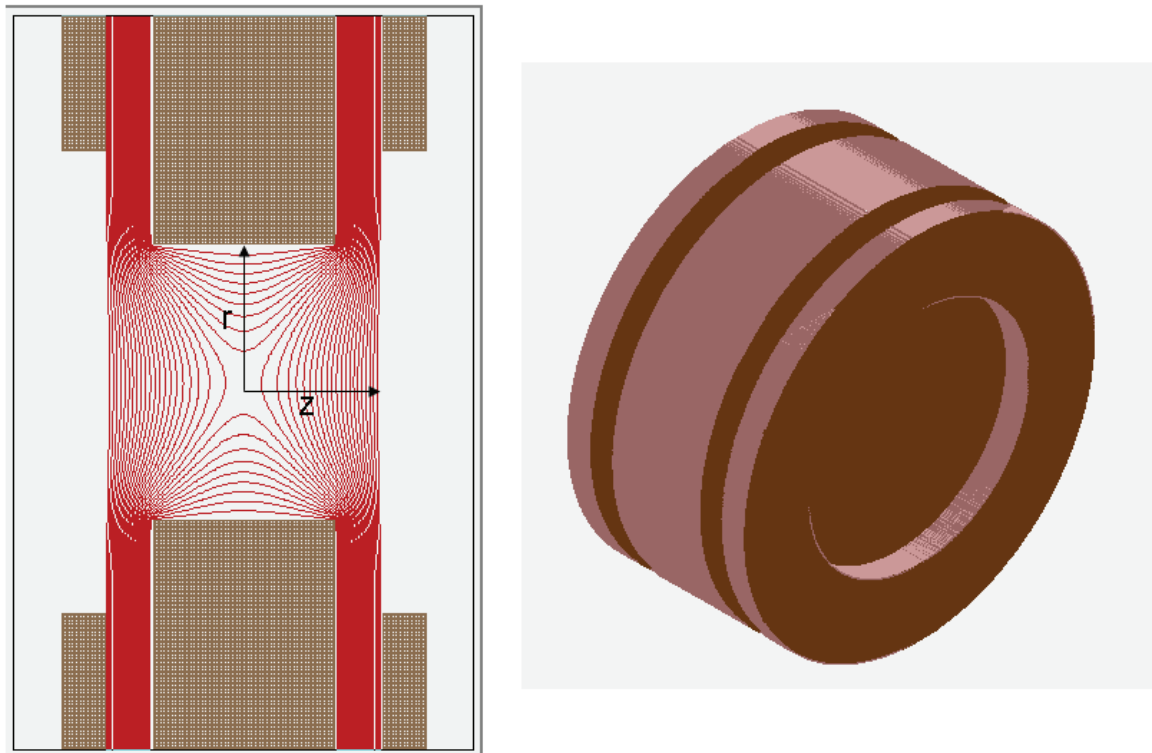
Pour notre expérience, le piégeage doit se faire à une pression d'environ 10 Torr. Or à cette pression les équations de Mathieu ne sont plus valables, un terme collisionnel doit être ajouté pour décrire correctement le système. Nous avons développé l'algorithme de simulation décrit préalablement.

L'objectif des simulations est de tracer les diagrammes de stabilité de ce type de piège en fonction de sa taille, de la pression et de la fréquence RF appliquées. Ceci dans le but de

connaître l'influence des différents paramètres et de dimensionner un piège pour notre expérience. Un diagramme a été réalisé pour le piégeage d'ions dans le vide et nous a permis d'observer l'effet du gaz. Pour obtenir un diagramme de stabilité on fait varier la tension  $U_{dc}$  et  $U_{rf}$  pour les différents paramètres à tester, et on considère qu'un ion est piégé s'il a une trajectoire stable durant 30 ms.

Les propriétés des pièges ioniques cylindriques sont les mêmes que celles des pièges ioniques quadripolaires<sup>12</sup>. Les pièges ioniques cylindriques de géométrie  $r=z$  ont des propriétés intéressantes de confinements des ions. De plus la densité d'ion dans un piège ionique cylindrique est supérieure à celles calculées pour les pièges ioniques quadripolaires. Nous avons choisi une géométrie cylindrique pour ce piège pour cette raison mais aussi par sa simplicité pour la conception mécanique. De plus, le fait d'avoir une surface plane est particulièrement adaptée pour le couplage avec un entonnoir à ions.

Ce piège ionique est composé de trois électrodes, une électrode cylindrique centrale de diamètre  $2r$  et de part et d'autres deux électrodes chapeaux circulaires percées distantes de  $2z$  sur lesquelles sont collées des grilles. La figure III-8 présente le piège en trois dimensions et une coupe du piège avec les lignes d'isopotential où l'on observe bien la dominance d'un potentiel quadripolaire.



**Figure III-8 : Piège ionique cylindrique. Vue avec les lignes d'isopotential (gauche), vue 3D (à droite). Les images proviennent du logiciel Simion.**

Pour un rapport  $m/z$  donné, les caractéristiques de piégeage d'un piège quadripolaire idéal (avec une géométrie hyperbolique pour les deux électrodes « chapeaux ») sont définies avec les paramètres de Mathieu radial et axial ( $a$ ,  $q$ ) :

$$a_z = -2a_r = -4 \frac{e}{m} \frac{V_{DC}}{(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad \text{eq. III-8}$$

$$q_z = -2q_r = -2 \frac{e}{m} \frac{V_{RF}}{(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad \text{eq. III-9}$$

Avec  $q$  la charge portée par l'ion,  $V_{DC}$  la tension continue appliquée,  $V_{RF}$  la tension alternative appliquée,  $m$  la masse de l'ion,  $r_0$  le rayon,  $z_0$  la demi longueur,  $\Omega=2\pi f$  (avec  $f$  la fréquence).

Pour un piège ionique cylindrique, avec une géométrie de type  $r=z=z_0$ , les paramètres pertinents sont  $\alpha$  et  $\chi$  qui sont reliés aux paramètres de Mathieu par les équations suivantes :

$$\alpha = 2a_z = -8 \frac{e}{m} \frac{V_{DC}}{z_0^2 \Omega^2} \quad \text{eq. III-10}$$

$$\chi = 2q_z = -4 \frac{e}{m} \frac{V_{RF}}{z_0^2 \Omega^2} \quad \text{eq. III-11}$$

La figure III-9 présente les résultats des simulations pour un piège ionique cylindrique de géométrie  $r=z=3\text{mm}$  et pour une pression nulle. L'ion choisi est la bradykinine dichargée. La fréquence de la tension radiofréquence de 5MHz. Les axes sont en coordonnées réduites ( $\alpha/2$  et  $\chi/2$ ) pour pouvoir comparer ce diagramme avec celui obtenu pour un piège ionique quadripolaire.

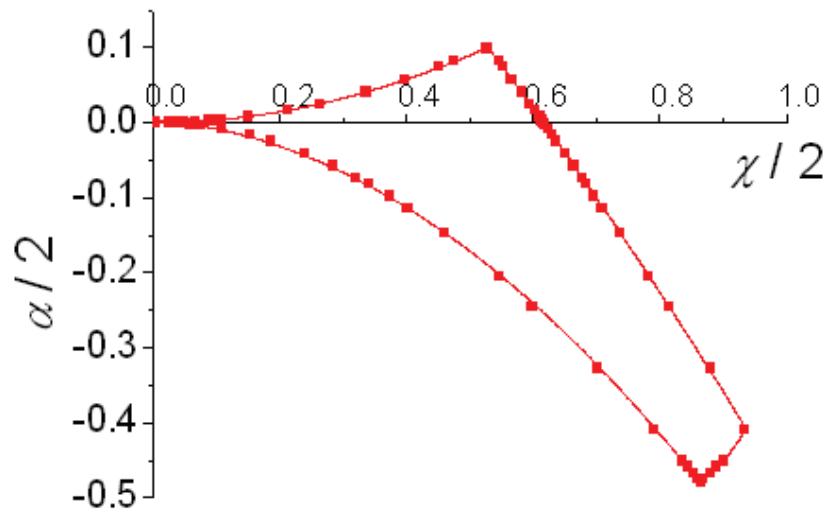


Figure III-9 : Diagramme de stabilité in vacuo

Le diagramme obtenu est similaire à celui obtenu pour un piège ionique quadripolaire mis à part le fait qu'il soit plus étendu <sup>13</sup>.

**-Effet de la pression :**

Dans ces simulations nous avons fait varier différents paramètres pour voir leurs influences sur le diagramme de stabilité résultant de ces modifications. Nous présenterons tout d'abord l'effet de la fréquence et de la pression sur les diagrammes de stabilités.

La pression est un paramètre clef puisque nous voulons expérimentalement travailler à haute pression (#10Torr). La figure III-10 présente les résultats des simulations pour un piège de taille  $r=z=3\text{mm}$  et des pressions de 5, 10 et 25Torr. Les simulations ont été faites avec la Bradykinine chargée deux fois et une fréquence de 5MHz.

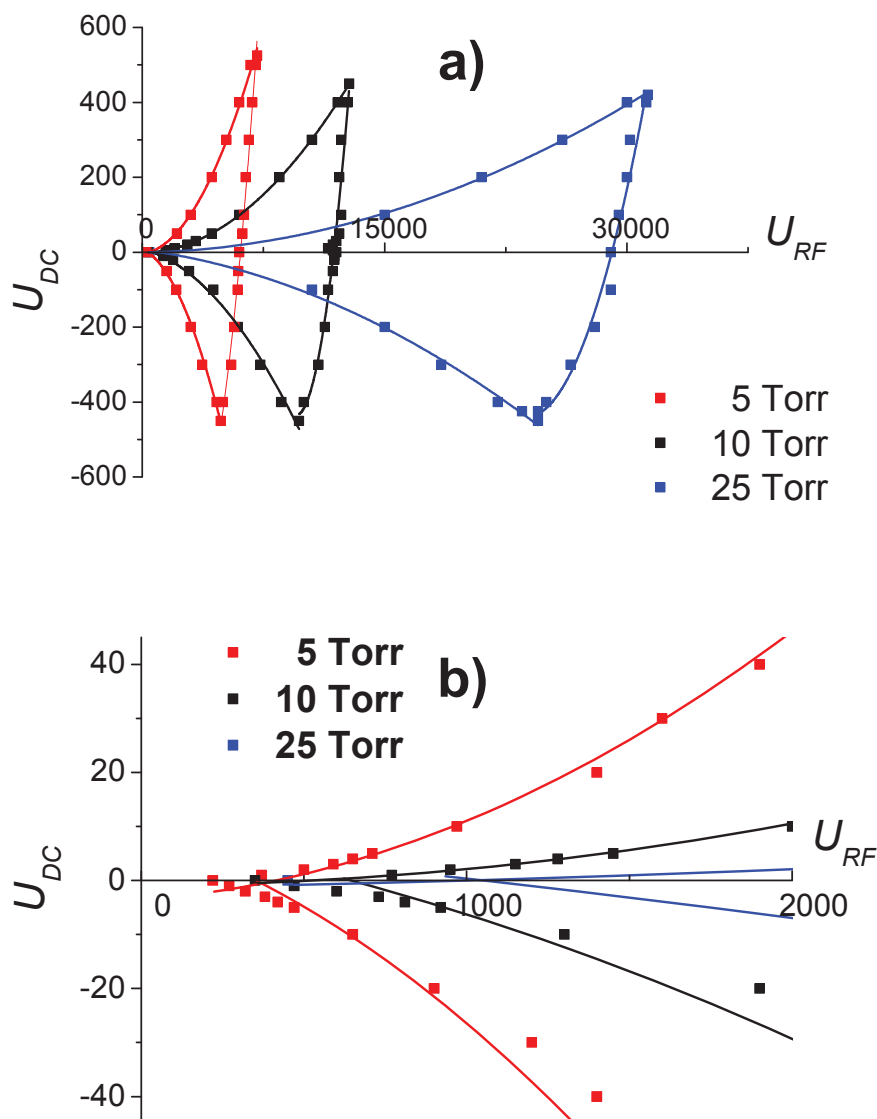
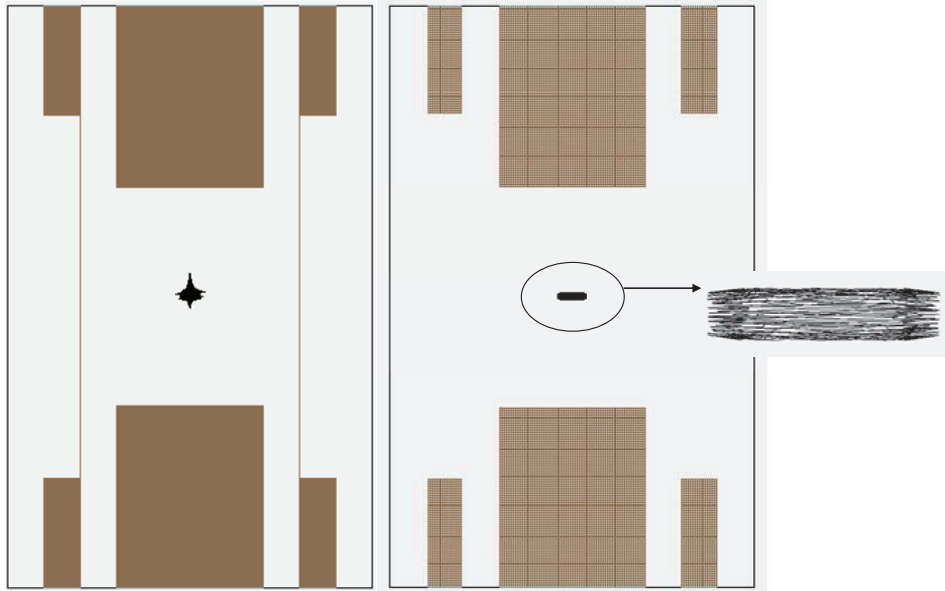


Figure III-10 : Diagramme de stabilité en fonction de la pression, a) pleine échelle, b) zoom sur les pointes du diagramme.

Les diagrammes obtenus à haute pression sont complètement différents de ceux obtenus dans le vide (Fig. III-11). Les trajectoires des ions sont très différentes comme on peut le constater sur la figure suivante, dans le vide les ions ont des trajectoires en formes de 8 alors qu'elles ont une forme de losange pour une pression élevée.



**Figure** Erreur ! Il n'y a pas de texte répondant à ce style dans ce document.-1 : **Trajectoire d'un ion dans le piège ionique cylindrique. A gauche pour une pression de 10 Torr et a droite dans le vide.**

Pour une pression de 5 Torr le diagramme est très réduit par rapport au vide, en particulier les trajectoires des ions sont stables pour des plages de valeurs de  $U_{DC}$  plus petites. Quand la pression augmente, la trajectoire des ions est stabilisée pour des plages de valeurs  $U_{RF}$  plus grandes. Par contre les plages  $U_{DC}$  ne sont pas modifiées. Ceci à pour conséquence que la pointe gauche du diagramme de stabilité devient de plus en plus fine lorsque la pression augmente. Par exemple, pour une tension  $U_{RF}=1000V$ , les ions ont une trajectoire stable à  $-22V < U_{DC} < 10V$  et  $-5V < U_{DC} < 2V$  à 5 et 10 Torr respectivement. Ceci montre qu'à haute pression il faut appliquer des tensions  $U_{RF}$  plus importantes pour pouvoir piéger. Une dernière observation peut être faite, le point  $(\alpha/2, \chi/2) = (U_{RF}, U_{DC}) = (0, 0)$  ne correspond à aucune trajectoires stables, la diffusion intrinsèque des ions conduit à une expansion continue de leurs trajectoires et les fait s'écraser sur les électrodes. En effet, pour une tension  $U_{DC}=0 V$ , un champ RF minimal doit être appliqué pour stabiliser la trajectoire des ions. Les premiers points stables  $(U_{RF}, U_{DC})$  sont  $(220, 0)$ ,  $(345, 0)$  et  $(450, 0)$  pour 5, 10 et 25 Torr respectivement. Le modèle utilisé est valide si le nombre de collisions reste important par rapport à la fréquence de la tension  $U_{RF}$ .

**-Effet de la RF et de la taille :**

Nous avons aussi fait une simulation en faisant varier la fréquence  $U_{RF}$  et la dimension du piège. La figure III-12 présente les diagrammes obtenus pour trois fréquences (1,5 et 10 MHz) pour un piège de  $r=z=3\text{mm}$  à une pression de 10 Torr. La figure III-13 présente les diagrammes obtenus pour trois tailles (1,3 et 6mm) à 5MHz et 10 Torr.

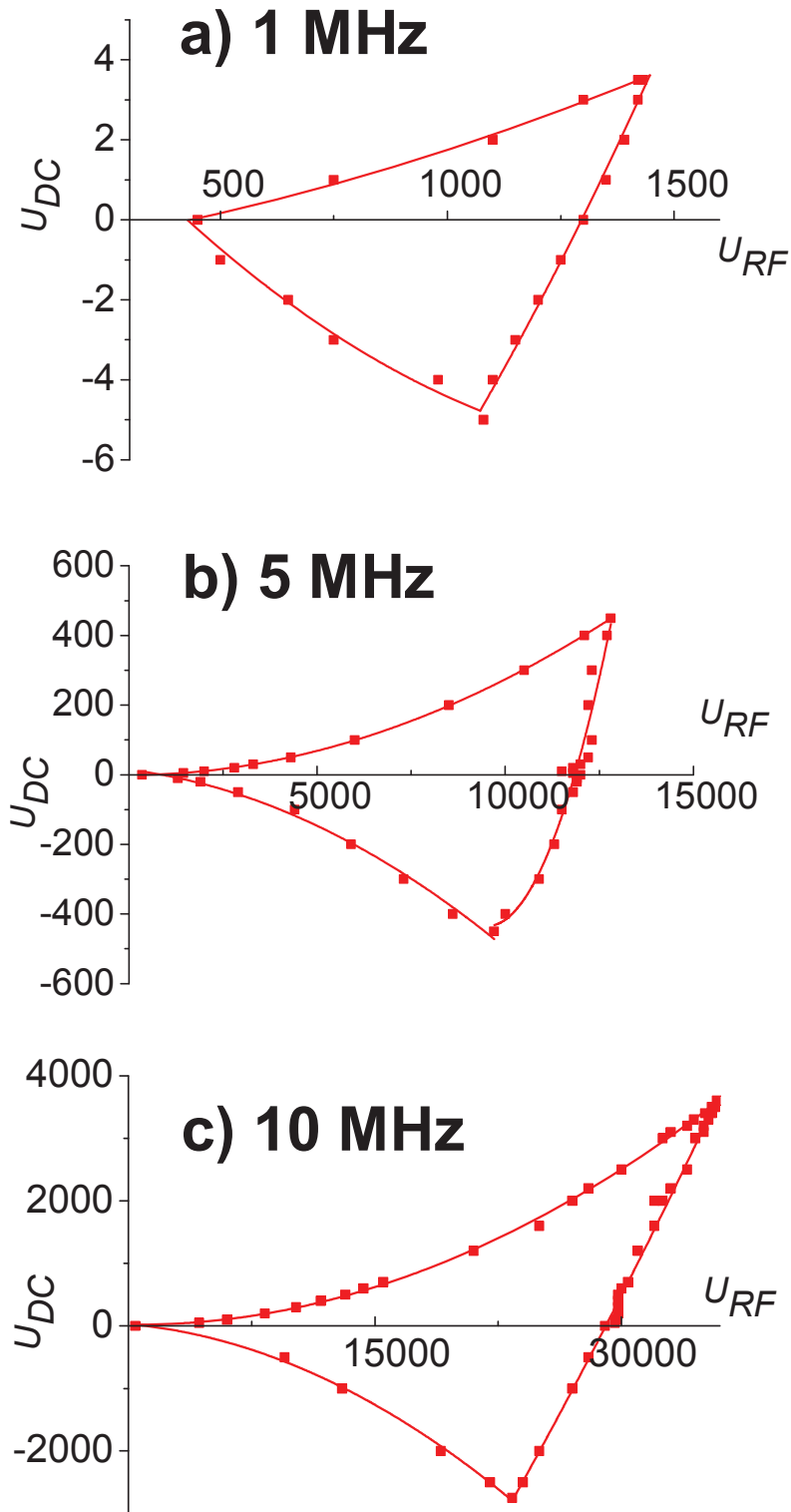


Figure III-12 : Diagramme de stabilité pour différentes fréquences

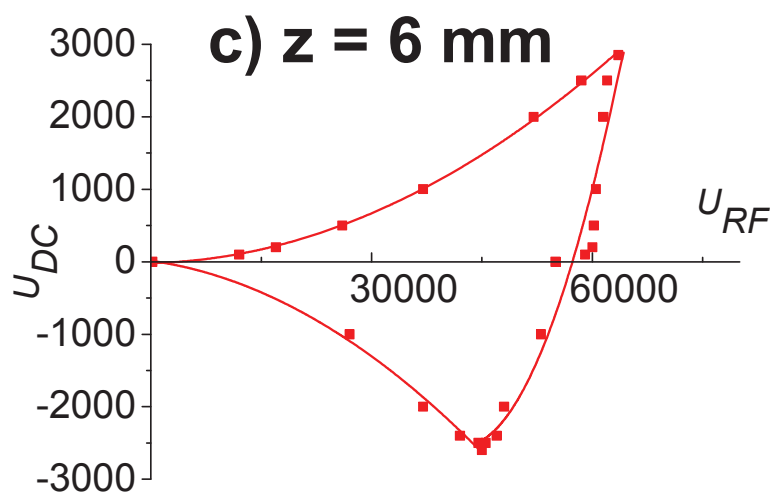
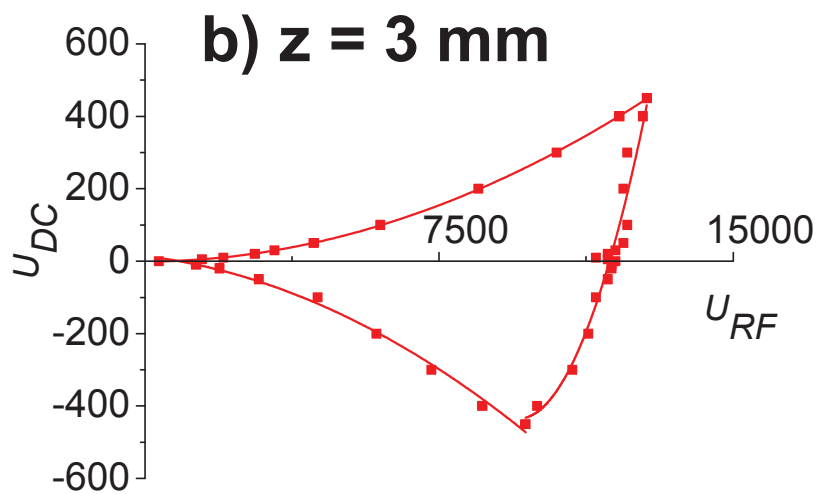
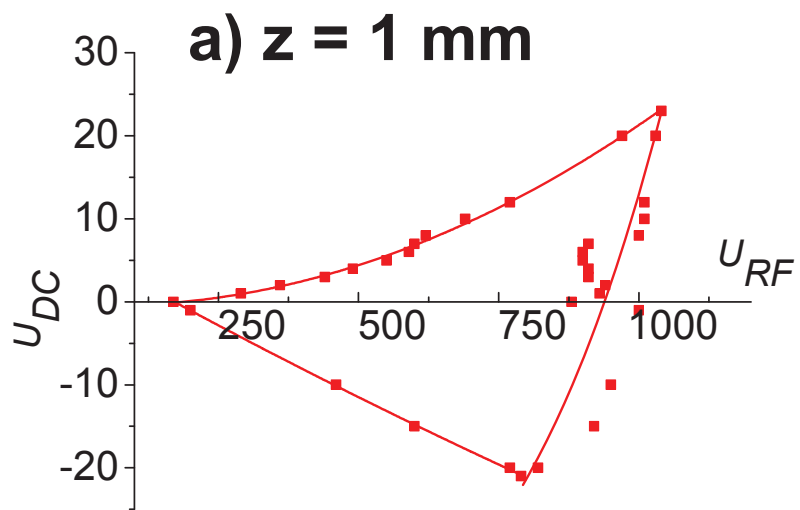


Figure III-13 : Diagramme de stabilité pour différentes taille de piège



L'évolution des diagrammes en fonction de la fréquence et de la taille est quasiment similaire. Quand la fréquence ou la taille du piège augmente, les trajectoires sont stabilisées pour une gamme plus grande de tension  $U_{RF}$  et  $U_{DC}$ . Pour une pression et une fréquence donnée, l'extension  $(\alpha, \chi)_z$  du diagramme de stabilité est définie de manière quadratique en fonction de la taille du piège :

$$(\alpha, \chi)_{z_1} = cste \left[ \frac{z_1}{z_0} \right]^2 (\alpha, \chi)_{z_0} \quad \text{eq. III-12}$$

#### **-Conclusion sur les simulations pour le piège à haute pression :**

Ces simulations ont été réalisées pour développer un piège cylindrique adaptable sur notre expérience MS+. Pour le piège ionique on ne peut pas réaliser les expériences pour les grandes valeurs de radiofréquence, mais ces simulations permettent d'avoir une vision sur l'évolution des diagrammes de stabilité en fonction des différents paramètres testés. De plus, pour ce dimensionnement, ce sont les pointes gauches des diagrammes qui ont été utilisées pour faire nos choix. Etant donné les résultats des simulations et les obligations expérimentales (pression 12 Torr), nous avons dû choisir une taille de piège pour lesquels la tension  $U_{RF}$  à appliquer et la fréquence qui soient possible expérimentalement. Ces contraintes nous ont poussés à choisir un piège de dimension  $r=z=3\text{mm}$  avec une fréquence de 4.8MHz et une tension  $U_{RF}=600V_{p-p}$ .

Pour démontrer les performances de ce piège nous avons fait des expériences sur différents systèmes, Bradykinine, MRFA et Cytochrome C. La figure III-14 présente les spectres de masse obtenus avec et sans RF appliquée sur l'électrode centrale du piège.

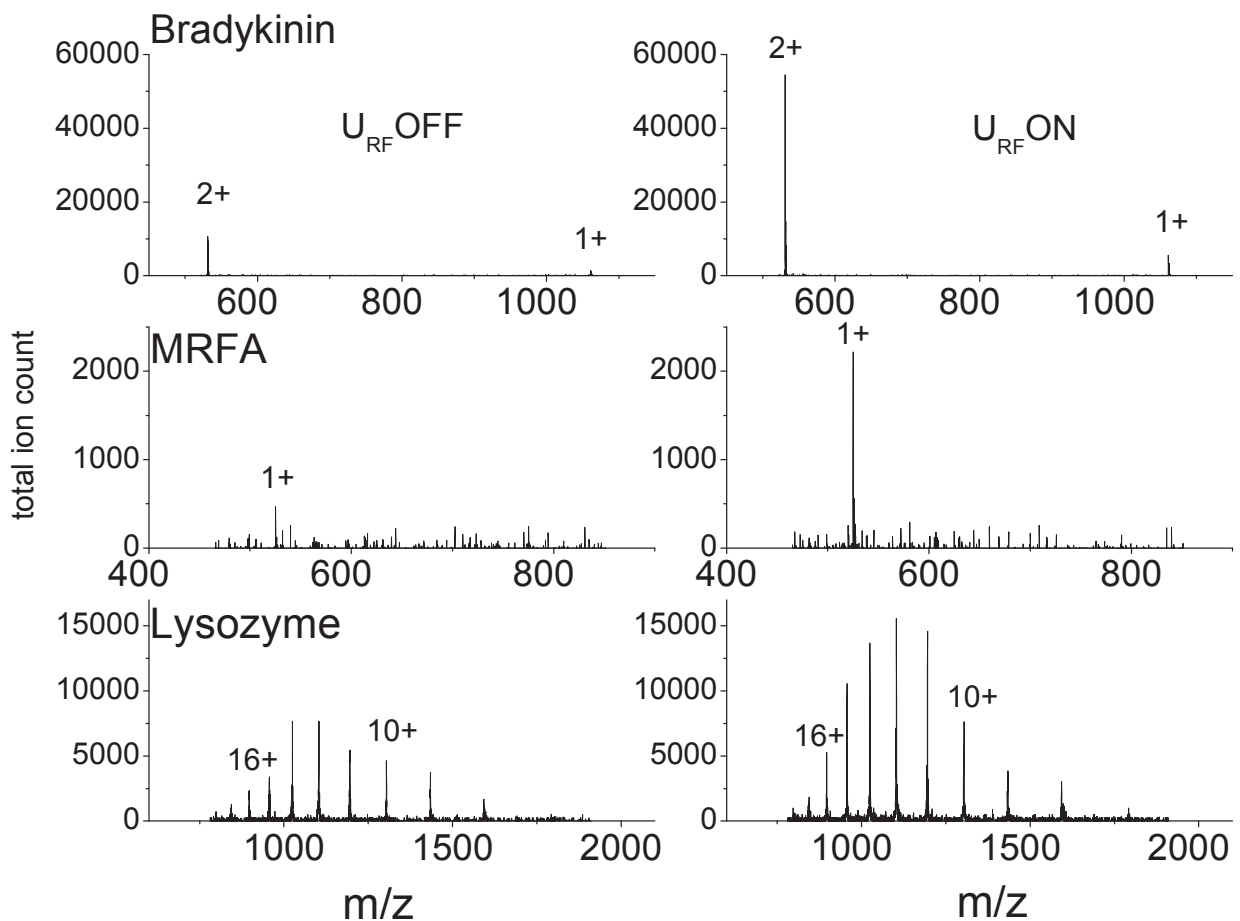


Figure III-14 : Efficacité du piège : Comparaison de spectres de masse avec et sans tension RF sur l'électrode cylindrique de la trappe

Ces résultats montrent le gain important de signal obtenu grâce à l'utilisation de ce piège. Ce gain de signal permet d'augmenter la sensibilité de l'expérience, et nous permet aussi de gagner en résolution. En effet la résolution dépend du temps d'éjection des ions dans le tube de mobilité ionique. Avec une plus grande sensibilité ce temps peut être diminué. On remarque que le gain de signal est le plus important pour la bradykinine dichargée (facteur 6). Pour le lysozyme, étant donné les états de charges élevés, on a une limitation de la charge d'espace, le piège est moins efficace (facteur 2-3).

Une quantité plus importante de signal aurait pu être gagnée, la principale limitation est due aux dimensions du piège, l'efficacité de piégeage est limitée par la charge d'espace (ceci est illustré par le piégeage du lysozyme). Pour avoir des systèmes de piégeages plus performant à pressions élevées en termes de charge d'espace, une des possibilités est l'utilisation de la technologie des funnels. Smith et al. ont développés un édifice électrostatique couplant un funnel et une zone de piégeage. Ce système a été présenté dans le premier chapitre. Les dimensions de la partie piège sont bien plus importantes que celles du piège ionique

cylindrique, ainsi on peut espérer accroître de manière significative la sensibilité de l'expérience.

## IV. Fonctionnement de l'expérience :

### 1. Principe :

Le but de l'expérience MS<sup>+</sup> est de mesurer des spectres de masse en fonction du temps de diffusion des ions. Pour ce faire il faut synchroniser l'injection des ions dans le tube de mobilité ionique avec le détecteur, en l'occurrence le spectromètre à temps de vol. Il existe un mode non pulsé où l'on acquiert seulement des spectres de masse, ce mode permet d'optimiser les réglages avant de lancer une acquisition.

Nous allons maintenant présenter le fonctionnement des pulses du piège. Les ions qui entrent dans le piège proviennent de l'entonnoir à ion qui se trouve en amont. Lors de l'injection des ions les tensions V2 et V3 sont au même potentiel ce qui permet de les piéger (Cf. Fig IV-1).

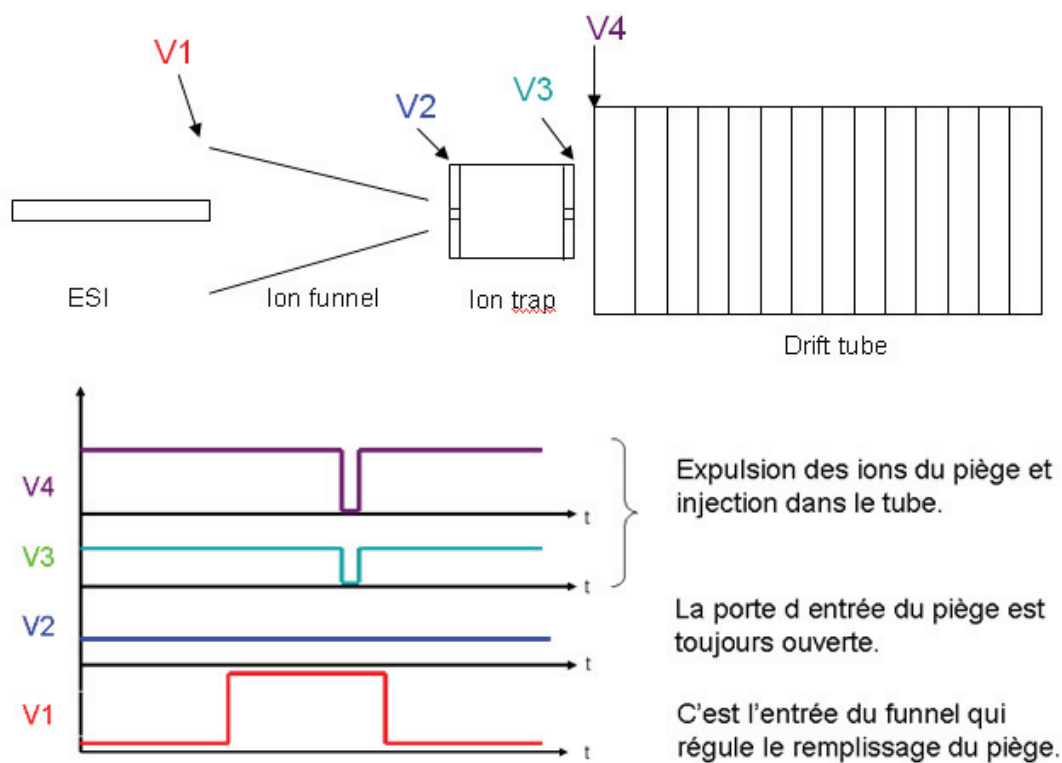
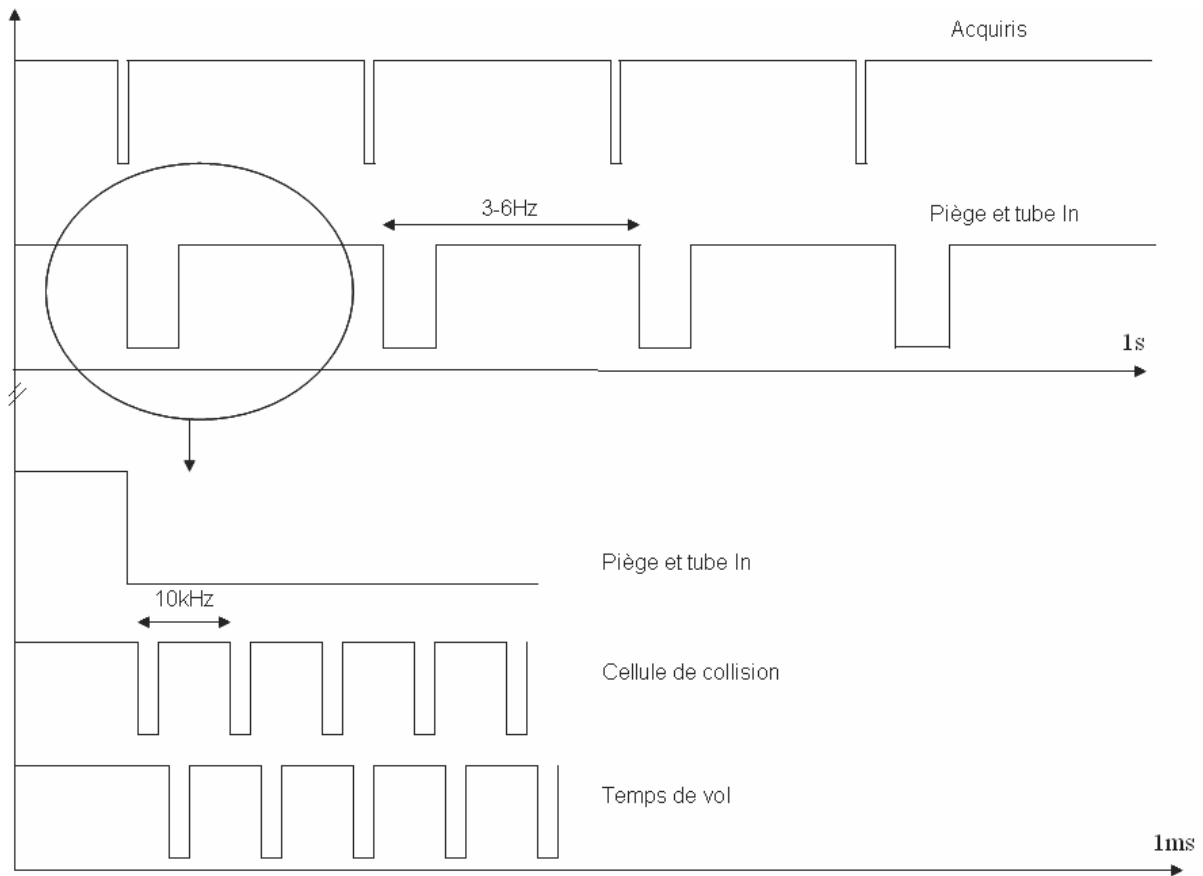


Figure IV-1 : Fonctionnement du piège ionique cylindrique

Au moment de l'expulsion des ions l'électrode 3 et 4 sont portées, pendant un temps compris entre 500 $\mu$ s et 1ms, à une tension inférieure de 10 V, ainsi on injecte les ions dans le tube de mobilité ionique. Pour pouvoir réguler l'injection des ions dans le piège ionique cylindrique une tension pulsée est appliquée à l'entrée de l'entonnoir à ions (V1). Ainsi on peut régler le temps de remplissage du piège ainsi que le délai entre la fin du remplissage du piège et

l'injection dans le tube. Le pulse d'injection est directement synchroniser à l'acquisition en masse, sa fréquence est de l'ordre de 1 à 5Hz. Le spectromètre à temps de vol fonctionne à 10kHz ce qui est très supérieur à la fréquence d'injection dans le tube de diffusion le diagramme suivant présente la synchronisation de toute l'expérience.



**Figure IV-2 : Diagramme de synchronisation de l'expérience.**

Ces différentes synchronisations permettent d'acquérir des spectres de masse en fonction du temps de diffusion. En effet chaque spectre de masse (10kHz) constitue un point dans le profil de diffusion. La carte acquiriss permet de sommer les spectres de masse en fonction du temps.

## 2. Interfaces de contrôle :

Pour piloter l'expérience MS+ on dispose de deux interfaces. La première, qui est l'interface commerciale du microQTOF Bruker, permet de contrôler et de piloter les paramètres de la source electrospray, des deux entonnoirs à ions, de l'hexapôle, du quadripôle, de la cellule de collisions, des différentes lentilles einzel ainsi que du TOF.

La seconde, qui a été développée au laboratoire, permet de contrôler et de piloter la partie tube de mobilité.

Le pilotage des différents paramètres de l'expérience :

-Tensions à appliquer sur l'entonnoir à ions d'entrée, sur le piège ionique cylindrique, sur le tube de mobilité ainsi que sur l'entonnoir à ions de sortie.

-Flux d'hélium à injecter dans le tube.

-Ouverture des vannes de pompages.

Le contrôle des différents paramètres de l'expérience :

-Tensions appliquées.

-Pression.

-Débit d'hélium.

Nous disposons aussi d'une interface d'acquisition qui permet de régler les différentes synchronisations présentées précédemment. Cette interface permet de piloter la carte de contrôle acquiriss qui somme les spectres de masses en fonction du temps. Nous pouvons choisir la gamme de masse sur laquelle nous souhaitons travailler ainsi que le nombre de points que nous désirons dans le spectre de mobilité.

Une représentation des différents paramètres de contrôle et d'acquisition est présentée sur la figure IV-3.

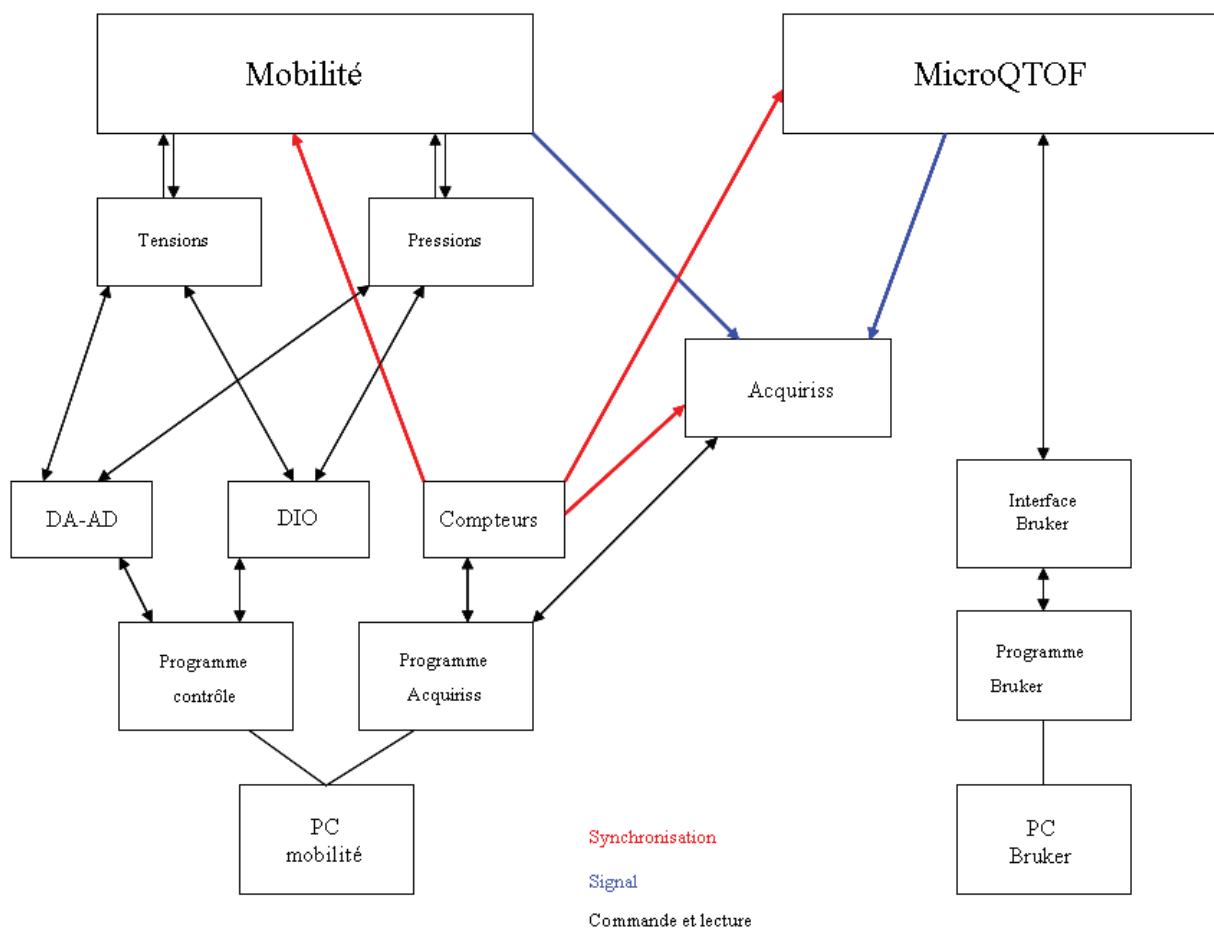


Figure IV-3 : Schéma de fonctionnement du contrôle et des acquisitions sur l'expérience MS+.

### 3. Traitement des résultats :

Lors d'une acquisition on enregistre des spectres de masse en fonction du temps. Ces différents spectres enregistrés permettent l'obtention du temps de diffusion (numéro du spectre de masse \*1/fréquence du TOF). Ainsi on obtient une matrice qui peut se représenter en une carte en deux dimensions avec le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) en ordonnées et le profil des temps d'arrivée en abscisses comme montrée sur la figure IV-4.

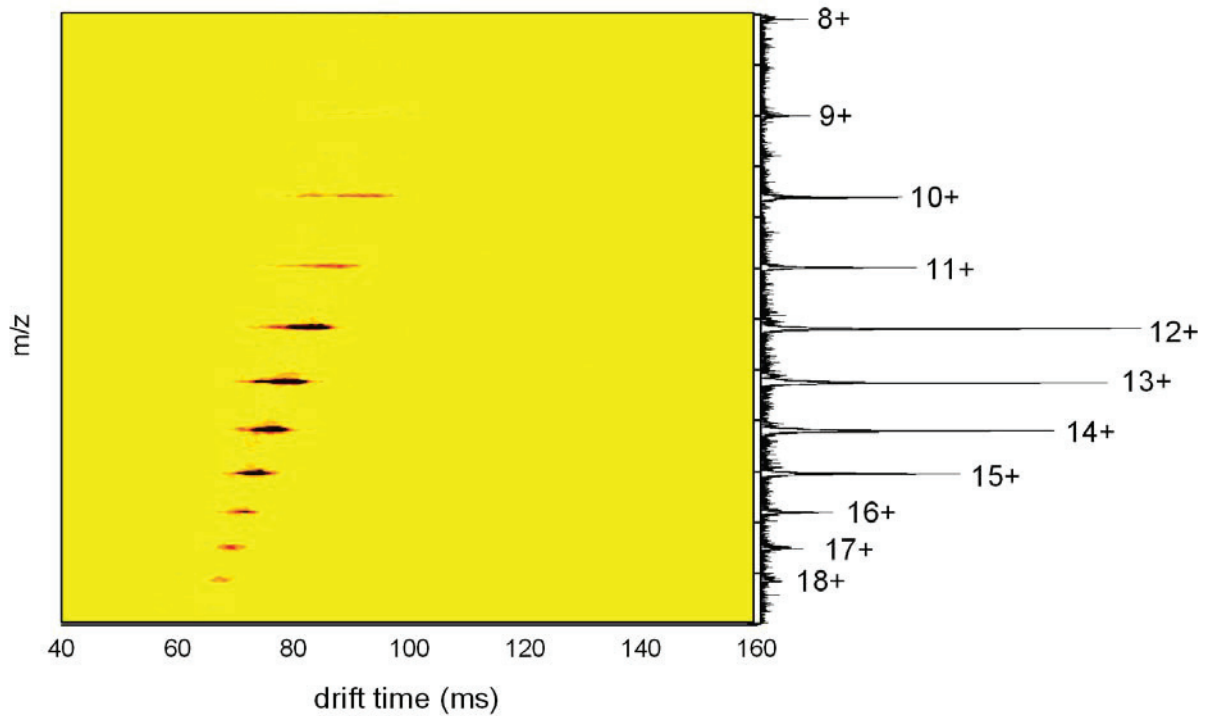
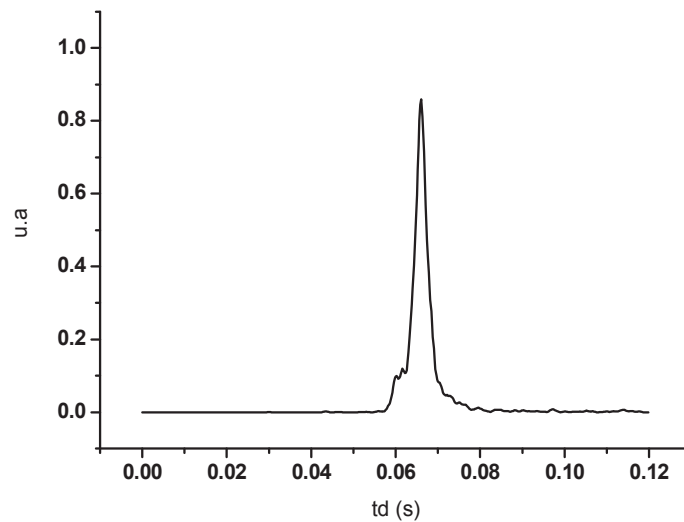


Figure IV-4 : Carte 2D IM-MS : exemple du lysozyme

Si on projette les spots obtenus sur la carte selon l'axe des ordonnées on obtient le spectre de masse et si on fait cette opération sur l'axe des abscisses on obtient le profil d'arrivée de tous les ions. Pour avoir le temps d'arrivée d'un ion particulier on projette seulement sur le pic de rapport  $m/z$  donné.

Par exemple si on projette l'ion 15+ on obtient son profil en temps de diffusion Cf. fig. IV-5.



**Figure IV-5 : Profil de diffusion pour l'ion lysozyme 15+**

Ce temps ne permet pas de remonter directement à la section efficace de collision. En effet ce temps correspond au temps de dérive dans le tube plus le temps passé dans le funnel de sortie et dans le spectromètre de masse. Pour s'affranchir de ces temps morts nous devons procéder à une calibration. Nous faisons plusieurs expériences en changeant le champ électrique. Nous traçons ensuite les temps d'arrivées en fonction de l'inverse de la tension appliquée. Selon l'équation IV-2 la pente de la droite est proportionnelle à la mobilité réduite et l'ordonnée à l'origine donne le temps mort ( $t_0$ ).

$$t_{\text{exp}} = t_0 + t_D \quad \text{eq. IV-1}$$

$$t_D = \frac{L}{v_D} = \frac{L}{KE} = \frac{L^2 T_0}{K_0 P_0 T V} \quad \text{eq. IV-2}$$

Avec P la pression de gaz tampon et V la différence de potentiel appliqué sur le tube. Cette mobilité réduite déterminée grâce à l'équation IV-3, permet de remonter à la section efficace de collision de l'ion avec le gaz tampon.

$$K_0 = \frac{3e}{16N_0} \left( \frac{2\pi}{\mu kT} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega} \quad \text{eq. IV-3}$$

$$K_0 = K \frac{P}{P_0} \cdot \frac{T_0}{T} \quad \text{eq. IV-4}$$

Avec  $N_0$  la densité de gaz dans les conditions standards.

Nous allons présenter une calibration effectuée sur la bradykinine, le même système qui a été utilisé pour effectuer les simulations. Ce peptide de masse 1060uma s'ionise majoritairement

deux fois. On observe donc sur le spectre de masse un pic majoritaire à 530 m/z (Cf. Fig. III-14).

En faisant varier la tension, typiquement de 420 à 820V par pas de 50V on obtient une droite d'étalonnage qui permet d'extraire la mobilité réduite à partir de la pente de la droite. Cette dernière valeur permet d'obtenir la section efficace de collision. Dans notre cas on trouve une section efficace de  $246 \text{ \AA}^2$ . Le temps mort est de 4.1ms ce qui représente 10% du temps de résidence dans le tube pour une tension de 7.7V/cm (tension utilisée en fonctionnement normal).

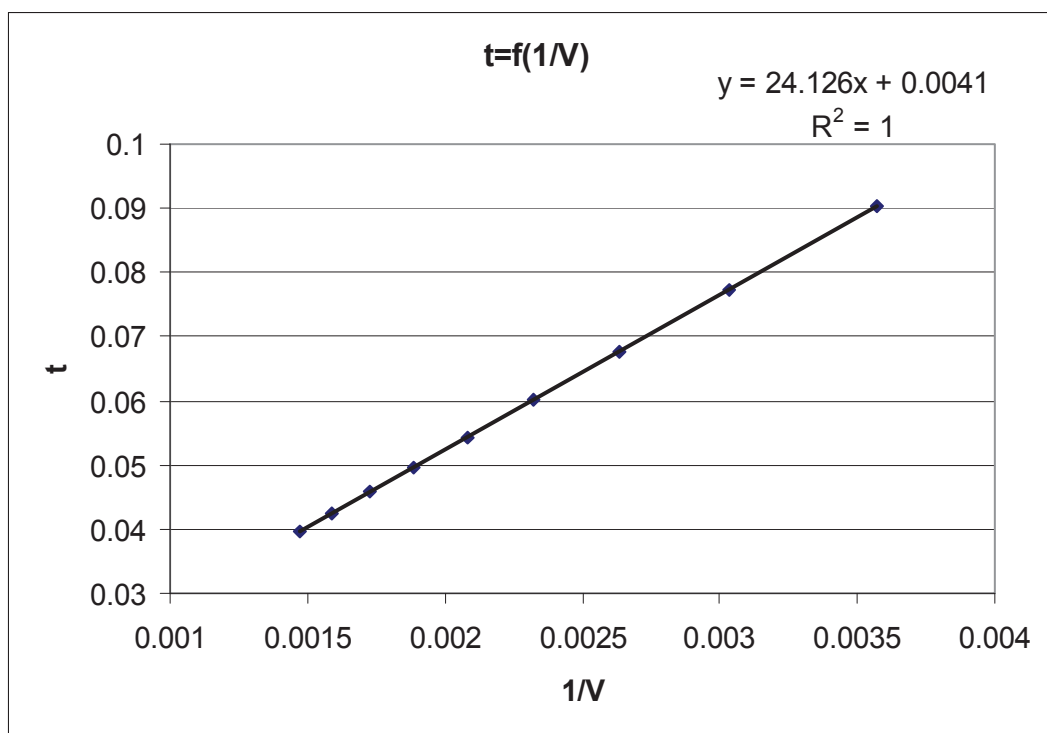


Figure IV-6 : Droite de calibration pour la bradykinine deux fois chargées.

Dès lors où nous disposons d'une section efficace de collision nous devons comparer cette valeur à des calculs théoriques (comme expliqué dans le premier chapitre). En effet pour pouvoir proposer une structure, nous devons tout d'abord faire des calculs de dynamique moléculaire couplés à un champ de force, et rechercher des structures stables du système. Puis nous devons déterminer la section efficace de collision de cette structure stable, ainsi en comparant les résultats expérimentaux et théoriques on peut proposer une ou plusieurs structures correspondant à la structure du système observé expérimentalement. Cette partie calcul et détermination de structure a été présentée dans le premier chapitre et sera complétée dans le chapitre suivant.



#### 4. Optimisation des paramètres :

La notion de résolution en mobilité ionique est importante, puisqu'elle va déterminer les plus petites différences que l'on pourra observer. Cette valeur est définie comme la largeur à mi hauteur d'un pic divisé par son temps de drift. Il existe une limitation à cette valeur intrinsèque à l'expérience. Cette limitation est donnée par la loi de Fick, en effet le régime de mobilité ionique est un régime de diffusion, ceci a été montré dans le premier chapitre.

Un autre paramètre intervient sur cette résolution, c'est le temps d'injection des ions dans le tube à chaque pulse. En effet si on envoie les ions pendant des temps très long (supérieurs à 5ms) le profil de mobilité obtenu sera large et de forme carrée. Par contre si on diminue ce temps d'injection le profil va s'affiner et tendre vers une gaussienne correspondant à la limite intrinsèque de résolution. La figure suivante présente des résolutions mesurées ( $t/\Delta t$ ) pour la bradykinine en fonction du temps d'injection des ions.

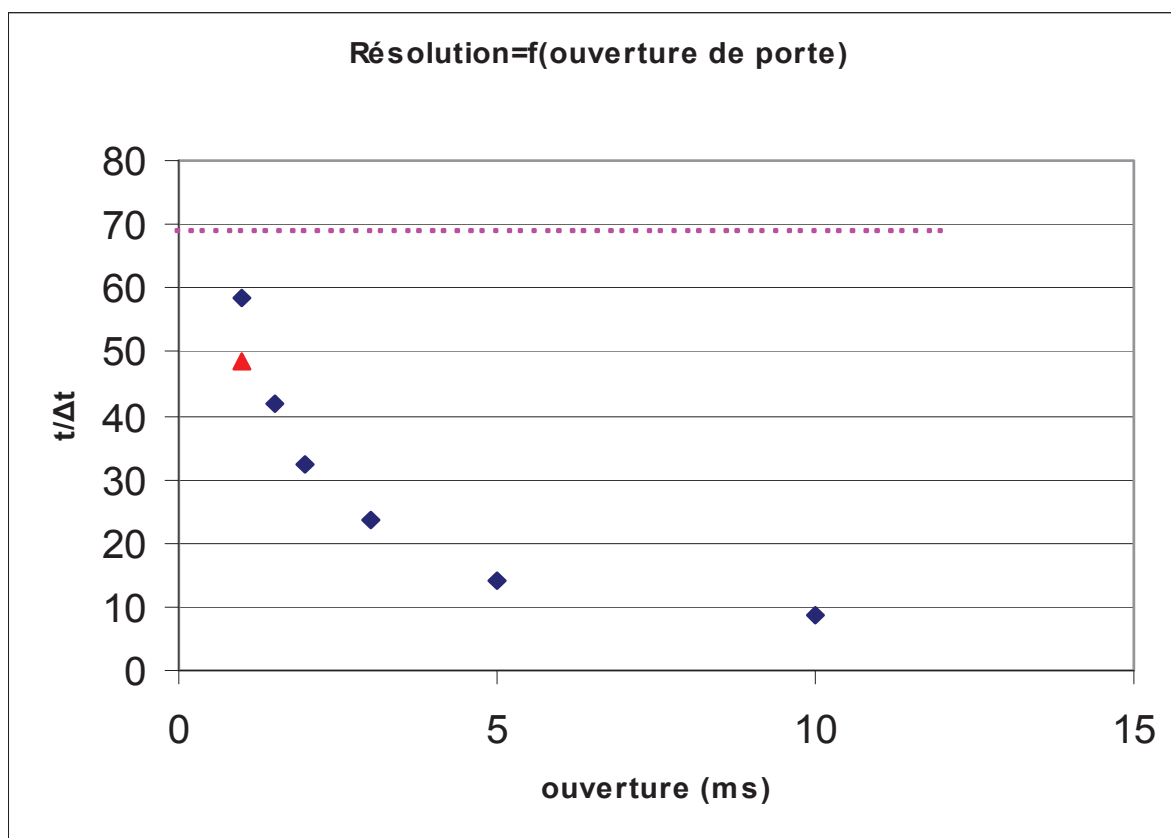


Figure IV-7 : Résolution en fonction du temps d'injection des ions pour la bradykinine deux fois chargées.

De manière générale une ouverture de porte de 1ms est bien adaptée puisqu'elle permet d'avoir une bonne résolution (58) tout en gardant une sensibilité raisonnable. Pour une étude sur un système où l'on dispose de moins d'échantillon on peut augmenter cette ouverture de porte pour gagner en sensibilité sachant que la résolution sera diminuée. Un point clef pour réaliser des mesures temporelles en couplant la mobilité ionique avec un spectromètre de

masse est de ne pas piéger les ions dans les optiques ioniques entre la sortie du tube et le spectromètre de masse, auquel cas on perd la temporalité de diffusion des ions. Ceci nous a posé des problèmes, puisque le spectromètre de masse Bruker est optimisé pour avoir une bonne sensibilité. Dans le mode de fonctionnement normal des paquets d'ions sont piégés dans la cellule de collision avant leur injection dans le temps de vol. Pour éviter ce piégeage nous avons dû optimiser les réglages de ces optiques, en utilisant une rampe de potentiel décroissante sur les différentes optiques.

## **V. Conclusion :**

Dans cette partie nous avons présenté l'expérience MS+. Nous nous sommes attachés à présenter les différentes parties de cette expérience. Une pièce clef de ce couplage est le piège ionique cylindrique qui doit fonctionner à pression élevée ( $>5$ Torr). Un travail important de simulation à pression élevée a été effectué. Un modèle de diffusion dans des champs électriques DC et RF a été développé (intégré à Simion). Ceci nous a permis de dimensionner les différentes optiques, piège ionique à haute pression et entonnoirs à ions qui permettent de réaliser des expériences avec une bonne sensibilité et une bonne résolution. Nous avons aussi explicité les interfaces de pilotage, de contrôle et d'acquisition de l'expérience. Enfin nous avons présenté les mesures obtenues, les caractéristiques de l'expérience ainsi que le traitement des résultats. Dans la suite du manuscrit nous allons présenter des études que nous avons pu mener avec cette expérience.

1 B. Daltonics, "MicroQTOF Technical notes,"  
2 S. A. Shaffer, D. C. Prior, G. A. Anderson, H. R. Udseth, and R. D. Smith, *Analytical  
Chemistry* **70**, 4111-4119 (1998).  
3 D. Gerlich, *Advances in Chemical Physics* **82**, 1-176 (1992).  
4 R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, and H. R. Udseth, *Analytical  
Chemistry* **62**, 882-899 (1990).  
5 A. E. Cameron and D. F. Eggers, *Review of Scientific Instruments* **19**, 605-607  
(1948).  
6 W. C. Wiley and I. H. McLaren, *Review of Scientific Instruments* **26**, 1150-1157  
(1955).  
7 V. I. Karataev, D. V. Shmikk, and B. A. Mamyrin, *Soviet Physics Technical Physics-  
Ussr* **16**, 1177-& (1972).  
8 D. A. Dahl, ( Idaho National Engineering and Environmental Laboratory, Idaho Falls,  
2000).  
9 R. R. Julian, S. R. Mabbett, and M. F. Jarrold, *Journal of the American Society for  
Mass Spectrometry* **16**, 1708-1712 (2005).  
10 S. A. Shaffer, K. Q. Tang, G. A. Anderson, D. C. Prior, H. R. Udseth, and R. D.  
Smith, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**, 1813-1817 (1997).  
11 S. H. Paul W., *Zeitschrift für Naturforschung A* **8**, 448-450 (1953).  
12 M. N. B. a. C. Audoin, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **11**, 421 (1973).  
13 R. J. H. R. E. March, *Quadrupole storage mass spectrometry* (Wiley interscience,  
New York, 1989).

# Chapitre 3 :

## Etude de l'influence du résidu central sur une série de polyalanines et de polyglycines

I.	Introduction :	74
II.	Méthodes utilisées :	75
1.	Synthèse des peptides :	75
2.	Analyse par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse :	76
3.	Simulations numériques :	76
III.	Résultats :	78
1.	Polyalanines :	78
2.	Polyglycines :	84
IV.	Discussion :	88
V.	Conclusion :	91

## I. Introduction :

La compréhension de la relation entre la séquence peptidique et la structure est très importante pour le diagnostic de certaines maladies liées aux conformations de peptides ou de protéines (Alzheimer<sup>1</sup>, Creutzfeldt-Jakob<sup>2</sup>). Les paramètres qui stabilisent les structures secondaires sont liés aux propriétés des acides aminés composant la chaîne peptidique ainsi qu'aux paramètres extérieurs<sup>3</sup> (solvant, force ionique, etc...). Dans notre étude nous nous limiterons aux paramètres intrinsèques du peptide puisque les mesures de mobilité ionique se font en phase gazeuse<sup>4,5</sup>. Les polyalanines ont la propriété de former des hélices en solution<sup>6,7</sup> et en phase gazeuse. Une étude de M.J. Jarrold et al.<sup>8,9</sup> a démontré l'importance de la solvataion de la charge pour la stabilisation d'hélice en phase gazeuse (i) en N-terminal la charge déstabilise l'hélice (ii) en C-terminal des hélices sont observées dans ce cas la charge est stabilisée par le dipôle induit par l'hélice (iii) si la charge est placée sur la chaîne latérale d'un acide aminé basique en C-terminal, des dimères stables d'hélices sont observés. Dans ce dernier cas la stabilisation est due à des structures « tête à queue » de deux hélices. Cette étude a mis en avant l'influence de la charge sur les structures observées en phase gazeuse. Une étude en phase gazeuse de peptides basée sur des polyalanines non chargées a été réalisée par Dugourd et al.<sup>10</sup>. Les structures observées ont permis de montrer que les structures étaient basées sur des feuillets bêta. Ceci montre encore l'importance des charges en phase gazeuse. Enfin des études sur des polyalanines chargées plusieurs fois<sup>11</sup> et de tailles plus importantes ont pu montrer encore une fois l'importance de la localisation de la charge sur la stabilisation des structures secondaires en phase gazeuse. Dans cette étude nous allons étudier deux séries de peptides composés de 11 acides aminés, ils ont une taille suffisante pour adopter une structure secondaire, et pas trop élevée pour que les calculs soient réalisables. Les systèmes choisis pour cette étude sont des systèmes modèles. La première série est composée de polyalanines de type RA<sub>4</sub>XA<sub>4</sub>K, l'arginine et la lysine, qui sont des résidus basiques, permettent de contrôler la localisation des charges en N-terminale et en C-terminale. La deuxième série est composée de polyglycines analogues aux polyalanines (RG<sub>4</sub>XG<sub>4</sub>K), elles sont peu structurées par rapport aux polyalanines. Le changement de l'acide aminé central va permettre d'étudier son influence sur la structure globale des peptides.

Dans cette étude nous allons utiliser la mobilité ionique pour déterminer les sections efficaces de diffusion<sup>2</sup> des peptides et nous utiliserons la dynamique moléculaire couplée à la méthode d'échange de réplique (REMD) pour assigner des structures.

## II. Méthodes utilisées :

### 1. Synthèse des peptides :

La synthèse des peptides a été réalisée en utilisant la méthode FMOC (Fluorenylméthoxycarbonyl) en phase solide. Le principe est représenté sur la figure II-1.

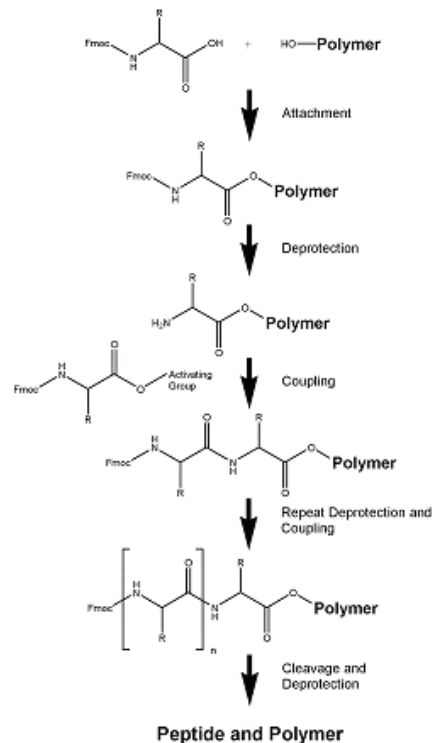


Figure II-1 : Mécanisme de la synthèse peptidiques par la méthode FMOC

La synthèse se fait à partir de l'acide aminé se trouvant en position C-terminale en ajoutant les acides aminés un par un. Celui-ci est lié par sa fonction carboxylique à un site acide d'une résine. Sa fonction amine est clivée par un groupement protecteur FMOC pour éviter la polymérisation du premier acide aminé. Les fonctions réactives de la chaîne latérale de l'acide aminé sont elles aussi protégées. On déprotège la fonction amine en utilisant une base (souvent de la pipéridine) pour pouvoir additionner l'acide aminé suivant. Ce dernier est clivé par un groupement FMOC au niveau de sa fonction amine et sa fonction carbonyle est activée par un groupement réactif pour favoriser la jonction. On réitère ce processus jusqu'à l'obtention du peptide désiré. Pour décrocher le peptide du polymère il suffit d'utiliser un

acide (TFA par exemple) après avoir déprotégé la fonction amine de l'acide aminé en N-terminale. Cette synthèse a été réalisée sur un synthétiseur de peptides Applied Biosystems 433A à l'Ecole polytechnique fédérale de Lausanne au sein de l'équipe LSMB animée par Y. Tsybin. Une purification par chromatographie liquide préparative a également été nécessaire. Les peptides sont conditionnés dans des solutions aqueuses de concentration 1mM.

## **2. Analyse par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse :**

Les peptides sont analysés par IMMS, l'expérience a été présentée dans la partie précédente. Les solutions utilisées sont diluées dans un mélange 50/50 eau/méthanol à une concentration de 100 $\mu$ M, on ajoute 0.1% d'acide acétique. Pour chaque peptide on réalise des mesures de mobilité ionique à différents champs électriques pour pouvoir déterminer leurs sections efficaces de diffusion (Cf. chapitre précédent calibration). Le temps d'injection des ions est de 1ms, les spectres présentés ont été obtenus à une valeur de champ électrique de 7.7V/cm.

## **3. Simulations numériques :**

Le paysage conformationnel de tous les peptides étudiés expérimentalement a été exploré par dynamique moléculaire couplée à la réplique d'échange (REMD), cette méthode a été présentée brièvement dans le chapitre 1 et est développée dans l'appendice A. Le protocole de la simulation est schématisé sur la figure II-2. Ces calculs ont été réalisés par F. Calvo (LASIM).

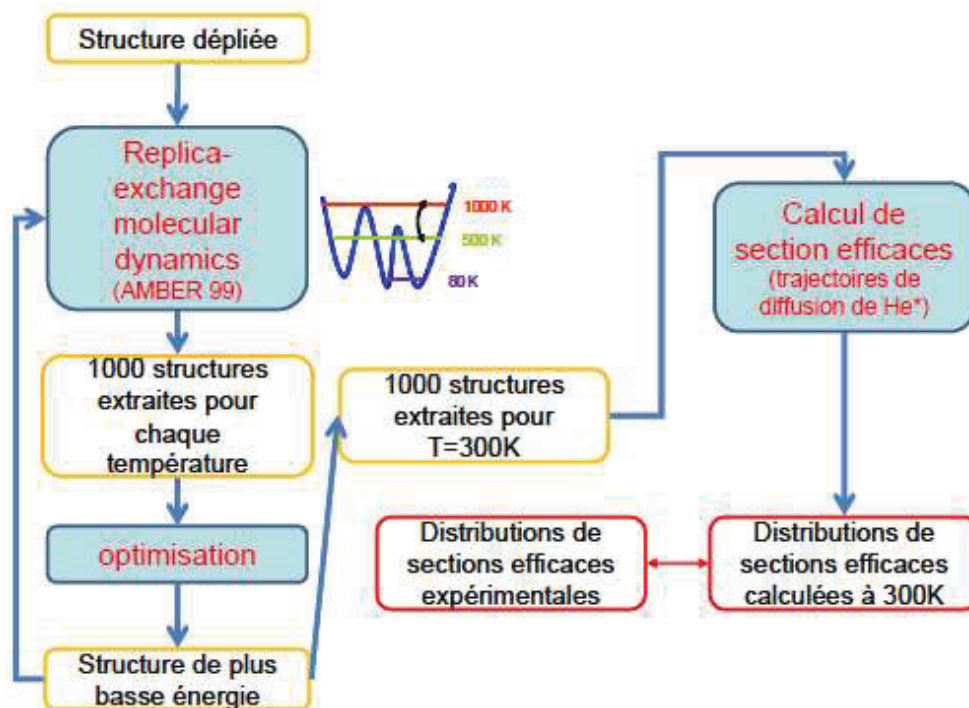


Figure II-2 : Diagramme du protocole de calcul

La structure peptidique de départ est complètement dépliée. Une première simulation d'échange de réplique couplée à de la dynamique moléculaire (REMD) est réalisée, en utilisant le champ de force AMBER99<sup>12</sup>. Quarante répliques sont utilisées (80-1000K réparties par progression géométrique) et mille structures sont extraites périodiquement pour chaque réplique. La structure de plus basse énergie est extraite en optimisant l'ensemble des structures extraites par la méthode d'annealing. On réitère ce processus jusqu'à l'obtention de la structure la moins énergétique. Cette dernière est utilisée comme structure de départ pour une simulation REMD où les répliques sont resserrées autour de 300K, on extrait 1000 structures à cette température. Les sections efficace de ces mille structures optimisées sont déterminées en utilisant la méthode des trajectoires de diffusion dans l'hélium<sup>13</sup>. On obtient ainsi une distribution de section efficace de diffusion.

Les charges (protons) ont été placées sur l'arginine (N-terminale) et sur la lysine (C-terminale), les seules ambiguïtés ont été lorsque l'acide aminé central comportait un résidu basique (X=Arg, His et Lys). Pour ces trois cas, plusieurs simulations ont été réalisées en faisant varier la position de la charge. L'arginine qui se trouve en N-terminale est toujours chargée, ce qui laisse deux sites de protonation possible (soit sur la lysine en C-terminale soit sur le résidu basique central). Pour le peptide où le résidu basique est l'histidine un autres cas



a été simulé, il s'agit de l'histidine centrale neutre pour laquelle il existe deux formes tautomériques.

### III. Résultats :

#### 1. Polyalanines :

Les analyses par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse permettent d'obtenir des cartes 2D avec en ordonnée le spectre de masse et en abscisse le profil en temps d'arrivée. Pour toute la série des peptides basés sur les polyalanines le pic de masse majoritaire est le 2+, dans certains cas on observe le 3+ lorsque l'acide aminé central est basique comme représenté sur la figure suivante.

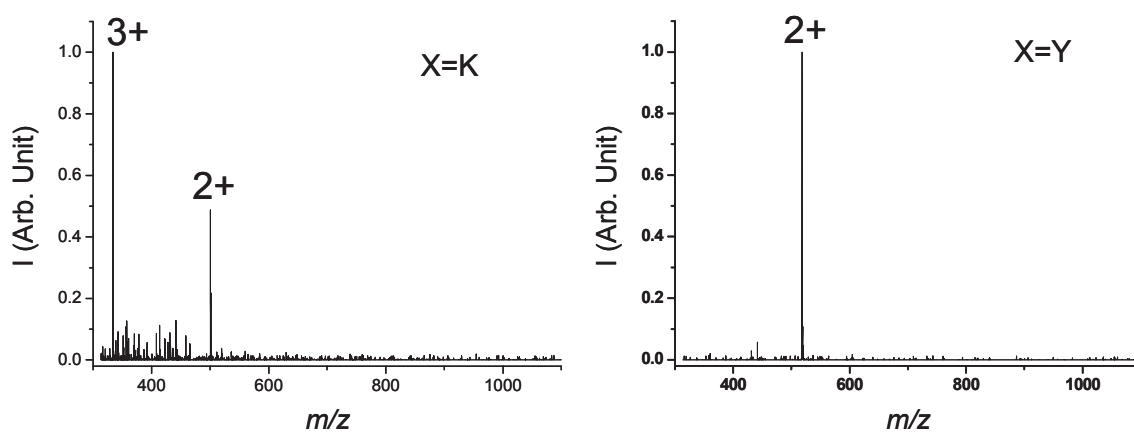


Figure III-1 : Spectres de masse de deux peptides basés sur des polyalanines de formules  $RA_4XA_4K$ .

La figure III-2 présente les sections efficaces de diffusion mesurées (en gris) pour les peptides de formules suivantes  $[RA_4XA_4K+2H]^{2+}$ , où X est l'un des 20 acides aminés naturels. Les profils en sections efficaces de diffusion mesurés ont des valeurs moyennes comprises entre 230 et 250 Å<sup>2</sup>. La largeur des distributions est généralement compatible à la diffusion naturelle (Cf. Chapitre1), ce qui laisse supposer qu'il n'y a qu'un seul conformère en présence. Cependant pour X=Lys, nous observons une distribution bimodale.

Les profils calculés et mesurés sont en très bon accord pour la plupart des peptides étudiés. La valeur de la section efficace de diffusion moyenne est en bonne accord entre l'expérience et les calculs se qui peut laisser penser que les structures sont réalistes. De plus si on s'intéresse à la largeur des distributions on remarque que la REMD à 300K est en adéquation avec les profils mesurés. Ceci montre que la largeur expérimentale n'est sans doute pas uniquement due à la diffusion mais également à la distribution de conformations à 300K.

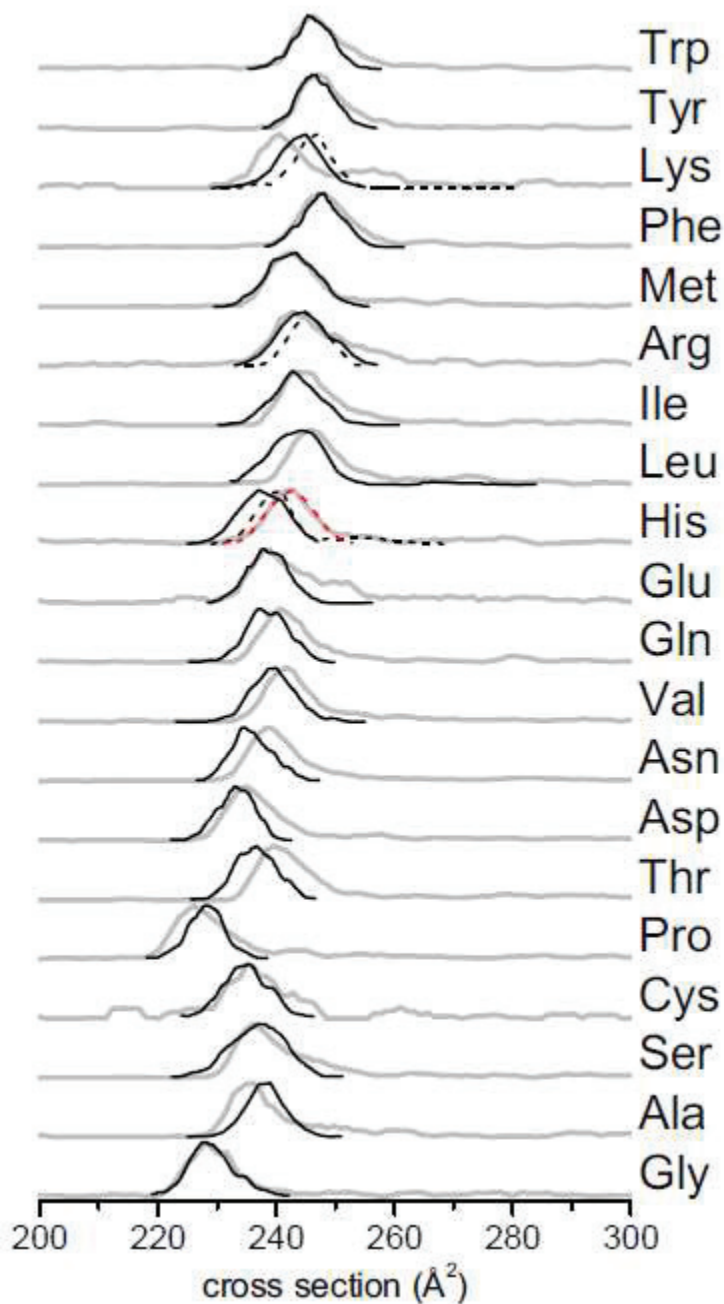
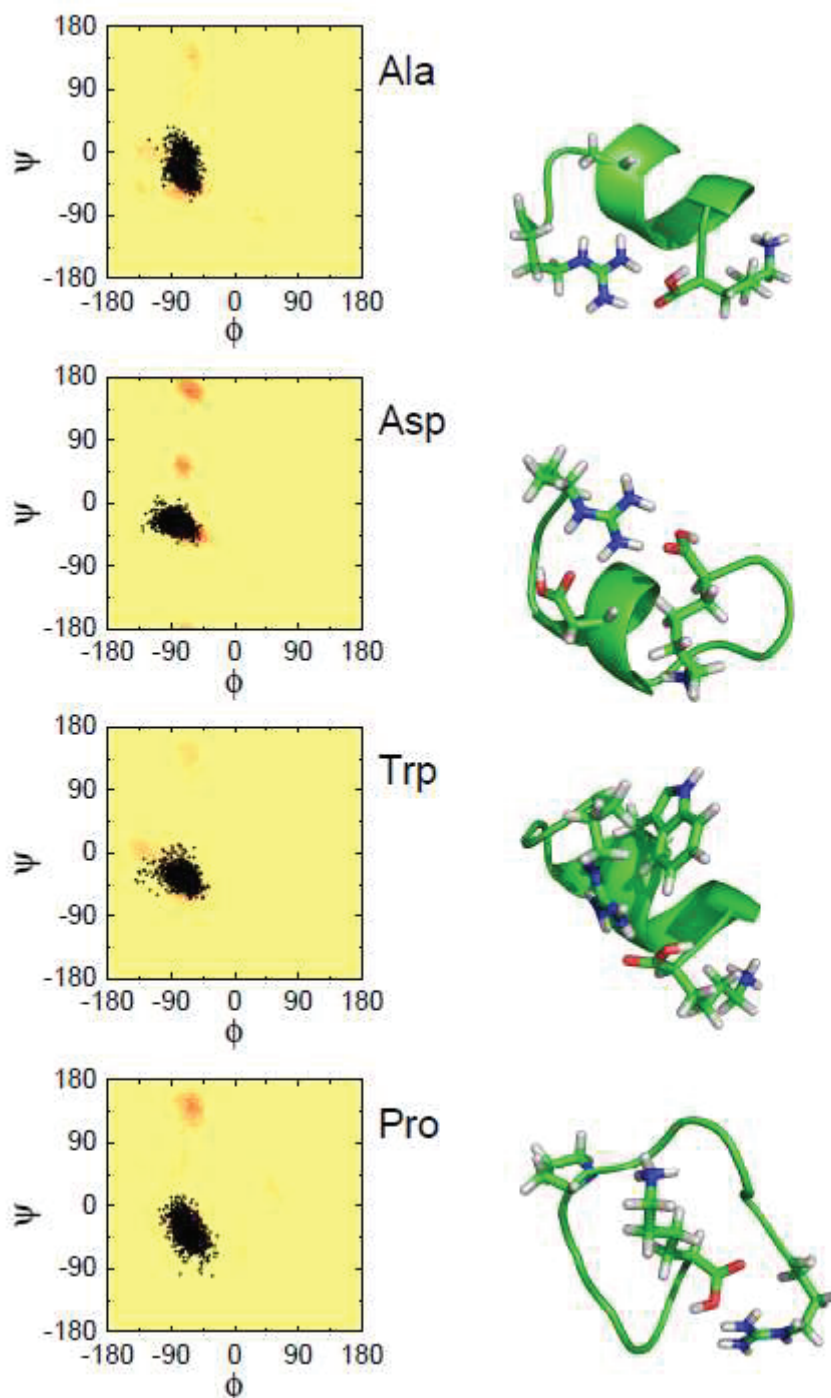


Figure III-2 : Profils des sections efficaces de diffusion expérimentales (gris) et théoriques (noir) pour la série des polyanalines. Les profils en noir représentent les distributions calculées pour une protonation sur l'arginine 1 et la lysine 11. Les profils en pointillés correspondent à une protonation sur l'arginine en position 1 et sur le résidu X en position 6 (pour les résidus basiques, avec X=His, Lys et Arg). Pour X=His les distributions correspondant aux deux formes tautomères de l'histidine centrale neutre sont représentées en trait noir et en pointillés rouges.

Sur la figure III-3 sont représentées les structures les plus stables et les diagrammes de Ramachandran<sup>14</sup> sur une sélection de peptides représentatifs de la série (avec X= Ala, Asp, Cys et Pro). En ce qui concerne les autres structures elles sont présentées dans l'annexe I. Les diagrammes de Ramachandran sont obtenus en traçant les couples d'angles diédraux  $\Phi$  et  $\Psi$  pour les 1000 structures échantillonnées à 300K.



**Figure III-3 : Structures les plus stables à 300K obtenues pour une sélection de peptides de la série des polyalanines ainsi que les diagrammes de Ramachandran correspondant. Les points noirs correspondent aux angles ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) pour le résidu central X, la carte en 2D (jaune au rouge) représente les angles dihedraux pour la chaîne principale de tous les résidus.**

Les motifs structuraux communs obtenus sont basés sur des hélices alpha, hormis pour la proline et pour les peptides où la charge se trouve sur le milieu du peptide (résidu X basiques). Cette tendance est confirmée, sur les diagrammes de Ramachandran, par la prédominance de la zone ( $\Phi, \Psi$ ) = (-60°, -45°) correspondant aux hélices alpha. En plus de l'arrangement commun en hélice alpha, plusieurs caractères communs peuvent être identifiés,

(i) une interaction électrostatique entre la charge positive de l'arginine (N-terminale) et le groupement acide carboxylique (C-terminale), (ii) la solvataion de la charge positive de la lysine (C-terminale) par les fonctions carbonyles de la chaîne principale (coté C-terminale). Cette dernière caractéristique avait été observée auparavant pour des polyalanines monochargées<sup>9</sup>. L'interaction favorable entre la charge et le dipôle électrique de l'hélice stabilise la structure secondaire en hélice alpha. Au-delà de ces similitudes les différentes structures, peuvent être séparées en trois groupes distincts dépendant des propriétés de l'acide aminé central X.

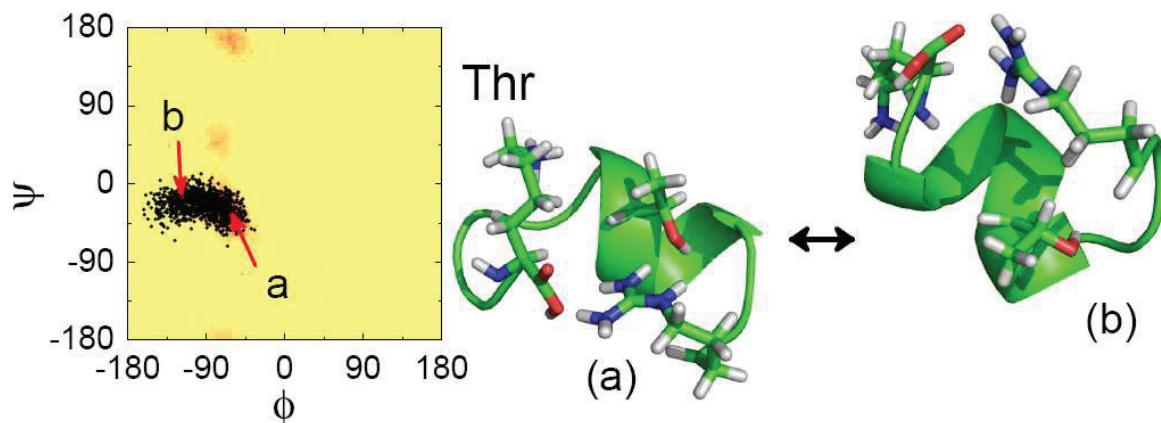
La présence d'un groupement carbonyle ou d'un oxygène sur la chaîne latérale de l'acide aminé central favorise une interaction électrostatique attractive avec la charge présente sur l'arginine. Ceci est observé pour le peptide où X=Asp (comme représenté sur la figure III-3) ou pour X=Glu. A cause du rapprochement des acides aminés Arg et X, la structure en hélice alpha est partiellement dépliée au niveau des deux extrémités C et N-terminale. Ceci apparait sur les diagrammes de Ramachandran par la présence de deux tâches autour de  $(\Phi, \Psi) = (-75^\circ, 50^\circ)$  et  $(\Phi, \Psi) = (-70^\circ, 170^\circ)$ . Un effet du même type, mais moins prononcé, est observé pour les peptides ayant pour résidu central X=Gln, Asn and Thr qui ont tous trois un atome d'oxygène dans leur chaîne. Pour les peptides de ce premier groupe, l'hélice obtenue est relativement courte, et s'étend du résidu 3-4 au résidu 7.

Un second groupe est composé de peptides ayant comme résidu central X= Trp, Met, Phe, Tyr, Ile et Val. Les chaînes latérales de ces derniers n'ont pas d'interactions significatives avec la charge portée par l'arginine. Leurs structures de plus basse énergie sont basées sur des hélices alpha plus longues que pour le groupe précédent, allant du résidu 3 jusqu' au résidu 10. Ceci est illustré sur la figure III-3, dans le cas du tryptophane, le diagramme de Ramachandran présente une tâche importante dans la zone des hélices alpha et seuls les angles dihedraux pour l'extrémité N-terminale (Arg) s'éloignent de cette zone.

Dans le troisième groupe (X=Ala, Cys, Gly), il n'y a pas de solvataion de la charge sur l'arginine par la chaîne latérale du résidu central. Par contre la solvataion de la lysine par le groupe carbonyle de la liaison peptidique est conservée. Ces peptides diffèrent de ceux du groupe précédent, par un dépliement plus prononcé de la partie N-terminale. Ainsi les hélices formées sont plus courtes (du résidu 5 jusqu'au 10). Les diagrammes de Ramachandran sont similaires à ceux du groupe précédent.

Les différences entre le groupe de l'Asp et du Trp peuvent être expliquées par la compétition entre la solvataion optimale de la charge par la chaîne latérale du résidu central et la formation de liaisons hydrogènes qui stabilisent l'hélice. Cet argument ne peut cependant

pas être appliqué au groupe de l'alanine, car les chaînes latérales des acides aminés de ce groupe sont trop petites pour déstabiliser l'hélice. Même si une interaction est possible comme dans le cas de X=Ser, où il y a présence d'une fonction alcool sur la chaîne latérale, la faible longueur de cette chaîne fait que ce dernier se comporte comme les peptides du groupe de l'alanine. Le comportement particulier du peptide le plus petit du groupe de l'Asp (X=Thr) permet d'illustrer cette compétition. Deux conformères sont obtenus par les calculs à 300K (Cf. Fig III-4). La structure la plus stable présente des caractéristiques communes au groupe de l'Asp alors que l'autre isomère est similaire au groupe de l'Ala.

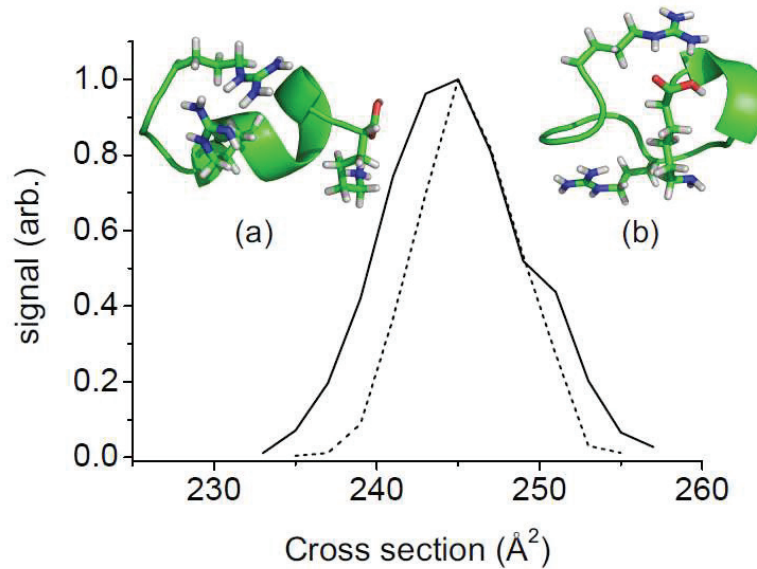


**Figure III-4 : Diagramme de Ramachandran et structures des peptides où X=Thr. Le conformère (a) a une structure correspondant au groupe de Asp, le conformère (b) a une structure correspondant au groupe de Ala.**

Enfin, le peptide où X=Leu adopte une structure intermédiaire entre le groupe de l'Asp et du Trp avec un domaine en hélice du résidu 4 à 7, et il n'y a pas de solvatisation de la charge par la chaîne latérale de la leucine.

Nous allons maintenant développer le cas des peptides comportant un résidu central basique (X=Arg, Lys et His). Pour ces derniers il y a des ambiguïtés sur les sites de protonation comme nous l'avons dit précédemment. Les comparaisons entre les différentes simulations et les résultats expérimentaux ne permettent pas de déterminer les sites de protonation. Malgré le fait que les structures obtenues sont très différentes il n'y a pas de différence dans les distributions de section efficace de diffusion calculées. La figure III-5 illustre le cas du peptide ayant pour résidu central l'arginine. Lorsque le résidu X est neutre (ligne noire) une structure hélicoïdale intermédiaire entre les peptides avec X=Trp et X=Asp est observée. Par contre, lorsque l'arginine centrale est chargée et la lysine en C-terminale est neutre (pointillés noirs) on obtient un conformère peu structuré. On remarque que la section efficace de diffusion de ces deux structures est semblable, ce qui ne nous permet pas d'identifier le site de

protonation d'après les données expérimentales. L'effet de la position de la charge sur la structure est le même pour X=Lys et His, mais dans ces cas les différences entre les sections efficaces de diffusion sont plus marquées (Cf. Figure III-2).



**Figure III-5 : Comparaison des structures et des sections efficaces de diffusion pour le peptide  $[RA_4RA_4K+2H]^{2+}$  avec les charges en position 1 et 11 (ligne noir) et 1 et 6 (pointillés noir).**

Pour X=Lys, la distribution bimodale observée expérimentalement sur le profil de section efficace de diffusion ne se retrouve pas dans les calculs. Il est donc difficile, pour ces systèmes, de conclure sur la coexistence ou non de différents conformères ceci est dû au fait que les sections efficaces sont très proches.

Finalement, la structure obtenue pour X=Pro est essentiellement globulaire. La faible valeur obtenue expérimentalement pour la section efficace est bien reproduite par le calcul (Cf. Figure III-2). La proline est un acide aminé particulier puisqu'il est cyclique, ce qui lui confère une certaine rigidité. Cette rigidité se traduit sur le diagramme de Ramachandran par une valeur de l'angle  $\Phi$  aux alentours de  $-75^\circ$ , alors que l'angle  $\Psi$  est plus flexible. Ainsi les géométries des alanines voisines du résidu central sont contraintes, ceci apparait par une tâche intense aux alentours de  $(\Phi, \Psi)=(-70^\circ, +140^\circ)$ . Hormis cette contrainte locale, les angles de torsions pour la plupart des autres alanines sont dans une zone compatible avec une structure secondaire en hélice alpha. D'autre part le motif de solvation des charges est le même que celui observé pour les autres peptides. C'est-à-dire que les charges portées par les chaînes latérales de la lysine et de l'arginine sont solvatées respectivement par la fonction acide carboxylique et les groupes carbonyles de la chaîne peptidique. C'est simplement la perturbation locale causée par de la proline qui donne une structure non hélicoïdale.



## 2. Polyglycines :

La figure III-6 représente les profils de section efficace de diffusion (en gris) mesurés pour la série des polyglycines, de formule  $[RG_4XG_4K+2H]^{2+}$ . Le profil expérimental du peptide avec  $X=Cys$  n'est pas représenté puisque l'échantillon ne donnait pas assez de signal.

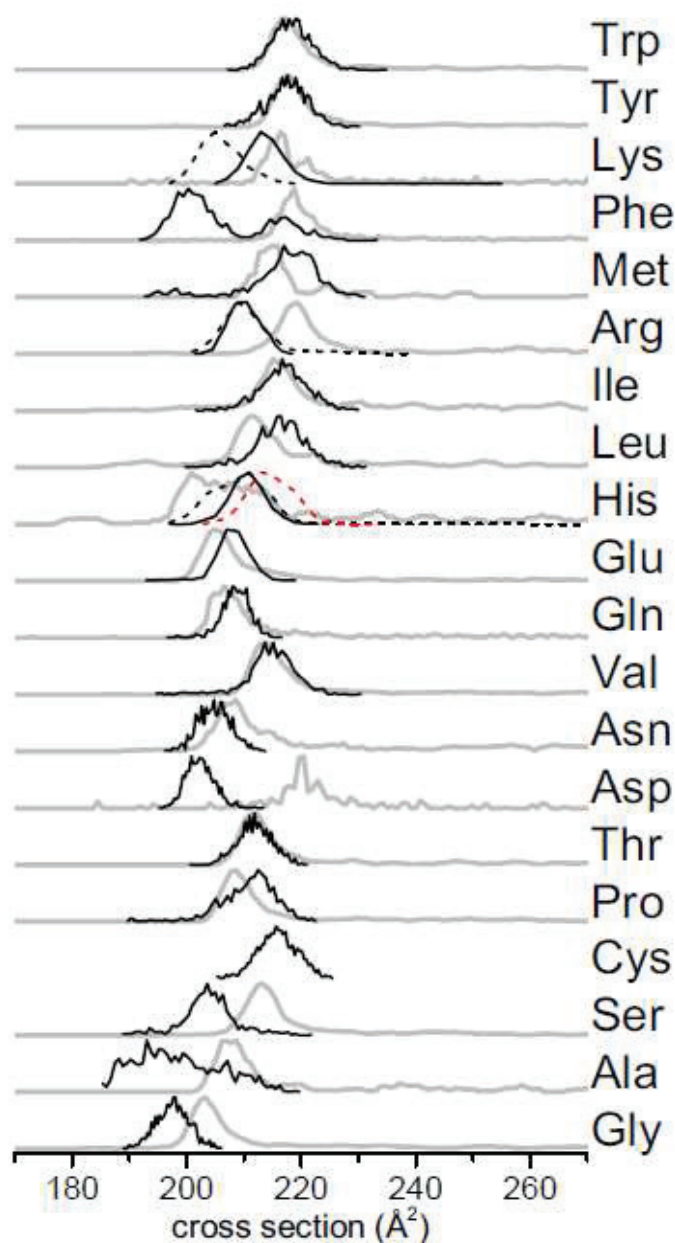


Figure III-6 : Profils des sections efficaces de diffusion expérimentales (gris) et théoriques (noir) pour la série des polyglycines. (en noir pour les charges localisées en position 1 et 11, en pointillés noir pour les charges en position 1 et 6 seulement pour les résidus centraux basiques, et en pointillés rouge pour  $X=His$  avec les charges en position 1 et 11 mais avec l'autre forme tautomère de l'histidine).

Les peptides présentent une valeur moyenne de section efficace aux alentours de 200 à 230 Å<sup>2</sup>, donc plus petite que pour la série des polyalanines, ce qui est dû au fait que la chaîne latérale de la glycine est plus petite que celle de l'alanine. Comme précédemment, la plupart

des profils ont une largeur compatible avec la diffusion naturelle ce qui peut suggérer la présence d'un seul conformère. Seul le peptide avec X=His présente une distribution plus large, ce qui peut laisser présager plusieurs conformères.

Les profils de section efficaces de diffusion obtenus par les simulations de REMD sont également présentés sur la figure III-6. Ils présentent tous un pic unique sauf pour X=Phe, qui a clairement une distribution bimodale. Les largeurs des profils mesurés sont généralement en adéquation avec ceux calculés, même pour le peptide X=His si on considère la lysine en C-terminale neutre. Seul le peptide avec X=Ala a un profil calculé plus large que celui obtenu expérimentalement. Les positions des pics sont globalement bien en accord entre les calculs et l'expérience. On remarque cependant que pour les peptides comportant un résidu central de petite taille (X=Ala, Gly, Asp et Arg), les calculs sous-estiment la valeur de la section efficace de diffusion. Contrairement à la série des polyalanines, où tous les peptides présentaient une structure secondaire de type hélice, les polyglycines ont des structures assez différentes et aucune structuration secondaire n'émerge. Malgré tout, il y a une tendance globale qui va être illustrée par les exemples suivants. Les diagrammes de Ramachandran correspondant aux 1000 structures obtenues à 300K ont été tracés de la même manière que pour les polyalanines. Des exemples sont présentés sur la figure III-7 pour les peptides avec X=Gly, Thr, Ile et Phe avec leurs structures de plus basses énergies. Les autres structures sont présentées dans l'annexe II. Dans certains cas (X=Phe et Ile) plusieurs structures sont présentées. Ces dernières correspondent aux différents isomères stables émergeant des simulations à 300K. Si on compare les diagrammes de Ramachandran à ceux obtenus pour les polyalanines, on remarque que les angles diédraux s'étendent sur des plages de valeurs beaucoup plus grandes, ce qui montre la plus grande flexibilité des glycines. De plus, les diagrammes changent de manière plus significative lorsque l'on modifie l'acide aminé central X. Ce qui veut dire que la structuration des glycines est beaucoup moins forte. La grande variété de conformations donnée par les diagrammes de Ramachandran peut être expliquée par l'absence d'une structuration secondaire dominante, mais peut aussi provenir de la coexistence de plusieurs isomères. Ceci peut être tranché en regardant la valeur des angles diédraux ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) de l'acide aminé central (en noir sur la figure III-7). Dans de nombreux cas, X=Gly et Thr par exemple, qui sont représentés dans la figure suivante, ces angles sont dans des régions très étroites du diagramme. Des analyses supplémentaires de trajectoires confirment le fait que chacun de ces peptides adoptent en phase gazeuse une structure bien définie correspondant à la structure de plus basse énergie potentielle.



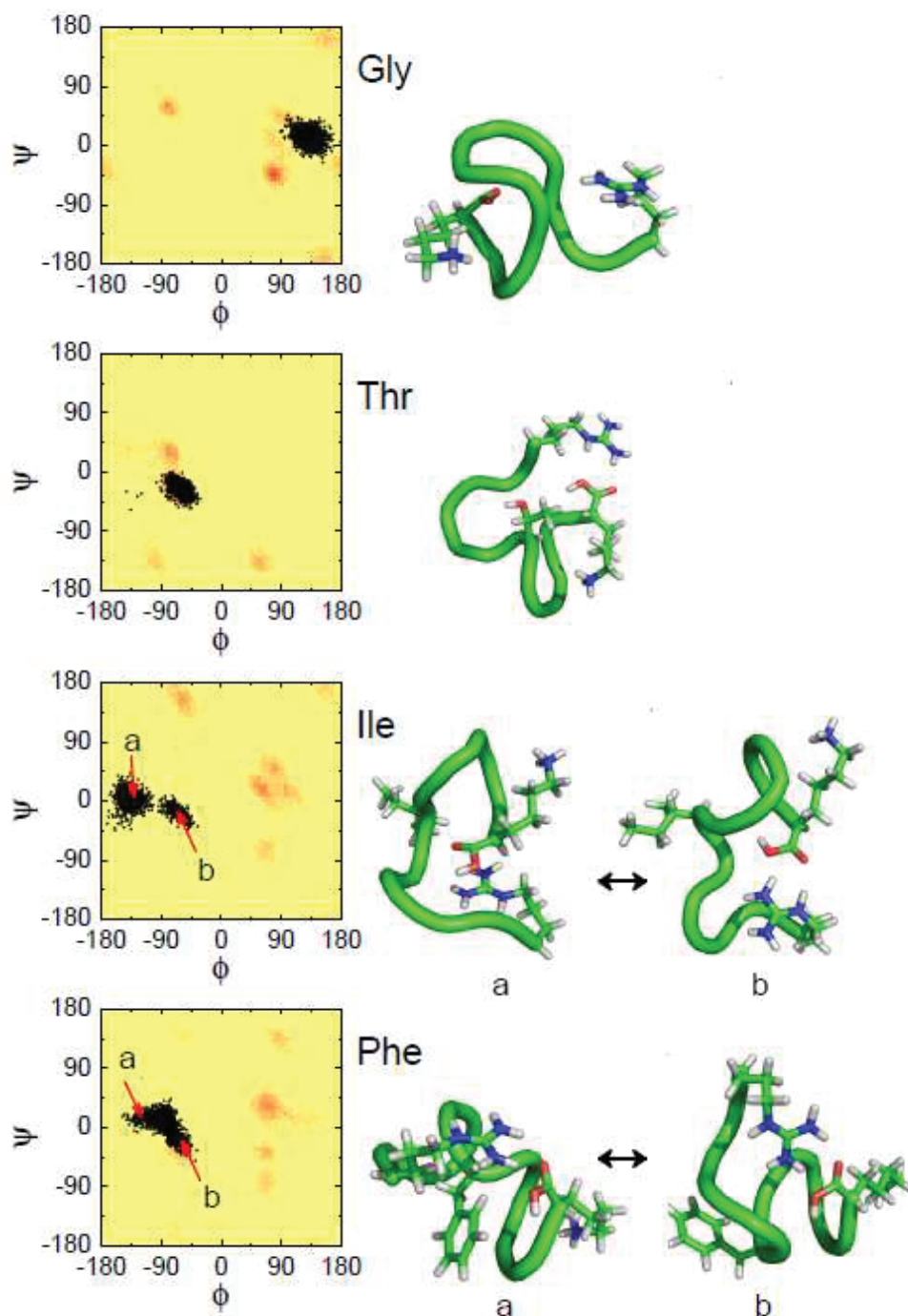


Figure III-7: Structures les plus stables à 300K obtenues pour une sélection de peptides de la série des polyglycines dichargées ainsi que les diagrammes de Ramachandran correspondant.

En observant les structures obtenues, on remarque que le facteur le plus influant sur la structuration des peptides est la solvation de la charge, notamment près du groupe carbonyle de la liaison peptidique centrale ainsi que de la chaîne latérale de l'acide aminé central.

Dans l'autre moitié des peptides, on observe la signature de la coexistence de plusieurs isomères. Ceci est bien illustré sur la figure III-7 avec le peptide où X=Phe où l'on observe

bien une distribution bimodale, et aussi sur la figure III-6 où l'on observe un profil très large pour le peptide où X=His. Pour les autres peptides la coexistence est bien visible sur les diagrammes de Ramachandran. Par exemple, la distribution des angles ( $\Phi, \Psi$ ) pour X=Ile présente deux nuages de point distincts. Le nuage de point centré sur la valeur  $(-150^\circ, 0^\circ)$ , qui inclut la structure la plus stable, correspond à une structure où la chaîne latérale de l'arginine protonées est parallèle à l'acide carboxylique (C-terminale) et au dessus de lui. Ces deux groupes protonés peuvent se trouver dans le même plan ce qui correspond au deuxième nuage de points à  $(\Phi, \Psi) = (-60^\circ, 20^\circ)$ . Les deux isomères sont représentés sur la figure III-6. On observe un comportement similaire pour X=Gln, Leu, Met, Asn et aussi pour X=Arg et His si on considère l'acide aminé central chargé. Dans tous les cas, les deux principaux conformères suggérés par les distributions bimodales des diagrammes de Ramachandran diffèrent dans l'arrangement local et la solvation de la charge de l'Arg et de la Lys et de la chaîne latérale de X. Enfin, le peptide ayant comme résidu central l'alanine a trois nuages de points résolus sur son diagramme de Ramachandran, les mêmes observations ont été faites sur X=His (Cf. Fig III-8).

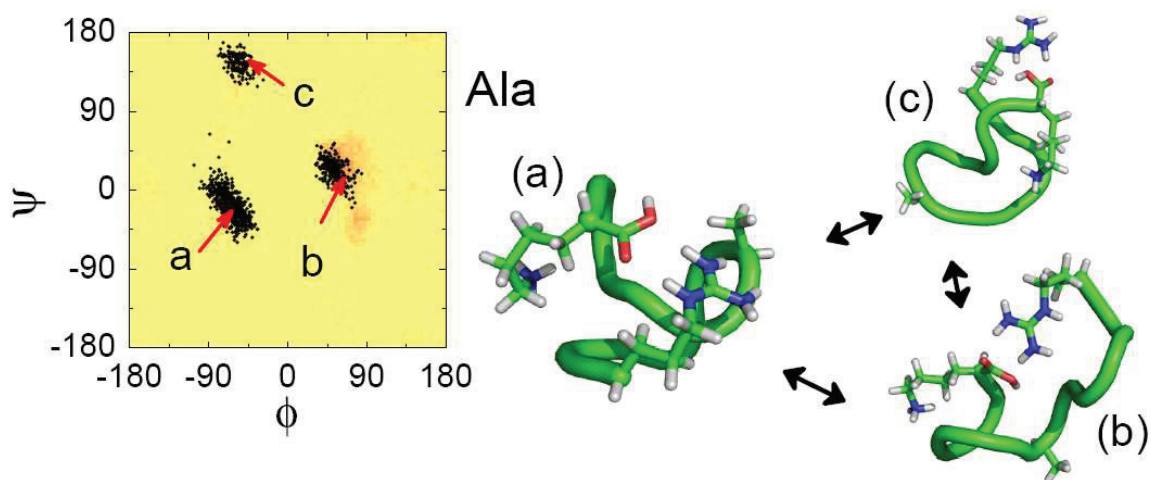


Figure III-8 : Diagramme de Ramachandran et structures de plus basse énergie pour le peptide  $[RG_4AG_4K+2H]^{2+}$ .

Les conformères correspondants ont le même schéma de solvation entre le groupement carboxylique et la chaîne latérale de l'arginine, par contre la solvation de la chaîne latérale de la lysine par le groupement carbonyle de l'acide aminé central diffère.

## IV. Discussion :

Les différentes conformations adoptées par les polyglycines et les polyalanines sont régies par la solvataion des charges de l'arginine et de la lysine, notamment par le groupe carboxylique et les carbonyles, et dans une moindre mesure par la chaîne latérale du résidu central. Ceci est particulièrement remarquable pour les polyglycines, où différentes manières de solvater les charges sont rendues possibles par la flexibilité des glycines. La variété de structures échantillonnées à 300K reflète bien ce phénomène.

La série des polyalanines se distingue par sa haute propension à former des hélices alpha, hormis pour le cas où X=Pro. Les différences entre ces peptides proviennent de la solvataion des charges qui diffère en fonction de la chaîne latérale de l'acide aminé central. Ainsi, la longueur de l'hélice dépend de l'acide aminé central. Si on compare les hélices obtenues, en excluant le peptide avec X=Pro, avec la propension à faire des hélices<sup>15</sup> pour les acides aminés centraux on remarque qu'il n'y a pas de corrélation. D'après les résultats, la longueur des hélices pour X=Trp est de 7 mais seulement de 5 pour X=Glu, alors que l'acide glutamique donne plus facilement des hélices que le tryptophane.

Les structures similaires obtenues pour les polyalanines suggèrent que les différences de sections efficaces de diffusion dépendent de la taille du résidu central. Le volume (V) de la plupart des acides aminés (tous sauf Arg, His et Cys) a été déterminé par Couterman et al.<sup>16</sup>. La figure IV-1 représente les sections efficaces mesurées pour chaque peptide en fonction de V. Pour le cas où X=Lys, nous observons une distribution bimodale avec le pic le plus intense qui est noté K et l'autre K\*. Nous observons une distribution linéaire sauf pour K\* et P, ces deux derniers sont exclus de la régression linéaire. Pour X=Arg, His et Cys, les volumes ne sont pas connus, la relation linéaire nous a permis d'estimer leurs volumes. Nous obtenons pour  $V(\text{Arg})=130\text{\AA}^3$ ,  $V(\text{Cys})=90\text{\AA}^3$ ,  $V(\text{His})=125\text{\AA}^3$ , avec une incertitude de 30%. Pour les polyglycines (Cf. Figure IV-2), la corrélation est nettement moins bonne. Ceci provient du fait que les glycines sont très flexibles et que la chaîne latérale de l'acide aminé central peut modifier la structure global. On remarque que pour des résidus centraux dont les chaînes latérales sont assez similaires chimiquement, on obtient parfois des structures assez différentes. Ceci est bien illustré sur les mesures de sections efficaces pour les peptides basés sur X=Asp et Glu. Les distributions obtenues pour X=Tyr, Trp sont en revanche assez similaires expérimentalement. Pour X=Phe on voit une structure plus compacte présente sur le profil en section efficace obtenu par calcul.

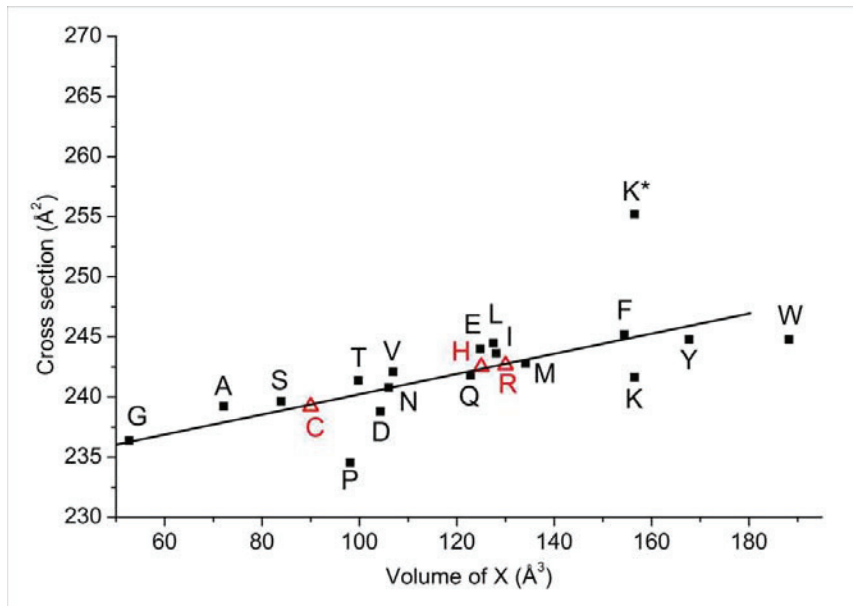


Figure IV-1 : Corrélation entre la section efficace mesurée et le volume des acides aminés pour les polyanilines, les lettres représentent les acides aminés centraux.

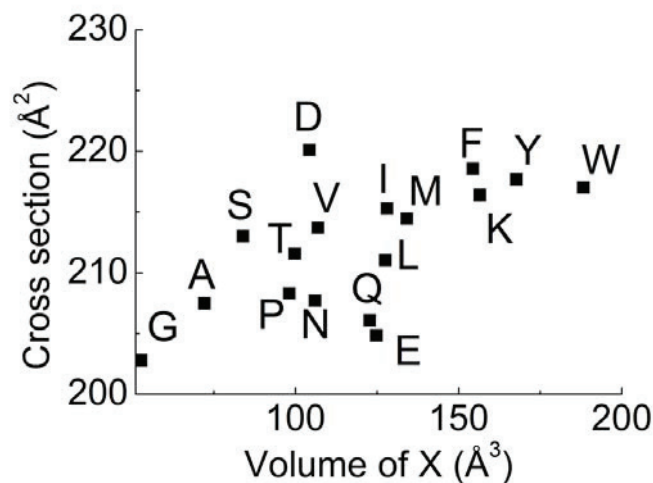


Figure IV-2 : Corrélation entre la section efficace mesurée et le volume des acides aminés pour les polyglycines, les lettres représentent les acides aminés centraux.

Pour ce peptide, les calculs correspondent à l'expérience, pour le second pic sur le profil en section efficace ce qui indique que l'on a la présence de conformères métastables. Pour les peptides où les simulations sont en bonne corrélation avec les résultats expérimentaux, les structures extraites à 300 K ont été analysées de manière plus précise en traçant leur énergie potentielle en fonction de leurs sections efficaces de diffusion.

La figure IV-2 représente la corrélation entre la section efficace de diffusion et l'énergie potentielle instantanée pour 1000 structures représentatives des peptides suivants,  $[RA_4IA_4K+2H]^{2+}$  (a) et  $[RG_4IG_4K+2H]^{2+}$  (b). Sur ce même graphique est aussi représentée la corrélation entre la section efficace de diffusion et l'énergie potentielle de ces 1000 structures

après optimisation. On remarque que pour le peptide (a) on filtre 768 structures après optimisation alors que pour le peptide (b) on en filtre seulement 231. Ceci provient du fait que la chaîne latérale des glycines est composée seulement d'un hydrogène, ainsi une seule orientation est possible. En revanche pour les polyalanines, la chaîne latérale composée du groupement  $\text{CH}_3$  a des orientations différentes possibles, ce qui augmente le nombre de conformation. Ceci se traduit par un potentiel comportant beaucoup de minimum locaux correspondant aux différents réarrangements possibles des chaînes latérales.

En ce qui concerne la forme du potentiel des structures optimisées, pour le peptide (a) on a un puit de potentiel assez étroit correspondant à des structures correspondant à  $239 \text{ \AA}^2$ . Par contre pour le peptide (b) on a un potentiel assez plat où les structures sont comprises entre 208 et  $218 \text{ \AA}^2$  avec une énergie potentielle assez proche.

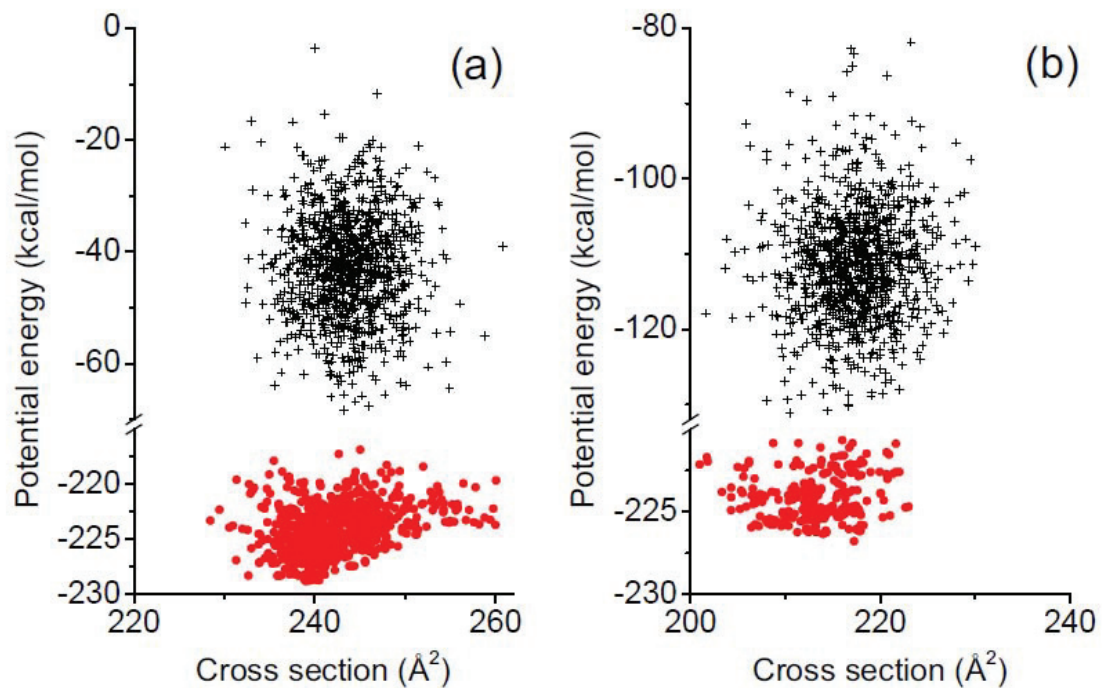


Figure IV-3 Energie potentielle en fonction des sections efficaces de diffusion pour une série de 1000 configurations (a)  $[\text{RA}_4\text{IA}_4\text{K}+2\text{H}]^{2+}$  et (b)  $[\text{RG}_4\text{IG}_4\text{K}+2\text{H}]^{2+}$ , échantillonnée à 300 K. Les structures instantanées et optimisées sont respectivement en croix noir et en rond rouge.

Ces résultats expliquent les observations faites sur la différence entre les polyalanines et les polyglycines. C'est-à-dire, la difficulté de reproduire l'expérience par les calculs à cause des différences relative d'énergie de structures de plus basse énergie.

## **V. Conclusion :**

La méthode de calcul utilisée est en très bon accord avec les expériences, ce qui valide cette approche. Le champ de force est bien adapté pour les polyalanines. Par contre, en ce qui concerne les polyglycines le choix de la structure de plus basse énergie est plus compliqué étant donné la coexistence de nombreux conformères ayant des énergies très proche.

Cette étude nous a permis de déterminer le volume de certains acides aminés qui n'étaient pas dans la littérature (Arg, Cys et His). Ces résultats permettent aussi de mieux appréhender les facteurs qui stabilisent les structures en phase gazeuse comme la solvation des charges. Ces systèmes, dont la structure en phase gazeuse a pu être déterminée, peuvent servir de systèmes modèles dans des études résolues en conformation. Notamment sur l'étude l'influence de la structure de ces peptides sur leur abondance d'ion produit par dissociation induite par capture d'électron (ECD)<sup>17</sup>.



1. Bernstein, S. L. et al. Amyloid-beta protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nature Chemistry* **1**, 326-331 (2009).
2. Grabenauer, M., Wu, C., Soto, P., Shea, J.-E. & Bowers, M. T. Oligomers of the prion protein fragment 106-126 are likely assembled from beta-hairpins in solution, and methionine oxidation inhibits assembly without altering the peptide's monomeric conformation. *J Am Chem Soc* **132** (2010).
3. Dill, K. A. Dominant Forces in Protein Folding. *Biochemistry* **29**, 7133-7155 (1990).
4. Jarrold, M. F. Peptides and proteins in the vapor phase. *Annual Review of Physical Chemistry* **51**, 179-207 (2000).
5. Barran, P. E. et al. Is it biologically relevant to measure the structures of small peptides in the gas-phase? *International Journal of Mass Spectrometry* **240**, 273-284 (2005).
6. Richardson, J. S. & Richardson, D. C. Amino-Acid Preferences for Specific Locations at the Ends of Alpha-Helices. *Science* **240**, 1648-1652 (1988).
7. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. Conformational Parameters for Amino-Acids in Helical, Beta-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. *Biochemistry* **13**, 211-222 (1974).
8. Hudgins, R. R. & Jarrold, M. F. Helix formation in unsolvated alanine-based peptides: Helical monomers and helical dimers. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 3494-3501 (1999).
9. Hudgins, R. R., Ratner, M. A. & Jarrold, M. F. Design of helices that are stable in vacuo. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 12974-12975 (1998).
10. Dugourd, P., Antoine, R., Breaux, G., Broyer, M. & Jarrold, M. F. Entropic stabilization of isolated beta-sheets. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 4675-4679 (2005).
11. Counterman, A. E. & Clemmer, D. E. Large anhydrous polyalanine ions: Evidence for extended helices and onset of a more compact state. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 1490-1498 (2001).
12. Wang, J. M., Cieplak, P. & Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry* **21**, 1049-1074 (2000).
13. Mesleh, M. F., Hunter, J. M., Shvartsburg, A. A., Schatz, G. C. & Jarrold, M. F. Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 16082-16086 (1996).
14. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *Journal of Molecular Biology* **7**, 95-& (1963).
15. Pace, C. N. & Scholtz, J. M. A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophysical Journal* **75**, 422-427 (1998).
16. Counterman, A. E. & Clemmer, D. E. Volumes of individual amino acid residues in gas-phase peptide ions. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 4031-4039 (1999).
17. Vorobyev, A., Hamidane, H. B. & Tsybin, Y. O. Electron Capture Dissociation Product Ion Abundances at the X Amino Acid in RAAAA-X-AAAK Peptides Correlate with Amino Acid Polarity and Radical Stability. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20**, 2273-2283 (2009).

# Appendice A : Simulations numériques :

Les simulations numériques se déroulent en deux parties distinctes, la première permet de générer des structures pertinentes et la seconde permet de déterminer les sections efficaces de diffusion de ces dernières.

## 1-Génération de structures pertinentes :

Pour générer des structures, la méthode choisie a été la dynamique moléculaire couplée au champ de forces AMBER99. Cette méthode permet de faire une étude dynamique des systèmes étudiés. Pour pouvoir explorer le paysage conformationnel nous avons utilisé la méthode d'échanges de répliques. Dans cette méthode, différents calculs de dynamique moléculaire sont réalisés à différentes températures en parallèle. Aléatoirement des échanges entre les répliques sont effectués comme représentées sur la figure suivante.



Figure 1 : Schéma des échanges de répliques.

Nous allons maintenant expliciter la méthode d'échanges de répliques (Sugita et al<sup>1</sup>).

Soit un système composé de  $N$  atomes de masse  $m_k (k=1, \dots, N)$  avec leurs vecteurs de positions et vecteurs de quantité de mouvement écrits de la manière suivante,  $q \equiv \{q_1, \dots, q_N\}$  et  $p \equiv \{p_1, \dots, p_N\}$ . L'hamiltonien  $H(q,p)$  du système est donné par la somme de l'énergie cinétique  $K(p)$  et de l'énergie potentiel  $E(q)$  :



$$H(q, p) = K(p) + E(q) \quad \text{Eq. 1}$$

Avec

$$K(p) = \sum_{k=1}^N \frac{p_k^2}{2m_k} \quad \text{Eq. 2}$$

Dans l'ensemble canonique à la température  $T$ , chaque état  $x \equiv (q, p)$  avec l'hamiltonien  $H(q, p)$  est pondéré par le facteur de Boltzmann :

$$W_B(x; T) = e^{-\beta H(q, p)} \quad \text{Eq. 3}$$

Où  $\beta$ , la température inverse, est définie par  $\beta = 1/k_B T$  (avec  $k_B$  la constante de Boltzmann). L'énergie cinétique moyenne à la température  $T$  est donnée par,

$$\langle K(p) \rangle_T = \left\langle \sum_{k=1}^N \frac{p_k^2}{2m_k} \right\rangle = \frac{3}{2} N k_B T \quad \text{Eq. 4}$$

L'ensemble généralisé pour l'échange de répliques consiste en  $M$  copies (ou répliques) sans interactions du système original dans l'ensemble canonique à  $M$  températures différentes  $T_m$  ( $m=1, \dots, M$ ). Les répliques sont disposées de telle manière qu'il n'y a qu'une réplique pour une température donnée. Ainsi il n'y a qu'une seule correspondance entre les répliques et les températures ; si on prend l'indice  $i$  ( $i=1, \dots, M$ ) pour les répliques et  $m$  ( $m=1, \dots, M$ ) pour les températures, à un instant donné si l'on connaît la température on peut connaître la réplique et vice versa :

$$\begin{cases} i = i(m) \equiv f(m), \\ m = m(i) \equiv f^{-1}(i), \end{cases} \quad \text{Eq. 5}$$

Où  $f(m)$  est la fonction de permutation de  $m$  et  $f^{-1}(i)$  est son inverse.

Soit  $X = (x_1^{[i(1)]}, \dots, x_M^{[i(M)]}) = (x_{m(1)}^{[1]}, \dots, x_{m(M)}^{[M]})$  permettant de définir l'état du système dans l'ensemble généralisé. Dans  $x_m^{[i]}$  l'exposant et l'indice décrivent respectivement la réplique et

la température. L'état X est défini par M séries de coordonnées  $q^{[i]}$  et de quantité de mouvement  $p^{[i]}$  des N atomes de la réplique i à la température  $T_m$  :

$$x_m^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_m \quad \text{Eq. 6}$$

Puisque les répliques sont indépendantes, le facteur de pondération pour l'état X dans l'ensemble généralisé est donné par le produit du facteur de Boltzmann pour chaque réplique (ou à chaque température) :

$$W_{REM}(X) = \exp\left\{-\sum_{i=1}^M \beta_{m(i)} H(q^{[i]}, p^{[i]})\right\} = \exp\left\{-\sum_{i=1}^M \beta_m H(q^{[i(m)]}, p^{[i(m)]})\right\} \quad \text{Eq. 7}$$

Où  $i(m)$  et  $m(i)$  est la fonction de permutation définie dans l'Eq.5.

Nous allons maintenant considérer un échange d'une paire de réplique dans l'ensemble généralisé. L'échange va être réalisé entre une réplique i et j qui correspondent aux températures  $T_m$  et  $T_n$ ,

$$X = (\dots, x_m^{[i]}, \dots, x_n^{[j]}, \dots) \rightarrow X' = (\dots, x_m^{[j]}, \dots, x_n^{[i]}, \dots) \quad \text{Eq. 8}$$

Ici i, j, m et n sont relatifs à la fonction de permutation décrite dans l'Eq. 5., l'échange de répliques introduit une nouvelle fonction de permutation  $f'$  :

$$\begin{cases} i = f(m) \rightarrow j = f'(m), \\ j = f(n) \rightarrow i = f'(n), \end{cases} \quad \text{Eq. 9}$$

L'échange de répliques peut être écrit de manière plus détaillé par,

$$\begin{cases} x_m^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_m \rightarrow x_m^{[j]} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]})_m, \\ x_n^{[j]} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]})_n \rightarrow x_n^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_n, \end{cases} \quad \text{Eq. 10}$$

Le processus est équivalent si l'on échange les paires de températures  $T_m$  et  $T_n$  pour les répliques correspondantes i et j comme présenté dans l'équation suivante,

$$\begin{cases} x_m^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_m \rightarrow x_n^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_n, \\ x_n^{[j]} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]})_n \rightarrow x_m^{[j]} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]})_m, \end{cases} \quad \text{Eq. 11}$$

Pour tenir compte du changement de température lorsque l'on échange de répliques il faut réajuster les vitesses et donc l'énergie cinétique par le biais de la quantité de mouvement comme montré dans l'équation suivante,

$$\begin{cases} p^{[i]} \equiv \sqrt{\frac{T_n}{T_m}} p^{[i]} \\ p^{[j]} \equiv \sqrt{\frac{T_m}{T_n}} p^{[j]} \end{cases} \quad \text{Eq. 12}$$

Cette équation permet de satisfaire l'Eq. 4.

Pour que le processus d'échange converge vers une distribution d'équilibre, il suffit d'imposer une condition de balance impliquée sur la probabilité de transition  $X(X \rightarrow X')$  :

$$W_{REM}(X)w(X \rightarrow X') = W_{REM}(X')w(X' \rightarrow X) \quad \text{Eq. 13}$$

$$\frac{w(X \rightarrow X')}{w(X' \rightarrow X)} = \exp \left\{ -\beta_m [K(p^{[j]}) + E(q^{[j]})] - \beta_n [K(p^{[i]}) + E(q^{[i]})] \right. \\ \left. + \beta_m [K(p^{[i]}) + E(q^{[i]})] + \beta_n [K(p^{[j]}) + E(q^{[j]})] \right\}$$

$$\frac{w(X \rightarrow X')}{w(X' \rightarrow X)} = \exp \left\{ -\beta_m \frac{T_m}{T_n} K(p^{[j]}) - \beta_n \frac{T_n}{T_m} K(p^{[i]}) + \beta_m K(p^{[i]}) \right. \\ \left. + \beta_n K(p^{[j]}) - \beta_m [E(q^{[j]}) - E(q^{[i]})] - \beta_n [E(q^{[i]}) - E(q^{[j]})] \right\} \quad \text{Eq. 14}$$

$$\frac{w(X \rightarrow X')}{w(X' \rightarrow X)} = \exp(-\Delta)$$

Où,

$$\Delta \equiv [\beta_n - \beta_m](E(q^{[i]}) - E(q^{[j]})) \quad \text{Eq. 15}$$

Et  $i, j, m$  et  $n$  sont relatifs aux permutations avant l'échange (Eq. 5)

$$i = f(m), j = f(n) \quad \text{Eq. 16}$$

Cette dernière doit être respectée en utilisant, par exemple, le critère Metropolis,

$$w(X \rightarrow X') \equiv w(x_m^{[i]} | x_n^{[j]}) = \begin{cases} 1, \text{ pour } \Delta \leq 0 \\ \exp(-\Delta), \text{ pour } \Delta > 0 \end{cases} \quad \text{Eq. 17}$$

Où  $w(x_m^{[i]} | x_n^{[j]})$  est l'échange de répliques (ou de températures) écrit de manière explicite. Nous supposons que  $\beta_1 < \beta_2 < \dots < \beta_M$ . Une simulation d'échanges est réalisée en alternant les deux étapes suivantes :

1-Chaque répliques dans l'ensemble canoniques à une température fixe est simulées de manière simultanées et indépendantes pour un certain pas de dynamique moléculaire.

2-Une paire de répliques à des températures voisines,  $x_m^{[i]}$  et  $x_{m+1}^{[j]}$ , sont échangées avec la probabilité  $w(x_m^{[i]} | x_{m+1}^{[j]})$  dans l'Eq. 17. Des répliques voisines sont échangées car le taux d'acceptation de l'échange décroît exponentiellement avec la différence de deux  $\beta_S$  (Cf. Eq.17 et 19). Il faut également noter que si un échange de réplique est accepté dans l'étape 2, la fonction de permutation (Eq. 5) est actualisée.

Le principal avantage de l'échange de répliques par rapport aux autres méthodes d'ensemble généralisé comme les algorithmes multicanoniques<sup>2</sup> et les températures simulées<sup>3,4</sup> vient du fait que le facteur de pondération est a priori connu (Eq. 7), alors que dans les méthodes citées précédemment la détermination des facteurs de pondération est très fastidieuse et coûteuse en temps de calculs. Pour une performance optimale de l'échange de répliques on doit toujours choisir une distribution de températures appropriées.

La valeur canonique attendue de la quantité physique  $A$  à la température  $T_m$  ( $m=1, \dots, M$ ) peut être calculée en utilisant l'équation suivante,

$$\langle A \rangle_{T_m} = \frac{1}{N_{sim}} \sum_{t=1}^{N_{sim}} \sum_{i=1}^M A[x_{f^{-1}(i;t)}^{[i]}(t)] \delta_{f^{-1}(i;t),m} \quad \text{Eq. 18}$$

Où  $N_{sim}$  est le nombre total de mesures effectuées pour chaque réplique,  $f^{-1}(i;t)$  est la fonction de permutation de l'Eq.5 à la mesure  $t$ th, et  $\delta_{k,l}$  est la fonction delta de Kronecker. Quand on s'intéresse à la température d'échange, l'équation précédente peut s'écrire de la manière suivante,

$$\langle A \rangle_T = \frac{1}{N_{sim}} \sum_{t=1}^{N_{sim}} A(x_m^{[f(m;t)]}(t)) \quad \text{Eq. 19}$$

En ce qui concerne la valeur attendue pour une température intermédiaire, une méthode de repondération par histogramme multiple<sup>5,6</sup> est utilisée. Nous supposons que nous avons fait  $R$  simulations indépendantes à  $R$  températures différentes. Soit  $N_m(E)$  et  $n_m$  qui sont respectivement l'énergie de l'histogramme et le nombre total d'échantillons obtenue dans le calcul  $m$ th. (En échange de répliques  $n_m=N_{sim}$ ) La valeur attendue pour la quantité physique  $A$  à n'importe quelle température intermédiaire  $T=1/k_B\beta$  est donné par,

$$\langle A \rangle_T = \frac{\sum_E A(E) P(E; \beta)}{\sum_E P(E; \beta)} \quad \text{Eq. 20}$$

Où,

$$P(E; \beta) = \frac{\sum_{m=1}^R g_m^{-1} N_m(E) e^{-\beta E}}{\sum_{m=1}^R n_m g_m^{-1} e^{f_m - \beta_m E}} \quad \text{Eq. 21}$$

Et,

$$e^{-f_m} = \sum_E P(E; \beta_m) \quad \text{Eq. 22}$$

Ici,  $g_m = 1 + 2\tau_m$  et  $\tau_m$  est le temps d'autocorrélation intégré à la température  $T_m$ .

Le protocole détaillé de calcul utilisé est présenté ci-après. La structure de départ est une structure complètement dépliée. La première partie du calcul permet d'obtenir la structure de plus basse énergie. Ensuite une seconde étape permet de refaire de la REMD à des températures proches de 300K (température de travail). 1000 structures sont extraites à 300K.

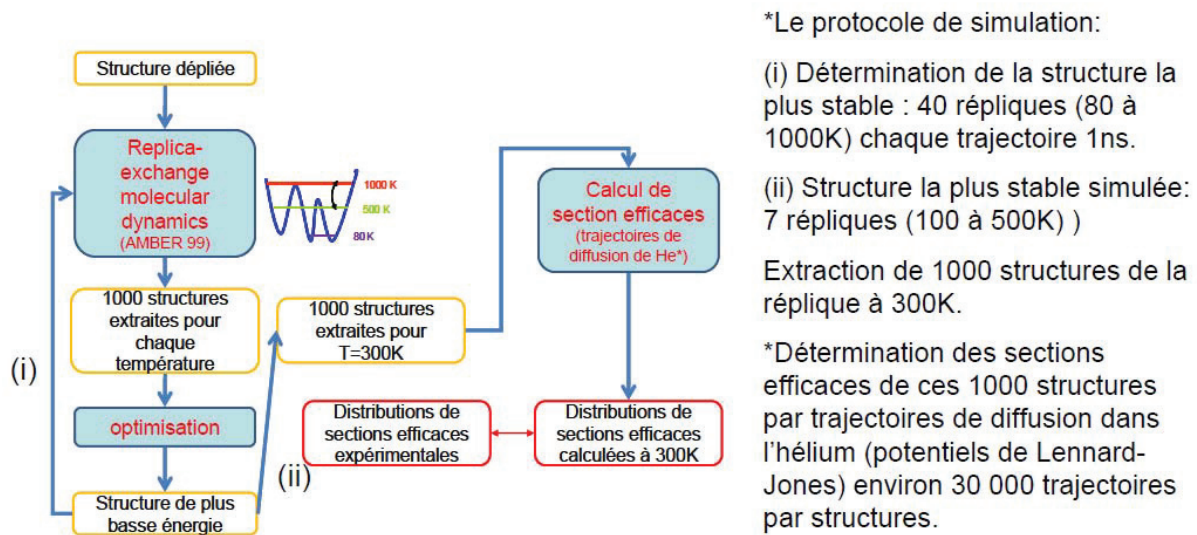


Figure 2 : Protocol du calcul.

## 2-Détermination des sections efficaces de diffusion :

Dés lors ou l'on a généré des structures il faut déterminer leur section efficace de diffusion. Pour cela on utilise un calcul de trajectoire par dynamique moléculaire en utilisant un potentiel de type Lennard-Jones (Cf. Chapitre 1). Cette méthode permet d'extraire les sections efficaces de diffusion des différentes structures. On peut donc ensuite obtenir le profil en section efficace de diffusion à la température d'interêt (300K pour notre expérience).

1. Sugita, Y. & Okamoto, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters* **314**, 141-151 (1999).
2. Berg, B. A. & Neuhaus, T. Multicanonical Algorithms for 1st Order Phase-Transitions. *Physics Letters B* **267**, 249-253 (1991).
3. Lyubartsev, A. P., Martsinovski, A. A., Shevkunov, S. V. & Vorontsovveliyaminov, P. N. New Approach to Monte-Carlo Calculation of the Free-Energy - Method of Expanded Ensembles. *Journal of Chemical Physics* **96**, 1776-1783 (1992).
4. Marinari, E. & Parisi, G. Simulated Tempering - a New Monte-Carlo Scheme. *Europhysics Letters* **19**, 451-458 (1992).
5. Ferrenberg, A. M. & Swendsen, R. H. Optimized Monte-Carlo Data-Analysis. *Physical Review Letters* **63**, 1195-1198 (1989).
6. Kumar, S., Bouzida, D., Swendsen, R. H., Kollman, P. A. & Rosenberg, J. M. The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules .1. The Method. *Journal of Computational Chemistry* **13**, 1011-1021 (1992).

# **Chapitre 4 :**

## **Etude de l'influence de la séquence sur la stabilisation de la structure secondaire d'un peptide**

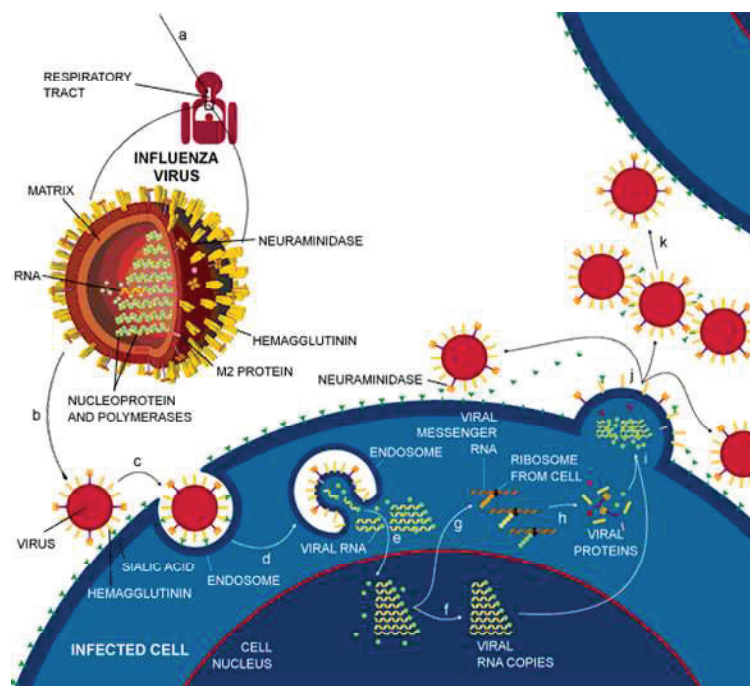
I.	Introduction :	94
II.	Systèmes étudiés :	96
III.	Résultats préliminaires obtenus par ECD :	97
1.	Dispositif expérimental :	97
2.	Principe de l'ECD :	97
3.	Résultats :	98
IV.	Résultats de mobilité ionique :	100
1.	Protocole expérimentaux et théorique :	100
2.	Résultats expérimentaux:	100
3.	Résultats des simulations REMD :	104
V.	Discussion :	107
1.	Comparaison des calculs avec les expériences :	107
2.	Forme des profils expérimentaux de section efficace :	112
3.	ECD vs mobilité ionique :	114
VI.	Conclusion :	115



## I. Introduction :

Nous allons dans ce chapitre étudier un peptide appartenant à la partie transmembranaire de la protéine M2 du virus de la grippe A<sup>1,2</sup>. In vivo la protéine M2 est impliquée dans un canal à protons<sup>3,4</sup> situé dans la partie transmembranaire du virus. Ce canal ionique est composé d'un tétramère de la protéine M2<sup>5</sup>. L'intérêt d'étudier cette protéine est double.

C'est une protéine d'enveloppe qui joue donc un rôle important dans le processus de reconnaissance du virus par les anticorps de l'hôte (bien que cette dernière soit minoritaire en comparaison des autres protéines d'enveloppe tel que l'hémagglutinine et la neuraminidase). Le canal à protons est vital pour la réplication du virus (Cf. Fig I-1). En effet, une fois la particule virale dans le cytoplasme de la cellule hôte, l'ARN viral doit être libéré dans le milieu intracellulaire afin d'être traduit et transcrit grâce à la machinerie cellulaire de l'hôte. La protéine M2 va permettre le passage de protons à l'intérieur de la particule virale et ainsi diminuer son pH. Ceci a pour effet la fusion des membranes virales et de celle de l'endosome et permet la libération de l'ARN dans la cellule hôte.

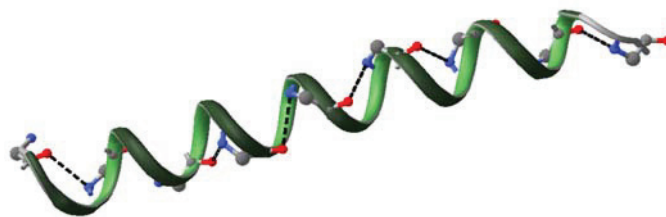


**Figure I-1 : Schéma de réplique du virus : a) infection, b) attachement du virus à la membrane cellulaire de l'hôte, c) endocytose : entrée du virus dans la cellule hôte, d) transfert de proton via la protéine M2, fusion de la membrane virale, e) importation dans le noyau du génome viral, f) réplication, g) transcription, h) traduction.**

Différents médicaments ont été développés pour inhiber cette protéine, comme l'Amantadine et la Rimantadine qui agissent sur la porte<sup>6-8</sup> du canal à protons (H16 et W20). Cette porte

activée (par un changement de conformation des hélices) permet de réguler le débit au sein du virus. En inhibant le canal ionique du virus<sup>9</sup> les médicaments permettent d'éviter la réplication ce qui limite l'infection. Cependant des observations ont mis en évidence que des mutations au sein de la protéine M2 rendaient les traitements cités inefficaces<sup>10</sup>. Ce qui suggère que ces mutations peuvent affecter la stabilité de la structure de la protéine.

Des études en RMN ont suggéré, pour le peptide auquel nous nous sommes intéressés, une structure hélicoïdale (PDB<sup>11</sup>:1NY) avec un pas d'hélice d'environ 3.6 acides aminés et un nombre de 5 boucles (Cf. Fig. I-2).



**Figure I-2 : Structure du monomère M2TMP déterminée par RMN liquide et solide (PDB<sup>11</sup> : 1NY).**

Le second intérêt de cette étude est, comme nous le verrons dans les résultats de ce chapitre, que ce peptide constitue un excellent modèle de système bistable avec une compétition entre structure en hélice et structure en globule. Il peut donc être utilisé pour étudier la compétition entre ces deux structures ainsi que l'influence de la structure sur d'autres propriétés physico-chimiques du peptide. Nous nous sommes intéressés à la stabilité de la structure en hélice du monomère par rapport à des mutations de séquence. Nous présenterons d'abord quelques résultats<sup>12</sup> obtenus sur ces mutants par spectrométrie de masse couplée à la capture d'électron dissociative<sup>13,14</sup> (ECD) au laboratoire de spectrométrie de masse biomoléculaire de l'EPFL (groupe de Yury Tsybin). Les résultats obtenus par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse comparés à des calculs de dynamique moléculaire couplée à l'échange de réplique (REMD) seront présentés.

Nous discuterons des structures obtenues par le calcul avec les résultats expérimentaux. Puis nous parlerons du fait que les structures observées peuvent s'être dépliées durant leur diffusion dans le tube de mobilité ionique. Enfin, nous essaierons de corrélérer les résultats obtenus par mobilité ionique avec les résultats de fragmentation obtenus par ECD. L'étude de l'influence de la structure secondaire d'un peptide sur sa fragmentation était l'une des motivations de ce travail, les résultats qui avaient été obtenus en ECD sont présentés au début de ce chapitre.

## II. Systèmes étudiés :

Les différents variants étudiés ainsi que le peptide naturel (wild type) sont présentés dans le tableau 1. Ils ont été obtenus par synthèse peptidique (FMOC). Un travail important de synthèse a été mis en œuvre dû à la grande taille du système (25 acides aminés). Dans la plupart des cas un seul acide aminé a été muté (sauf pour le dernier peptide où deux acides aminés ont été mutés). Ces mutations permettent de modifier (i) la position des sites basiques, (ii) la flexibilité de la chaîne et (iii) de substituer des sites acides par des sites basiques.

<b>S-S-D-P-L-V-V-A-A-S-I-I-G-I-L-H-L-I-L-W-I-L-D-R-L</b>	Wild type
<b>S-S-D-P-L-V-V-A-A-S-I-I-L-I-L-H-L-I-L-W-I-L-D-R-L</b>	L@G13
<b>S-S-D-P-L-V-G-A-A-S-I-I-G-I-L-H-L-I-L-W-I-L-D-R-L</b>	G@V7
<b>S-S-D-P-L-V-V-A-A-S-I-I-G-I-L-G-L-I-L-W-I-L-D-R-L</b>	G@H16
<b>S-S-R-P-L-V-V-A-A-S-I-I-G-I-L-H-L-I-L-W-I-L-D-R-L</b>	R@D3
<b>S-S-D-P-L-A-V-A-A-S-I-I-G-I-L-H-L-I-L-W-I-L-D-R-L</b>	A@V6
<b>S-S-D-P-L-V-V-A-A-N-I-I-G-I-L-H-L-I-L-W-I-L-D-R-L</b>	N@S10
<b>S-S-N-P-L-V-V-A-A-S-I-I-G-I-L-H-L-I-L-W-I-L-D-R-L</b>	N@D3
<b>S-S-R-P-L-V-V-A-A-S-I-I-G-I-L-G-L-I-L-W-I-L-D-R-L</b>	R@D3 et G@H16

Tableau 1 : Séquences et noms des peptides étudiés.

### III. Résultats préliminaires obtenus par ECD :

#### 1. Dispositif expérimental :

L'expérience est présentée figure III-1. Cette expérience<sup>12</sup> se trouve au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biomoléculaire (LSMB) à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL). Elle est constituée d'une source electrospray, d'optiques de transfert, d'un piège quadripolaire linéaire (LTQ) et d'une cellule à résonance cyclotronique (ICR). L'aimant supraconducteur utilisé permet d'atteindre un champ magnétique de 12T.

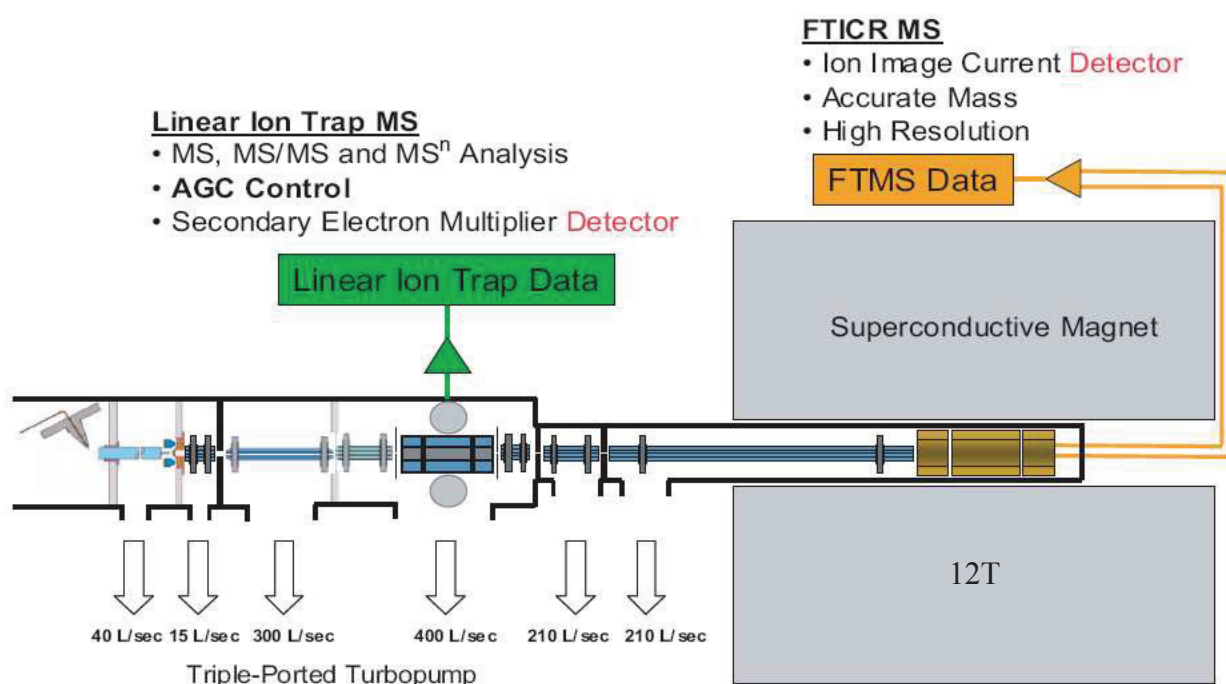


Figure III-1 : Schéma de l'expérience LTQ-FTICR.

#### 2. Principe de l'ECD :

Il est possible sur cette expérience d'injecter des électrons dans la cellule ICR pour faire des expériences d'ECD. Le mécanisme de fragmentation est présenté sur la figure III-2.

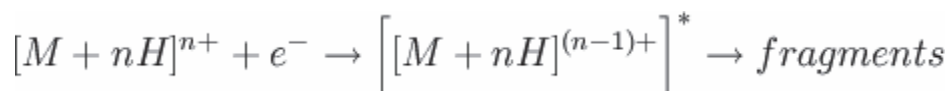


Figure III-2 : Schéma de fragmentation par ECD.

Le bombardement avec des électrons lents (3eV) permet la capture d'électron par l'ion. L'ion formé après capture a un nombre impair d'électrons ce qui crée un ion radicalaire peu stable. Cet ion radicalaire va se fragmenter par recombinaison. Cette technique permet de fragmenter de manière spécifique les ions<sup>13,14</sup> puisque le mécanisme mis en jeu est dit non-ergodique. C'est-à-dire que l'énergie apportée par la recombinaison n'est pas redistribuée sur l'ensemble de la molécule et conduit à une fragmentation non statistique. Les fragments c et z sont majoritaires en ECD sur des peptides ou des protéines. En effet le mécanisme de fragmentation agit sur la liaison N-C $\alpha$ .

### 3. Résultats :

Les mesures en ECD ont été faites sur l'état de charge +3. Les spectres de masse obtenus après fragmentation du peptide naturel sont présentés dans la figure III-3.

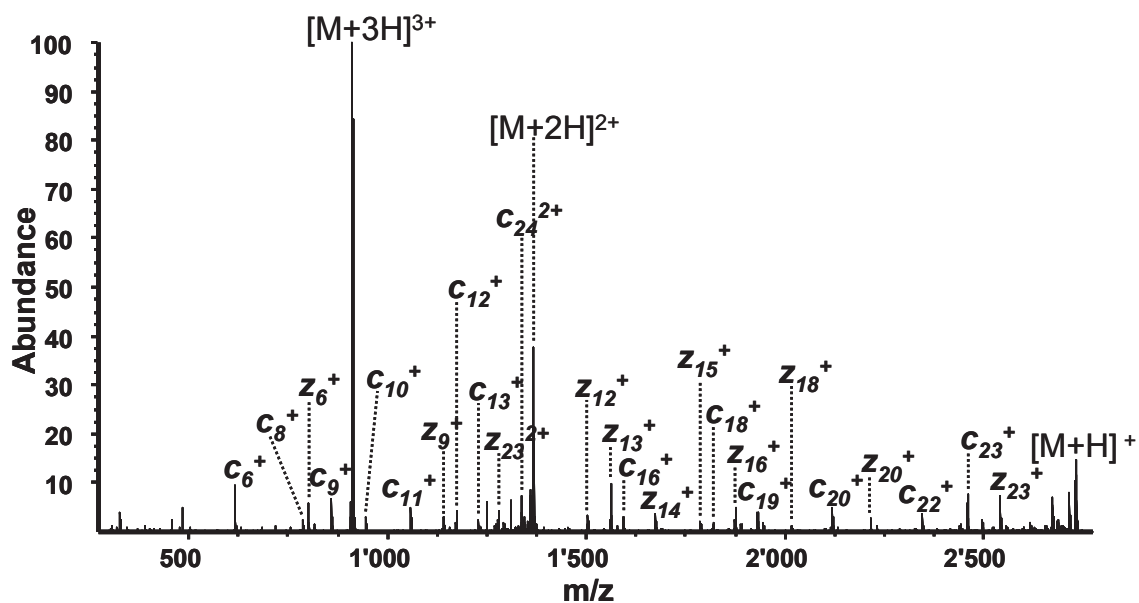


Figure III-3 : Spectre de masse obtenu par fragmentation ECD de l'ion précurseur [M+3H]<sup>3+</sup> pour le peptide naturel (wild type).

Comme nous l'avons dit précédemment, les ions produits par ECD sont de types c et z. Les résultats sont traités de la manière suivante : l'intensité relative des ions c et z pour chaque résidu est calculée par rapport à l'ion parent. Ces résultats sont tracés sous forme d'histogrammes. Des profils de fragmentations différents sont observés selon les mutations réalisées. Ceci peut être soit dû au fait que la mutation induit une différence de structure et donc un schéma de fragmentation différent, ou alors que la nature des acides aminés mutés

intervient directement sur les profils de fragmentations. La figure III-4 présente deux profils de fragmentation correspondants au peptide naturel et au variant G@H16. Les autres profils de fragmentation sont présentés annexe III.

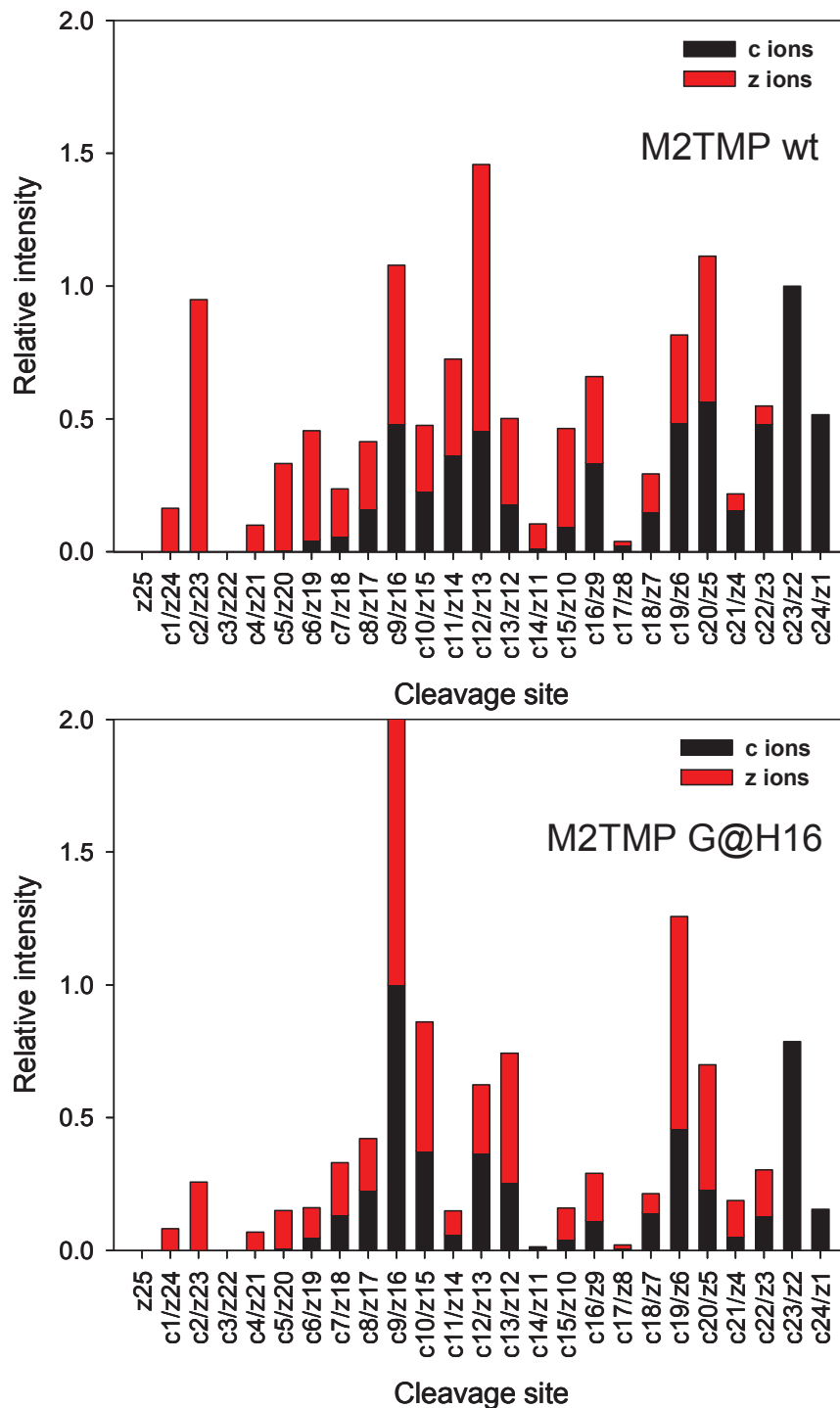


Figure III-4 : profils de fragmentation par ECD sur l'ion parent  $[M+3H]^{3+}$  pour le peptide naturel et le peptide G@H16.

On remarque bien deux profils de fragmentation différents. Dans cet exemple le variant G@H16 induit un changement de la localisation de la charge. En effet un acide aminé basique est substitué par un acide aminé non basique.

## **IV. Résultats de mobilité ionique :**

### **1. Protocole expérimentaux et théorique :**

Les outils utilisés dans ce chapitre IM-MS et REMD sont les mêmes que dans le chapitre III. Après leurs synthèses les différents peptides ont été stockés dans des solutions à 1mM dans l'eau. Les solutions utilisées pour les analyses par IM-MS sont à 100µM dans 50/50 eau méthanol avec 0.1% d'acide acétique.

Les calculs REMD permettent d'obtenir une distribution en section efficace de diffusion théorique. Il y a des différences avec l'étude sur les polyalanines et polyglycines sur la comparaison entre les sections efficaces de diffusion théorique et expérimentale. Dans le chapitre II nous avons vu les limites de notre méthode. En effet, le potentiel utilisé (AMBER 99) reproduit mal les interactions telles que ion/dipôle, effets coopératifs, et effets longue distance. Ceci sera encore plus vrai pour des systèmes de grandes tailles triplement chargés. Cependant la taille des systèmes (25 acides aminés) ne rend pas envisageable l'utilisation champs de forces polarisables implémentés dans certains codes tels que Tinker (Amoeba) ou MDVRY (polarisation de Thole).

### **2. Résultats expérimentaux:**

Le peptide naturel ainsi que les huit variants synthétisés ont été analysés par IM-MS. Des calibrations (comme décrites dans le chapitre I) ont été faites (de 7.7V/cm à 3.7V/cm avec un pas de 0.5V/cm) pour chacune des espèces afin de remonter directement à la section efficace de diffusion. La Figure IV-1 présente quelques exemples de spectres de masse obtenus. Différents états de charge sont visibles, le 2+, 3+ et 4+ qui constituent les pics majoritaires.

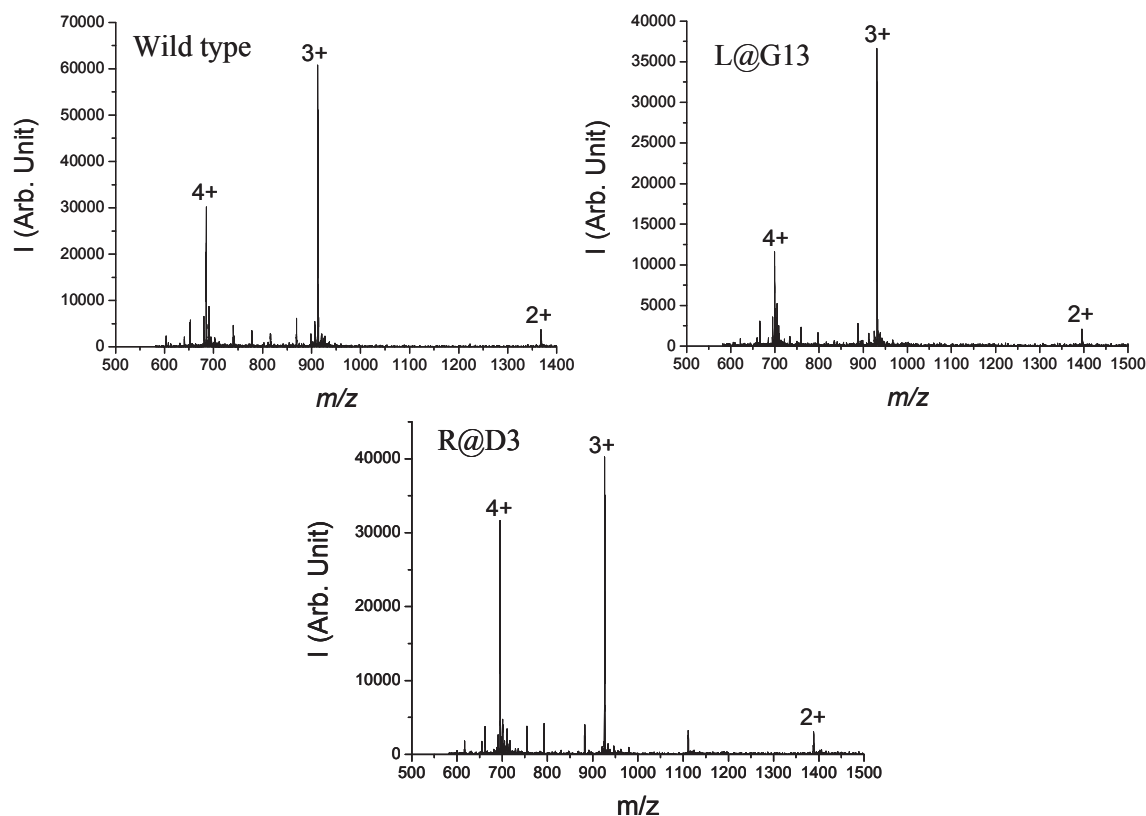
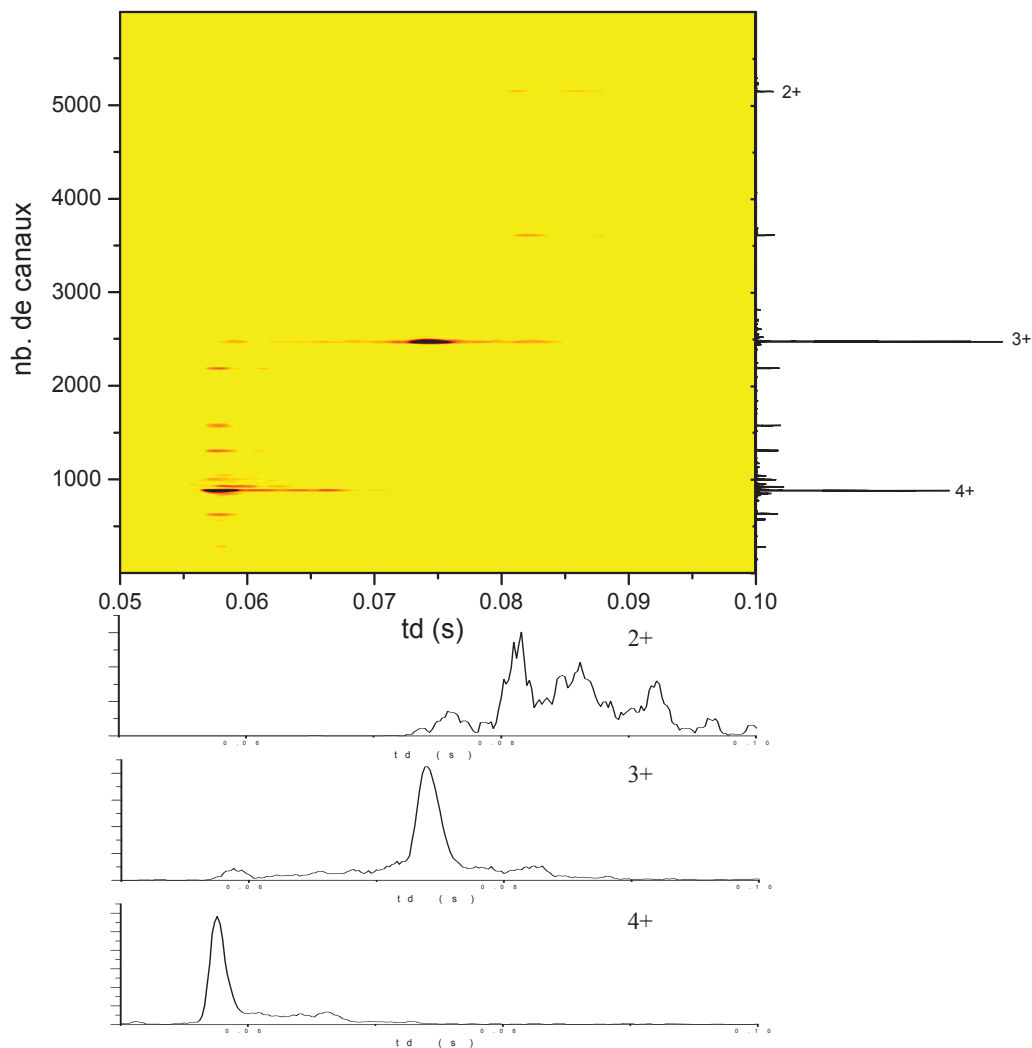


Figure IV-1 : Spectres de masse du peptide naturel et de deux variants.

D'autres pics minoritaires dus aux produits de réactions secondaires de la synthèse peptidique sont également visibles. Le peptide naturel comporte trois fonctions basiques qui sont des sites de protonation possibles : la fonction amine du N-terminale ainsi que les résidus H16 et R24. Pour les autres variants les sites basiques sont les mêmes sauf pour R@D3 où il y a un site basique supplémentaire (R3). Pour G@H16 il y a un site basique (H16) en moins. La figure IV-2 présente une carte 2D-IM-MS de R@G3 avec les projections de temps de diffusion des ions 2+,3+ et 4+. Les expériences présentées ont été réalisées pour des conditions de tube de : 273K, 7.7V/cm, 12Torr d'Hélium.





**Figure IV-2 : Carte 2D IM-MS du variant R@D3. En ordonnées est représenté le spectre de masse (en nombre de canaux, proportionnels aux temps de vol), en abscisses le profil en temps de diffusion en seconde.**

Nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'état de charge +3 : d'une part c'est celui qui a été utilisé dans les expériences d'ECD et d'autre part c'est celui qui correspond aux pics les plus intenses. De plus pour les calculs il y a moins d'ambiguïtés que sur l'état de charge +2 pour placer les charges. Pour l'état de charge 4+ la répulsion contraint trop le peptide pour faire des observations sur les changements de structure induit par les mutations. Pour l'état de charge +2 le signal est trop faible.

La figure IV-3 présente les profils en section efficace de diffusion pour le peptide naturel et les huit variants.

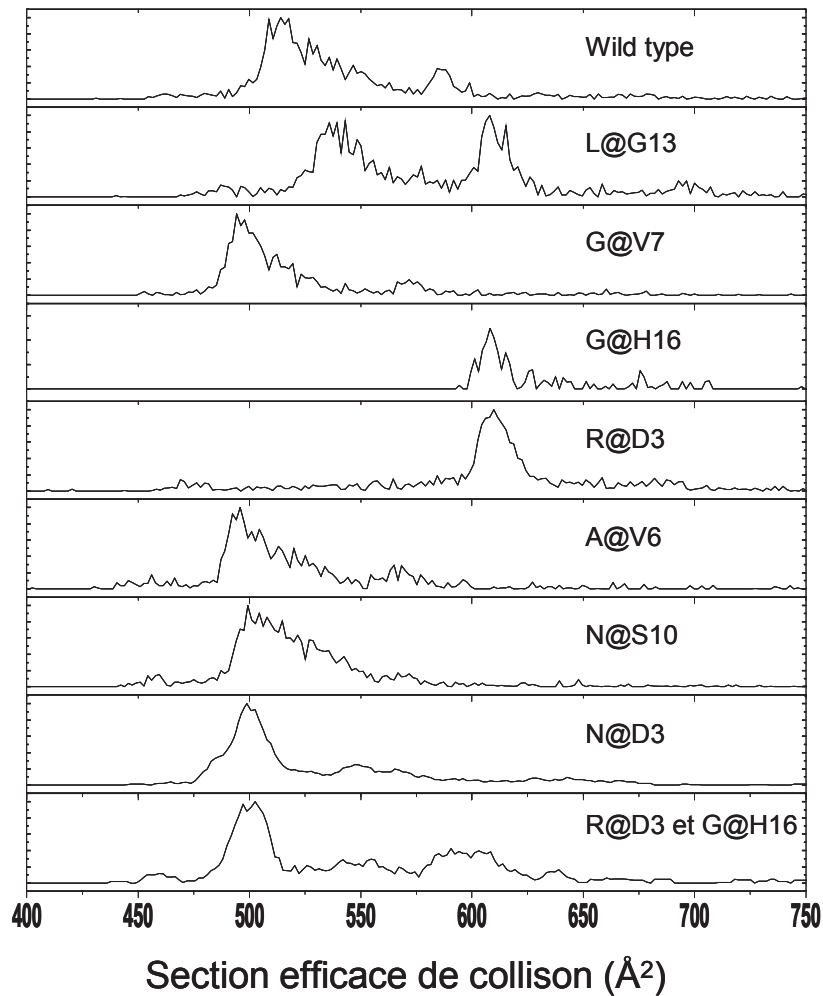


Figure IV-3 : Profils de section efficace de diffusion pour le peptide naturel et les variants.

Les profils obtenus montrent que la mutation d'un acide aminé peut induire des changements importants dans les profils de section efficace. Deux séries de pics ressortent de cette figure. Aux alentours de  $500 \text{ \AA}^2$  on observe un profil asymétrique et particulièrement large (Cf. fin du chapitre). A environ  $600 \text{ \AA}^2$  on observe un profil symétrique et assez fin.

Les différents variants peuvent être rangés en trois familles en fonction des profils observés :

- G@V7 et N@S10, seul le profil aux alentours de  $500 \text{ \AA}^2$  est observé.
- G@H16 et R@D3, seul le profil aux alentours de  $600 \text{ \AA}^2$  est observé.
- Les autres peptides présentent les deux pics plus ou moins peuplés. En particulier le peptide L@G13 présente une distribution bimodale équilibrée.

### 3. Résultats des simulations REMD :

Les calculs REMD ont été réalisés sur le peptide naturel et les quatre premiers variants (L@G13, G@V7, G@H16, R@D3). Pour les deux premiers (L@G13 et G@V7) les charges ont été placées sur le N-terminale, l'arginine et l'histidine. Pour G@H16 les deux premières charges sont localisées aux mêmes endroits que précédemment et la troisième charge est portée par la proline. Enfin pour R@D3 deux cas ont été simulés : dans les deux cas les deux arginines sont protonées, dans le premier c'est le N-terminale qui est chargé, dans le second c'est l'histidine.

La figure IV-4 montre les profils calculés pour les différents variants. On remarque qu'il y a quatre familles de sections efficaces différentes. Vers  $615 \text{ \AA}^2$  pour le peptide naturel et R@D3 (RHR), vers  $560 \text{ \AA}^2$  pour L@G13 et G@V7, vers  $540 \text{ \AA}^2$  pour R@D3 (N-terRR) et vers  $500 \text{ \AA}^2$  pour G@H16. De manière générale, la correspondance entre calculs versus expériences pour un peptide donné n'est pas satisfaisante. Par contre les calculs fournissent des repères en section efficace qui permettent d'assigner un type de structure aux deux familles déterminées expérimentalement. En effet on trouve des structures vers  $500 \text{ \AA}^2$  et vers  $600 \text{ \AA}^2$  comme observées expérimentalement (Cf. Fig. IV-3).

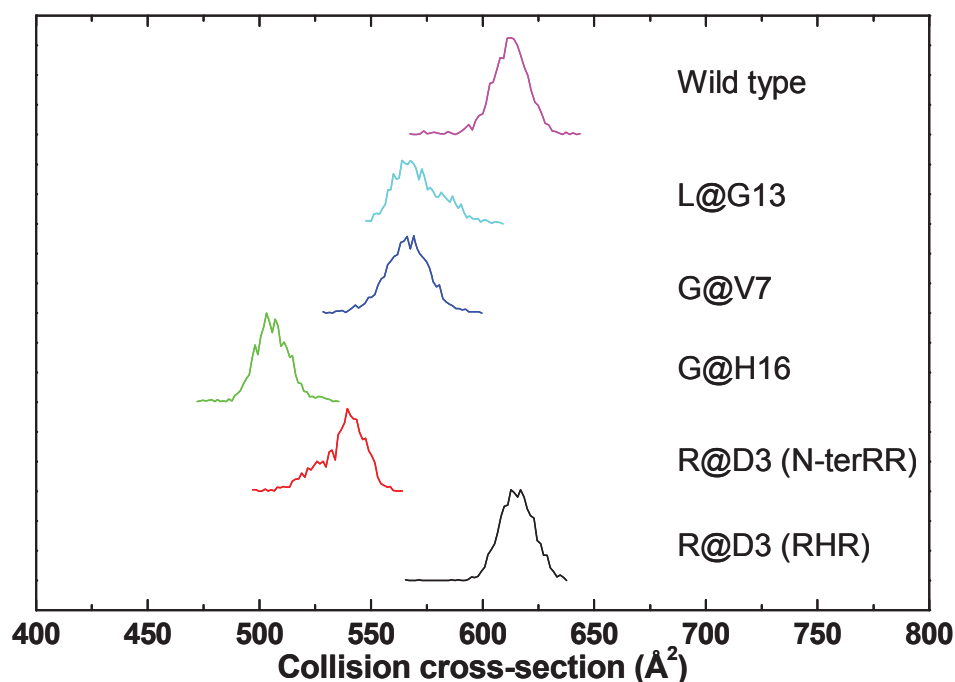
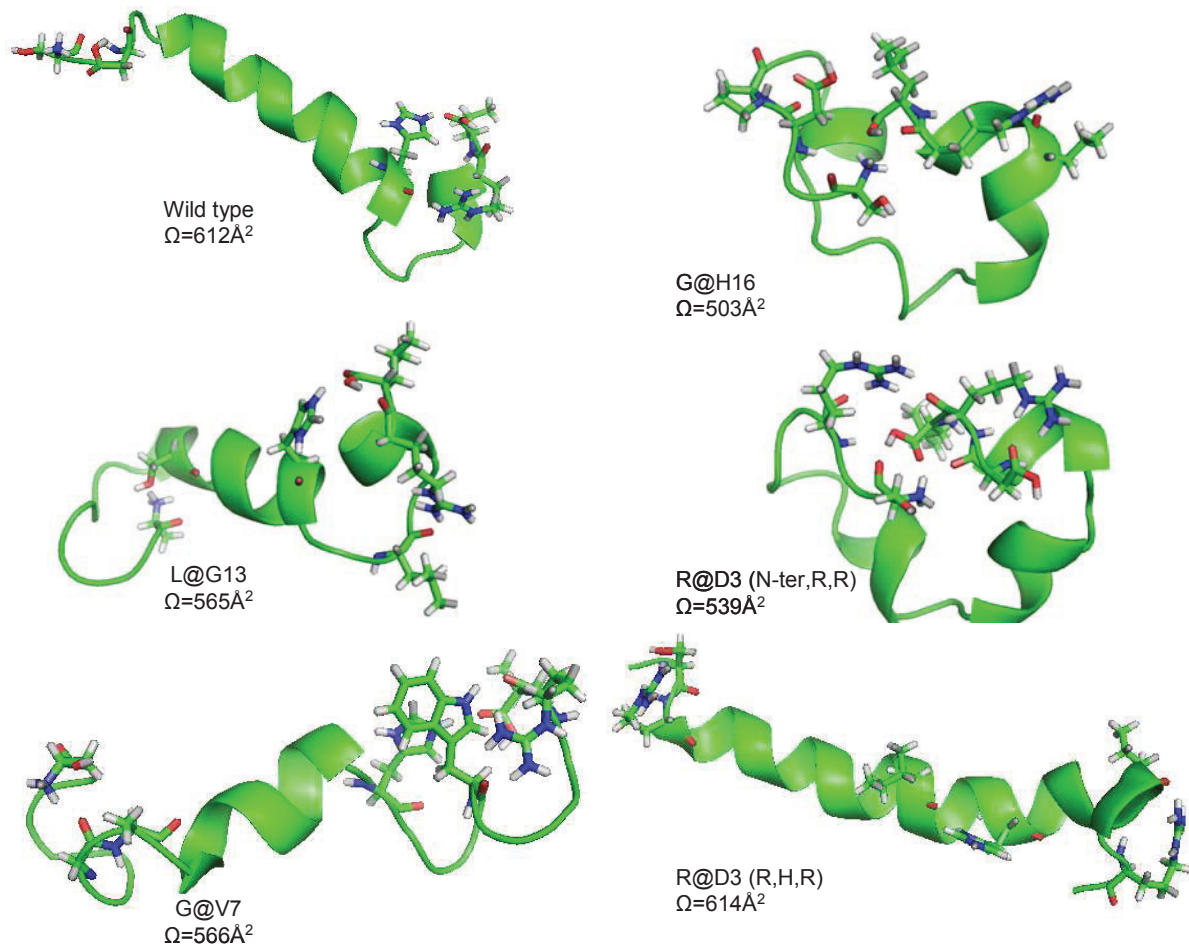


Figure IV-4 : Profils calculés par REMD pour le peptide naturel ainsi que quatre variants.

Les structures correspondantes aux profils calculés sont présentées sur la figure IV-5. Les sections efficaces les plus élevées sont obtenues lorsque le peptide est en hélice- $\alpha$  sur une large part de sa séquence. Les plus faibles correspondent à des structures globulaires. En ce qui concerne les structures intermédiaires, elles comportent des portions en hélice- $\alpha$  et repliées sur les extrémités. Plus la proportion d'hélice est élevée plus la section efficace est élevée.



**Figure IV-5 : Structures tridimensionnelles les plus stables à 300K pour le peptide naturel et pour les différents variants.**

Si on regarde en détails ces structures, nous pouvons observer les facteurs stabilisants la structure secondaire de chaque peptide dans ces calculs.

Pour le peptide naturel, la section efficace calculée est de  $612 \text{ \AA}^2$  alors qu'expérimentalement le profil est centré à  $515 \text{ \AA}^2$ . Pour ce dernier la structure calculée est de type hélice avec l'extrémité N-terminale plutôt globulaire et un repliement de l'hélice en C-terminale. La structure calculée est expliquée par la solvation des trois charges. La charge portée par le N-

terminale est solvatée par la fonction carboxylique de l'acide aspartique (D3), l'histidine est solvatée par la fonction carboxylique du C-terminale et l'arginine est solvatée par le carbonyle de l'histidine.

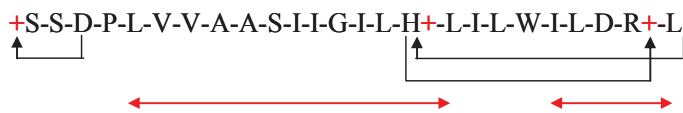
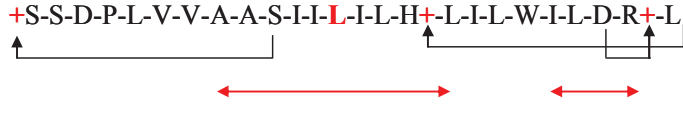
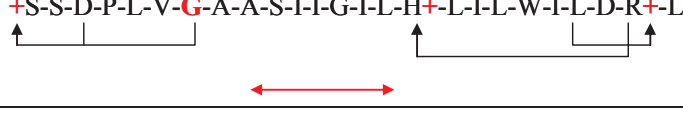
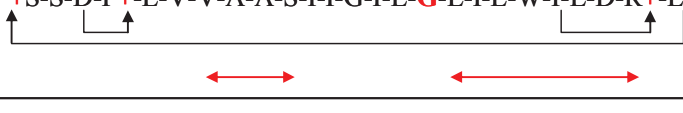

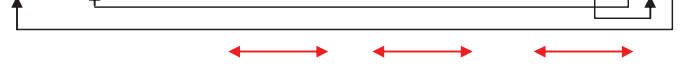
Le peptide L@G13 a une section efficace calculée de  $565 \text{ \AA}^2$  alors qu'expérimentalement on mesure une distribution bimodale de part et d'autre de cette valeur ( $540$  et  $600 \text{ \AA}^2$ ). La partie hélicoïdale calculée est plus courte que celle obtenue pour le peptide naturel. La solvation de la charge portée par l'histidine est la même que précédemment. Par contre la charge portée par l'arginine est solvatée par la fonction acide carboxylique de D23 et celle du N-terminale par la fonction alcool de la serine (S10).

Pour G@V7, la structure de plus basse énergie a une section efficace de  $566 \text{ \AA}^2$ , expérimentalement le profil est centré sur une valeur de  $500 \text{ \AA}^2$ . La structure obtenue présente une faible portion d'hélice avec les cotés N et C terminaux qui sont repliés. La charge de l'histidine est solvatée par la fonction carbonyle de R24, celle du N-terminale par la fonction carbonyle de G9 et la fonction acide carboxylique de D3 ; et celle portée par l'arginine est solvatée par la fonction carbonyle de L22.

Pour le peptide G@H16, les calculs proposent une structure plutôt globulaire ( $503 \text{ \AA}^2$ ) alors qu'on mesure une section efficace de  $610 \text{ \AA}^2$  correspondant à une hélice. Pour les calculs, la charge présente sur H16 a été placée sur la proline (P4). La localisation des charges est très importante puisque c'est un facteur déterminant sur la structure obtenue. Dans ce cas on a une solvation de la charge portée par le N-terminale par la fonction carboxylique du C-terminale. Cette solvation rend la structure très globulaire. La charge portée par l'arginine est solvatée par le carbonyle de l'I21 et celle portée par la proline est solvatée par la fonction carboxylique de D3.

Enfin pour R@D3 deux cas ont été simulés, il semblerait qu'un des deux soit plus en accord avec l'expérience, il s'agit de la protonation RHR. Cette structure correspond à une hélice légèrement déformée en C-terminale. Pour cette structure les charges sont solvatées par des résidus qui sont proches, ce qui déforment moins la structure du peptide. En effet R3 est solvaté par la fonction alcool de S2, R24 par la fonction carbonyle d'I21 et H16 par les fonctions carbonyles d'I12 et de G13.

Ces résultats nous permettent d'observer qu'un des facteurs les plus influant sur la structure secondaire est la solvation des charges. Le tableau qui suit présente les séquences avec les parties hélicoïdales calculées, la solvation des charges ainsi que les sections efficaces mesurées et calculées.

Séquence	Nom	$\Omega$ calculée	$\Omega$ expérimentale
+S-S-D-P-L-V-V-A-A-S-I-I-G-I-L-H+-L-I-L-W-I-L-D-R+-L 	Wild type	612Å <sup>2</sup>	515Å <sup>2</sup>
+S-S-D-P-L-V-V-A-A-S-I-I-L-I-L-H+-L-I-L-W-I-L-D-R+-L 	L@G13	565Å <sup>2</sup>	520Å <sup>2</sup> et 600Å <sup>2</sup>
+S-S-D-P-L-V-G-A-A-S-I-I-G-I-L-H+-L-I-L-W-I-L-D-R+-L 	G@V7	566Å <sup>2</sup>	500Å <sup>2</sup>
+S-S-D-P+-L-V-V-A-A-S-I-I-G-I-L-G-L-I-L-W-I-L-D-R+-L 	G@H16	503Å <sup>2</sup>	610Å <sup>2</sup>
S-S-R+-P-L-V-V-A-A-S-I-I-G-I-L-H+-L-I-L-W-I-L-D-R+-L 	R@D3 (RHR)	614Å <sup>2</sup>	610Å <sup>2</sup>
+S-S-R+-P-L-V-V-A-A-S-I-I-G-I-L-H-L-I-L-W-I-L-D-R+-L 	R@D3 (N-terRR)	539Å <sup>2</sup>	610Å <sup>2</sup>

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif du peptide naturel ainsi que des variants pour lesquels les calculs ont été réalisés. Les positions des charges pour le calcul sont indiquées en rouge. Les flèches noires sous les séquences présentent les solvations de charges, les doubles flèches rouges correspondent aux parties hélicoïdales des peptides. Les deux dernières colonnes présentent respectivement les sections efficaces calculées et mesurées.**

## V. Discussion :

### 1. Comparaison des calculs avec les expériences :

Lorsque l'on veut simuler des systèmes de la taille de ces peptides (25 acides aminés) il commence à être difficile d'explorer toute la surface de potentiel correspondant au paysage conformationnel. De plus le champ de force utilisé (AMBER99) ne prend pas en compte la polarisation, les effets à longues distances ni les effets coopératifs. Ceci limite la qualité des énergies calculées. Connaissant les limitations de cette méthode, il est toutefois possible d'utiliser les résultats des calculs pour attribuer le pic à environ 500Å<sup>2</sup> à des structures globulaires et le pic à environ 600 Å<sup>2</sup> à des hélices partiellement repliées.

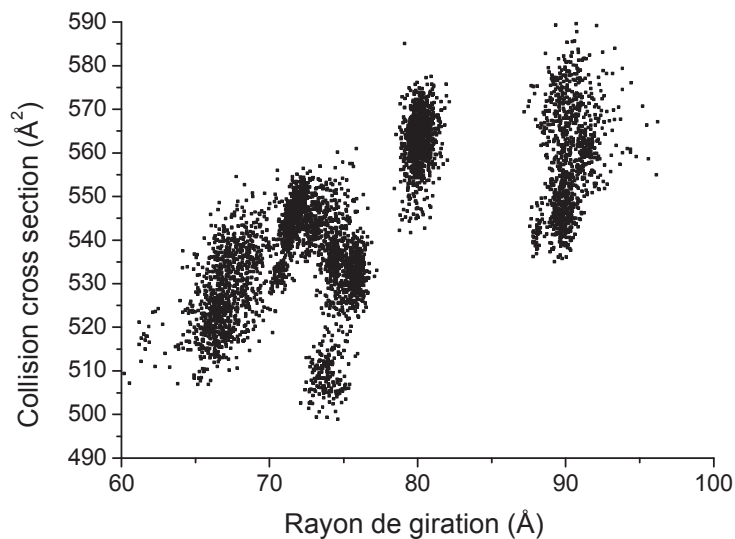
Ainsi :

-Pour G@V7 et N@S10 en phase gazeuse, on observe des structures plutôt globulaires.

-Pour G@H16 et R@D3, on observe des structures plutôt en hélices.

-Pour les autres pics, on observe une compétition entre hélices et globules.

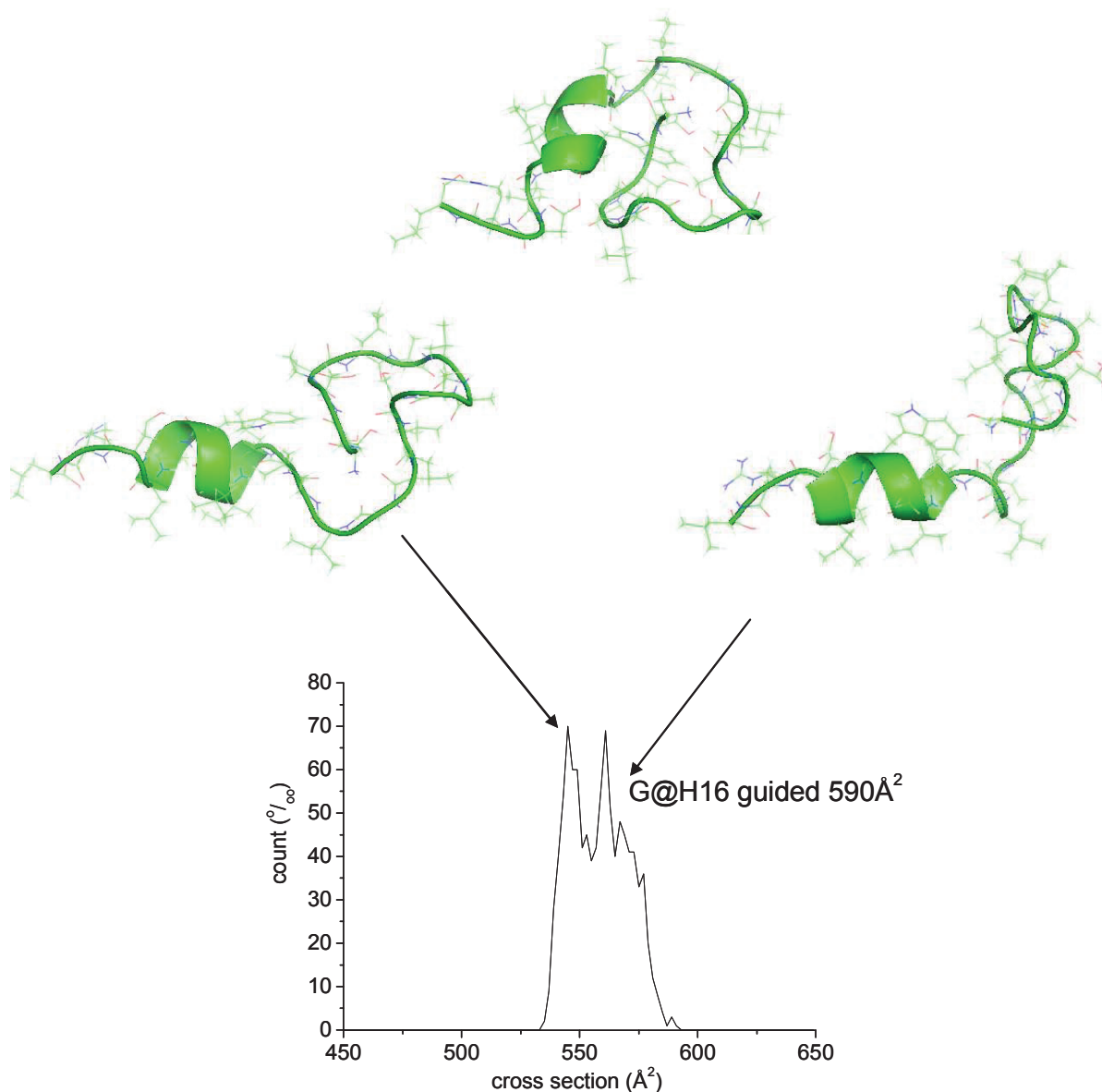
Suite aux résultats des calculs et au désaccord pour une séquence donnée entre expérience et théorie il est apparu intéressant de développer un algorithme qui permet de contraindre le système à explorer une zone qu'on lui impose et qui favorisera l'exploration des structures observées expérimentalement. Pour cela un potentiel « parapluie»<sup>15</sup> (Umbrella) a été utilisé, ce dernier s'écrit sous la forme  $V_{\text{biais}}(R) = 1/2 k(R_g^2 - R_{g0}^2)^2$ . Il agit sur le rayon de giration qui est lié à la section efficace de diffusion comme représenté sur la figure V-1.



**Figure V-1 : Corrélation entre section efficace de diffusion et rayon de giration. Chaque nuage de point représente les milles configurations obtenues par les simulations guidées.**

En utilisant les résultats expérimentaux de la mobilité, on peut définir un rayon de giration « expérimentale » et l'imposer pour les simulations. Ceci peut permettre d'explorer des zones qui ne l'auraient peut être pas été avec un calcul non contraint. L'utilisation du rayon de giration pour contraindre la structure par rapport aux résultats expérimentaux a été choisie parce que le calcul de section efficace de diffusion est long à être réalisé, ce qui n'est pas compatible avec les simulations. Nous allons présenter quelques résultats préliminaires obtenus avec cette technique. Deux cas vont être présentés.

Le premier concerne le peptide G@H16 qui a une section efficace mesurée de  $610 \text{ \AA}^2$  et une section efficace calculée de  $503 \text{ \AA}^2$ . Dans ce cas on force le système à explorer les sections efficaces plus grandes. La figure V-2 présente le profil calculé en section efficace ainsi que trois structures représentatives des calculs.



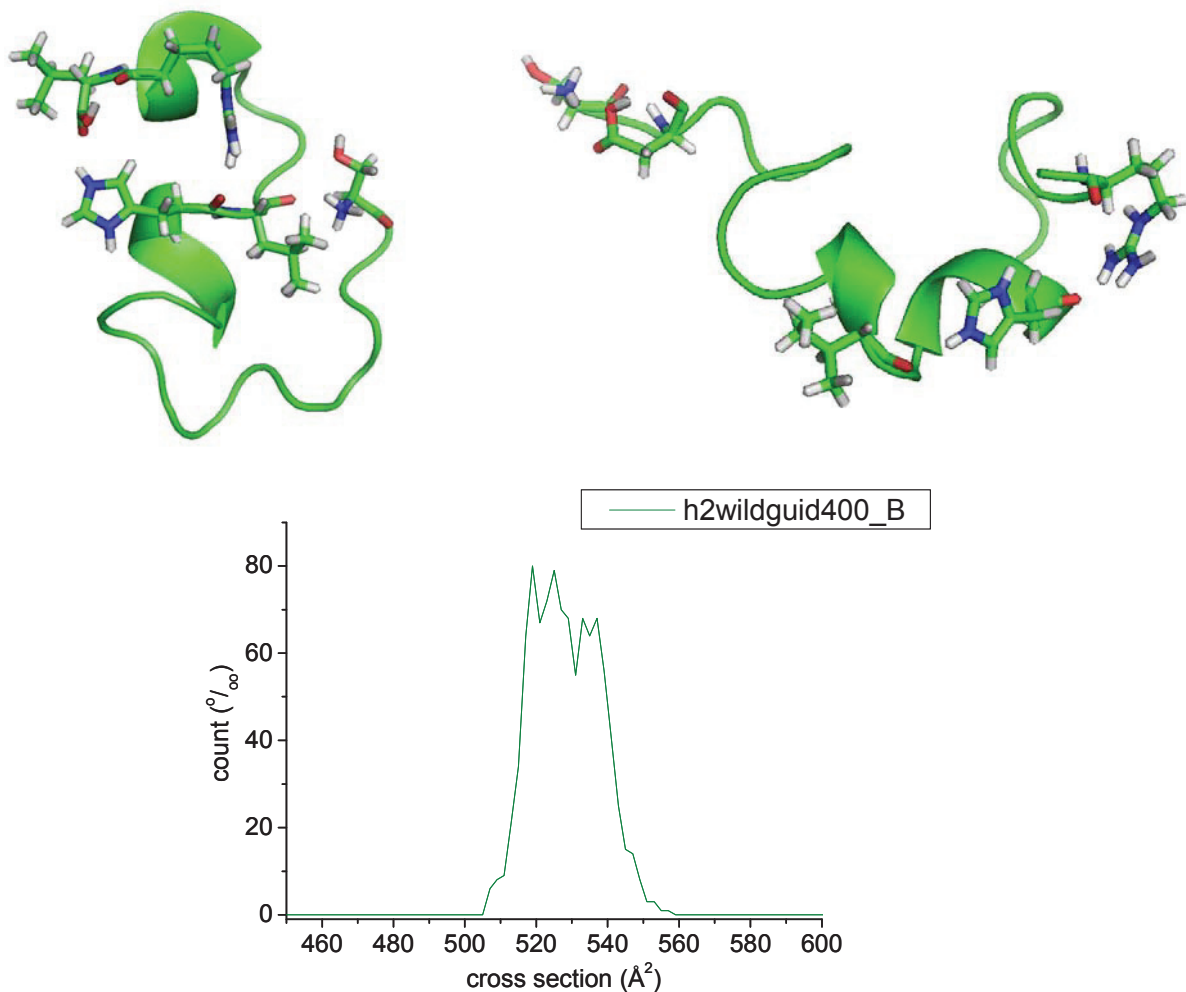
**Figure V-2 : Profil calculé pour G@H16 avec une contrainte à 590 Å<sup>2</sup>, structure la plus stable (en haut) et de part et d'autres deux structures correspondant à une section efficace faible (gauche) et élevée (droite).**

On remarque que sur ce système même si on force la simulation à explorer vers les hautes sections efficaces l'obtention d'une hélice qui correspondrait à la section efficace mesurée est difficile. Sur les différentes structures on remarque que le principal effet qui perturbe une structuration de type hélice est la solvataion de la charge en N-terminale. Il est possible que les choix de position de charges pour le calcul ne soit pas bon. On a remarqué précédemment que dans les simulations non guidées la charge portée par la proline était solvatée par la fonction carboxylique de D3, or cette même fonction carboxylique solvatait la charge portée par le N-terminale sur le peptide naturel. Il est possible que la proline ne soit pas chargée en



réalité mais que ça soit le tryptophane. De nouvelles simulations en changeant la place des charges doivent être réalisées.

Le second exemple choisi est pour le peptide naturel. C'est le cas inverse que précédemment, nous allons contraindre le rayon de giration afin d'explorer les faibles valeurs en sections efficaces. En effet la section efficace mesurée est de  $515 \text{ \AA}^2$  alors que par le calcul on obtient  $612 \text{ \AA}^2$ . La figure V-3 présente le profil de section efficace calculé ainsi que deux structures représentatives.



**Figure V-3 : Profil de section efficace de diffusion calculé pour une contrainte à  $400 \text{ \AA}^2$  et structures représentatives des simulations,  $518 \text{ \AA}^2$  pour la structure de gauche et  $540 \text{ \AA}^2$  pour la structure de droite.**

Dans ce cas on arrive à des valeurs proches de celles mesurées. Les structures présentent un autre schéma de solvatisation des charges. Pour la structure de gauche ( $518 \text{ \AA}^2$ ) la charge portée par le N-terminale est solvatée par le carbonyle d'I14, H16 par la fonction carboxyle du C-terminale et R24 par le carbonyle de H16. Seule la solvatisation du N-terminale est modifiée

mais les changements structuraux sont importants. Pour la structure de droite ( $540 \text{ \AA}^2$ ) la solvation des charges est quasiment la même que dans les simulations non guidées sauf pour H16 qui est solvatée dans ce cas par le carbonyle d'I12. La solvation de la charge n'est donc pas le seul facteur influant sur la structure tridimensionnelle des peptides. Dans cet exemple on observe que les simulations guidées sont intéressantes et permettent d'obtenir des structures qui n'avaient pas été trouvées par les calculs standards. Pour les systèmes de grande taille, dont la surface de potentielle ne peut pas être explorée efficacement, une méthode généralement utilisée consiste à générer de nombreuses structures et choisir parmi celles de plus basse énergie, celle qui correspond à la section efficace de diffusion mesurée. Nous proposons, avec les simulations guidées, une méthode alternative.

En résumé, les résultats des calculs ont permis d'identifier les deux familles observées expérimentalement : celle aux alentours de  $500 \text{ \AA}^2$  qui correspond à une structure avec une faible proportion hélicoïdale et les deux extrémités N et C-terminales qui sont globulaires et celle à  $600 \text{ \AA}^2$  qui correspond à une hélice légèrement déformée en C-terminale. Les simulations guidées ont permis d'améliorer l'accord entre expérience et théorie séquence par séquence. Pour certaine espèce comme le peptide G@H16 même en biaisant le calcul il est difficile d'obtenir une structure correspondant à l'expérience. Comme il a été dit précédemment, la localisation des charges est très importante en phase gazeuse, puisque leurs solvations est un facteur important qui influe sur la structure globale. Dans ce cas une erreur sur la localisation des charges a peut être été commise. Par contre pour le peptide naturel, les simulations guidées ont permis d'obtenir des structures qui ont des sections efficaces proches de celles observées.

Les structures observées expérimentalement tendent à montrer que la structure hélicoïdale est stabilisée lorsque l'on modifie les sites de protonation, (i) mutation d'un acide aminé basique pour G@H16 et (ii) ajout d'un acide aminé basique pour R@D3. Ces deux exemples confirment l'importance de la localisation des charges sur la stabilité d'une hélice en phase gazeuse. La répartition régulière des charges favorise les hélices <sup>16</sup>, grâce à une solvation régulière des charges par les acides aminés localisés à proximité et également grâce à la répulsion entre les charges qui favorise des structures étendues. Par exemple dans le cas de R@D3, la solvation de R24 et de H16 se fait par des groupes carbonyles de résidus se trouvant à 3 ou 4 résidus d'écart (correspondant au pas de l'hélice). En ce qui concerne R3 il est solvato par la fonction alcool de la S2. Par contre, lorsque les charges sont proches les unes des autres cela impose une solvation de ces charges par des acides aminés éloignés. Ceci est observé dans l'exemple où G@H16, en effet le N-terminale et la proline sont

proches, ainsi le N-terminale est solvaté par le C-terminale ce qui déstabilise complètement la structure.

## 2. Forme des profils expérimentaux de section efficace :

Les profils expérimentaux obtenus ont pour la majorité deux pics, sauf pour G@H16 et R@D3 qui ont clairement un profil correspondant à une structure hélicoïdale avec un seul pic. L@G13 présente une distribution bimodale équilibrée. Pour les autres variants les distributions sont moins claires mais ils ont toujours un léger pic aux alentours de 600 Å<sup>2</sup> moins peuplé que le pic principal. Ces profils ressemblent à des profils caractéristiques d'un changement de conformation durant la diffusion dans le tube de mobilité ionique. Hudgins et al.<sup>17</sup> ont déjà observés cela sur des nano-cristaux de chlorure de sodium. Pour simuler le profil, on suppose que A<sub>0</sub> ions ont initialement la structure A, B<sub>0</sub> la structure B, et qu'une partie de B se transforment en A au cours de la diffusion. Les ions se transforment avec une constante de temps k.

$$\phi(t) = \int \rho(t)g(t, t')dt' \quad \text{eq. V-1}$$

$$\rho(t) = A_0 \delta(t - L/v_A) + B_0 \delta(t - L/v_B) e^{-kt} + \int_0^t B_0 \delta\left(T - \tau - \frac{l - v_B \tau}{v_A}\right) e^{-k\tau} d\tau \quad \text{eq. V-2}$$

$$g(t, t') = \frac{v_A}{\sqrt{Dt}} e^{-(t-t')^2 v_A / 4Dt} \quad \text{eq. V-3}$$

La fonction  $\Phi(t)$  représente la distribution en temps de diffusion pour deux isomères A et B. Elle est composée de deux fonction  $\rho(t)$  et  $g(t, t')$ .  $\rho(t)$  est composée de trois termes, le premier décrit le pic de l'isomère A, le second celui de l'isomère B et le troisième le pic intermédiaire correspondant à l'échange de B en A durant la diffusion dans le tube de mobilité ionique. La fonction  $g(t, t')$  représente l'élargissement des pics dû à la diffusion. L représente la longueur du tube,  $v_a$  et  $v_b$  les vitesses de diffusions des deux isomères,  $A_0$  et  $B_0$  les intensités initiales des deux isomères, D la constante de diffusion et k la constante de vitesse d'isomérisation.

On peut estimer la constante de temps du repliement en simulant un profil et en le comparant avec le profil expérimental en utilisant l'équation 1. La figure V-4 présente la simulation et le profil expérimental sur le peptide naturel, L@G13 et G@V7. A l'état initial on suppose une

structure complètement hélicoïdale ( $A_0=0$  et  $B_0=1$ ) qui est la structure observée pour ce peptide en solution.

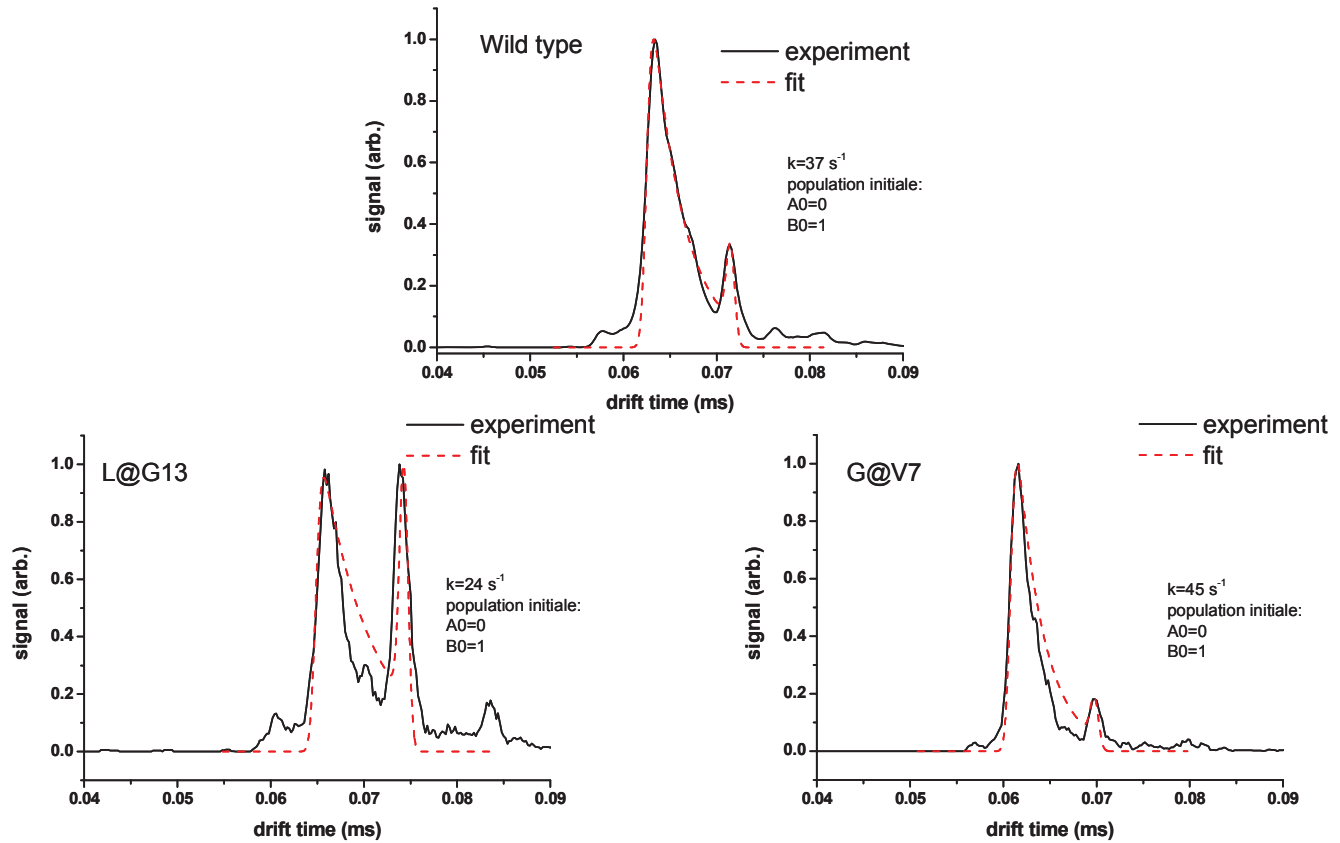


Figure V-4 : Profil expérimental en temps d'arrivé (noir) et simulation du dépliement en utilisant l'équation précédente (pointillés rouge).

Les petits pics de gauche pourraient être dus à des structures plus globulaires que A et celle de droite à des structures avec des hélices moins déformées que B. Les constantes de temps déterminées sont  $37\text{s}^{-1}$  pour le peptide naturel,  $24\text{s}^{-1}$  pour L@G13 et  $45\text{s}^{-1}$  pour G@V7. Pour le peptide L@G13 on remarque une structure intermédiaire, ceci peut être du à deux raisons. Soit le conformère existe en équilibre avec les autres formes, soit il y a une inter-conversion plus complexe où plusieurs intermédiaires entreraient en jeu. Pour pouvoir confirmer ces observations il faudrait faire des expériences en faisant varier la température. Le changement de température modifiera la valeur de  $k$  et donc la forme du profil. On espère notamment à basse température « piéger » les structures initiales et à haute température n'observer que la structure la plus stable. Ces expériences devraient être réalisées dans un futur proche puisque le développement de la thermalisation du tube est en cours. Ainsi cette hypothèse pourra être

vérifiée ou infirmée. De plus, si l'hypothèse est confirmée, l'obtention de  $k$  en fonction de la température permettra de déterminer les changements d'enthalpies et d'entropies associées à ces transformations structurelles<sup>17</sup>.

### **3. ECD vs mobilité ionique :**

De nombreuses études tentent de déterminer le mécanisme de l'ECD<sup>12,18-23</sup>. Ces études indiquent que la structure des peptides peut influencer les voies de fragmentations. Cette corrélation peut notamment s'expliquer par le fait que dans le cas de l'ECD (comme en UVPD<sup>24</sup> (Ultraviolet photodissociation) et contrairement à la CID (collision induced dissociation)) la fragmentation peut avoir lieu avant le chauffage et le dépliement du peptide. A ce jour il n'existe pas de consensus sur les mécanismes mis en jeu.

L'un des buts de cette étude était de trouver une corrélation entre les structures observées par mobilité ionique et les abondances des fragments induit par l'ECD. Typiquement deux types de structures sont observés en mobilité ionique, ainsi on pourrait s'attendre à observer des voies de fragmentation différentes suivant la structure du peptide. Sur la fig. III-3 on observe des motifs de fragmentation différents (peptide naturel et G@H16). Ces peptides diffèrent par leur géométrie mais également par la position des charges ; position qui joue un rôle majeur sur les motifs de fragmentations observés. En ce qui concerne les autres variants il est difficile d'observer une différence notable et directement reliée à la structure géométrique (l'ensemble des motifs de fragmentation est donné en Annexe II). En ECD il est difficile de décorrélérer l'effet de la charge de l'effet de la structure. Etant donné les hypothèses que nous avons émises dans la partie précédente (changement de conformation dans le tube) il est possible que les structures présentes en phase gazeuse dans l'expérience d'ECD ne soient pas les mêmes que celles observées par mobilité ionique. En effet les temps, les conditions de pression et de température ne sont pas les mêmes. Il est donc difficile de conclure de manière simple sur cette corrélation. Les études en fonction de la température en mobilité ionique permettront de déterminer s'il y a réellement un dépliement.

## **VI. Conclusion :**

Cette étude sur des systèmes amphipathiques de grandes tailles a permis d'observer les influences de mutations sur la stabilité d'une hélice trois fois chargées en phase gazeuse. Les mesures de mobilité ionique corrélées aux calculs REMD ont permis d'assigner des structures pour chacune des familles. Les structures obtenues par le calcul montrent l'influence importante de la solvation des charges sur la géométrie calculée. La méthode de calcul biaisée a permis d'observer des structures qui n'avaient pu être observées avec un calcul standard. Les profils observés suggèrent des études approfondies en fonction de la température pour vérifier s'il y a ou non dépliement au sein du tube de mobilité ionique. La corrélation avec les expériences d'ECD n'est pas aisée. Du point de vue des perspectives, on dispose ici d'un système bistable intéressant pour étudier l'influence de différents paramètres sur la stabilité relative des globules et des hélices ou étudier l'influence de la structure sur d'autres propriétés physico-chimiques.

1. Duff, K. C. & Ashley, R. H. The Transmembrane Domain of Influenza-a M2 Protein Forms Amantadine-Sensitive Proton Channels in Planar Lipid Bilayers. *Virology* **190**, 485-489 (1992).
2. Kovacs, F. A., Denny, J. K., Song, Z., Quine, J. R. & Cross, T. A. Helix tilt of the M2 transmembrane peptide from influenza A virus: An intrinsic property. *Journal of Molecular Biology* **295**, 117-125 (2000).
3. Schnell, J. R. & Chou, J. J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* **451**, 591-U12 (2008).
4. Cady, S. D., Luo, W. B., Hu, F. H. & Hong, M. Structure and Function of the Influenza A M2 Proton Channel. *Biochemistry* **48**, 7356-7364 (2009).
5. Sugrue, R. J. & Hay, A. J. Structural Characteristics of the M2 Protein of Influenza-a Viruses - Evidence That It Forms a Tetrameric Channel. *Virology* **180**, 617-624 (1991).
6. Okada, A., Miura, T. & Takeuchi, H. Protonation of histidine and histidine-tryptophan interaction in the activation of the M2 ion channel from influenza A virus. *Biochemistry* **40**, 6053-6060 (2001).
7. Tang, Y. J., Zaitseva, F., Lamb, R. A. & Pinto, L. H. The gate of the influenza virus M-2 proton channel is formed by a single tryptophan residue. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 39880-39886 (2002).
8. Zhong, Q. F. et al. The M2 channel of influenza A virus: a molecular dynamics study. *Febs Letters* **434**, 265-271 (1998).
9. Cady, S. D. & Hong, M. Amantadine-induced conformational and dynamical changes of the influenza M2 transmembrane proton channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 1483-1488 (2008).
10. Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. Influenza-Virus M2 Protein Has Ion Channel Activity. *Cell* **69**, 517-528 (1992).
11. Berman, H. M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242 (2000).
12. Ben Hamidane, H. et al. Periodic Sequence Distribution of Product Ion Abundances in Electron Capture Dissociation of Amphipathic Peptides and Proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20**, 1182-1192 (2009).
13. Zubarev, R. A., Kelleher, N. L. & McLafferty, F. W. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 3265-3266 (1998).
14. Zubarev, R. A. Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase. *Mass Spectrometry Reviews* **22**, 57-77 (2003).
15. Torrie, G. M. & Valleau, J. P. Non-Physical Sampling Distributions in Monte-Carlo Free-Energy Estimation - Umbrella Sampling. *Journal of Computational Physics* **23**, 187-199 (1977).
16. Clemmer, D. E., Hudgins, R. R. & Jarrold, M. F. Naked Protein Conformations - Cytochrome-C in the Gas-Phase. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 10141-10142 (1995).
17. Hudgins, R. R., Dugourd, P., Tenenbaum, J. M. & Jarrold, M. F. Structural transitions in sodium chloride nanocrystals. *Physical Review Letters* **78**, 4213-4216 (1997).
18. Cooper, H. J., Hakansson, K. & Marshall, A. G. The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis. *Mass Spectrometry Reviews* **24**, 201-222 (2005).
19. Frison, G. et al. Structure of Electron-Capture Dissociation Fragments from Charge-Tagged Peptides Probed by Tunable Infrared Multiple Photon Dissociation. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 14916-+ (2008).

20. Zubarev, R. A., Haselmann, K. F., Budnik, B., Kjeldsen, F. & Jensen, F. Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation: a historical perspective and modern ideas. *European Journal of Mass Spectrometry* **8**, 337-349 (2002).
21. Turecek, F. N-C-alpha bond dissociation energies and kinetics in amide and peptide radicals. Is the dissociation a non-ergodic process? *Journal of the American Chemical Society* **125**, 5954-5963 (2003).
22. Breuker, K., Oh, H. B., Lin, C., Carpenter, B. K. & McLafferty, F. W. Nonergodic and conformational control of the electron capture dissociation of protein cations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14011-14016 (2004).
23. Sohn, C. H. et al. Probing the Mechanism of Electron Capture and Electron Transfer Dissociation Using Tags with Variable Electron Affinity. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 5444-5459 (2009).
24. Antoine, R. et al. Comparison of the fragmentation pattern induced by collisions, laser excitation and electron capture. Influence of the initial excitation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**, 1648-1652 (2006).





# Chapitre 5 :

## Conformation des protéines en phase gazeuse

I.	Introduction : .....	120
II.	Structure des protéines en phase gazeuse : .....	122
1.	Structure en fonction de l'état de charge et de la solution : .....	122
2.	ESI vs ESSI : .....	124
III.	Lysozyme, dépliement et repliement .....	128
1.	Réversibilité du processus de dénaturation réduction et renaturation oxydation du lysozyme : .....	131
a.	Protocole de réduction.....	131
b.	Protocole d'oxydation : .....	134
2.	Cyanilation des groupements sulfhydriles après réduction totale : .....	135
3.	Piégeages des intermédiaires de réduction : .....	137
4.	Perspectives : .....	139
IV.	Conclusion : .....	140

## I. Introduction :

La structure tridimensionnelle d'une protéine est directement reliée à sa fonction. Les protéines sont synthétisées *in vivo* de manière linéaire par le ribosome (par traduction de l'ARN, qui lui-même provient de l'ADN par transcription). Leur repliement est donc une étape clef pour qu'elles deviennent fonctionnelles. Ce repliement fait intervenir différents mécanismes, tels que l'effondrement hydrophobes, la formation rapide de structures secondaires puis l'organisation globale de la structure tridimensionnelle. Il peut y avoir au cours du repliement la formation d'intermédiaires précoces tel que le globule fondu<sup>1</sup>. Si ce processus ne se fait pas correctement il peut induire des maladies, comme les maladies à prion (Diabète, Creutzfeldt Jakob) ou amyloïde (Alzheimer) par exemple.

La compréhension des mécanismes de repliement est une question très ancienne en biochimie. Les premières études sur le repliement des protéines datent de 1930, Anson<sup>2</sup> et Wu<sup>3</sup> ont étudié le processus de dénaturation et ont pu observer que ce processus était réversible pour la plupart des protéines à l'exception de celles comportant des ponts disulfures. Des études sur les interactions non covalentes au sein de la protéine et avec le solvant ont permis d'observer qu'elles se replient de telle sorte que les résidus hydrophobes se trouvent dans le cœur de la protéine, c'est-à-dire sans contact avec le solvant<sup>4</sup>. Cela a permis d'émettre le postulat suivant : l'enchaînement d'acides aminés régit le repliement des protéines<sup>5</sup>. En effet la protéine cherche à avoir une structure qui minimise son énergie. Ces observations ont été à l'origine d'interrogations sur ce mécanisme de repliement, en 1969 Levinthal<sup>6</sup> introduit un paradoxe qui porte son nom : à la vue du grand nombre de degré de liberté d'une protéine, si elle cherche à obtenir sa forme repliée en échantillonnant de manière séquentielle toutes les conformations possibles cela prendrait un temps astronomique. Ce paradoxe opte plutôt pour un contrôle cinétique du processus et non pas thermodynamique. En réalité différents mécanismes existent ; en effet les petites protéines se replient généralement de manière spontanée, pour celles de plus grosses tailles, des protéines chaperonnes<sup>7</sup> peuvent intervenir dans le repliement. Ces mécanismes sont donc plutôt sous contrôle mixte<sup>8,9</sup>.

Le développement de deux techniques majeures a permis une grande évolution dans la détermination des structures tridimensionnelles des protéines (i) la diffraction des rayons X (DRX)<sup>10</sup> en 1960 (ii) et la résonance magnétique nucléaire (RMN)<sup>11</sup> en 1980. Ces techniques combinées aux tests d'activités biologiques ont permis de faire des observations sur les formes actives des protéines. Les techniques spectroscopiques (le dichroïsme circulaire (DC) et la fluorescence) ont permis de suivre les cinétiques de repliement de par leur rapidité

d'acquisition. En effet, pour donner quelques grandeurs cinétiques liées au repliement de protéines, une hélice met environ  $10^{-7}$ s à se former, une boucle de dix acides aminés met environ  $10^{-6}$ s, le repliement d'une grosse protéine met en moyenne entre 100ms à quelques minutes. Pour observer les différentes étapes du repliement il faut combiner différentes techniques. Nous pouvons citer quelques techniques qui émergent de celle citées précédemment, il s'agit de l'échange d'hydrogène deutérium pulsé en RMN<sup>12</sup> et en spectrométrie de masse<sup>13</sup> (SM) et la RMN en temps réel<sup>14</sup>. Des expériences d'optiques de type fluorescence résolues en temps<sup>15</sup> ou de type pompe-sonde (FRET<sup>16</sup> : Förster Resonance Energy Transfer) ont permis de faire des observations fines sur le repliement de protéine.

Les études en phase gazeuse posent un certain nombre de problème. Une des questions importantes est de savoir si les structures en phase gazeuse sont les mêmes qu'en phase liquide. Ceci dépend des conditions d'ionisation, des conditions de préparation de l'échantillon (solvant, pH, force ionique,...) et de l'état de charge du système étudié. La SM a permis d'observer des différences sur les spectres de masse en fonction des conditions de solution<sup>17</sup>. En règle générale un décalage vers les hauts états de charge est observé lorsque la solution est dite dénaturante (c'est-à-dire comportant du méthanol, de l'acide fortement concentré ou des agents chaotropiques). Les agents dénaturants de part leur interaction avec la protéine ont pour effet de déplier et rendent ainsi accessible des sites basiques qui se trouvent dans le cœur hydrophobe. Cette évolution de la distribution d'état de charge peut donner un indice sur la structure en phase gazeuse des protéines. Pour avoir une information plus fine sur la structure en phase gazeuse des techniques de fragmentation existent<sup>18-20</sup> mais elles ne permettent pas d'avoir une information direct. A l'heure actuelle deux techniques existent, (i) la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse<sup>21</sup> (ii) et la spectroscopie infrarouge en piège ionique<sup>22,23</sup>.

Dans ce chapitre nous allons présenter des résultats sur la structure de protéine en phase gazeuse en fonction des conditions de solution, de charge et d'ionisation. Puis nous présenterons une analyse sur l'étude structurale du dépliement et du repliement oxydatif d'une protéine contenant des ponts disulfures : le lysozyme.

## II. Structure des protéines en phase gazeuse :

### 1. Structure en fonction de l'état de charge et de la solution :

La structure des protéines en phase gazeuse peut être observée de manière directe par la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse<sup>24,25</sup>. Cette structure en phase gazeuse est dépendante de différents paramètres, l'état de charge, la technique d'ionisation ainsi que les conditions d'ionisation (solvant, pH, force ionique,...). Dans notre étude nous avons utilisé une source electrospray. Sur la figure II-1 sont représentés les profils en section efficace de collision du cytochrome C de cœur de cheval de l'état de charge +6 à +17.

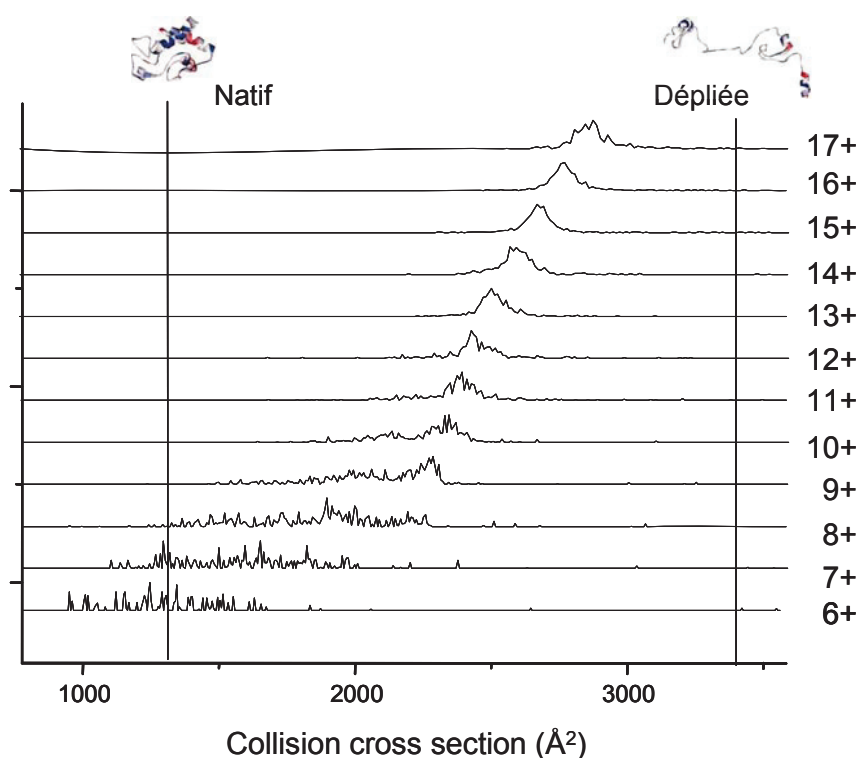
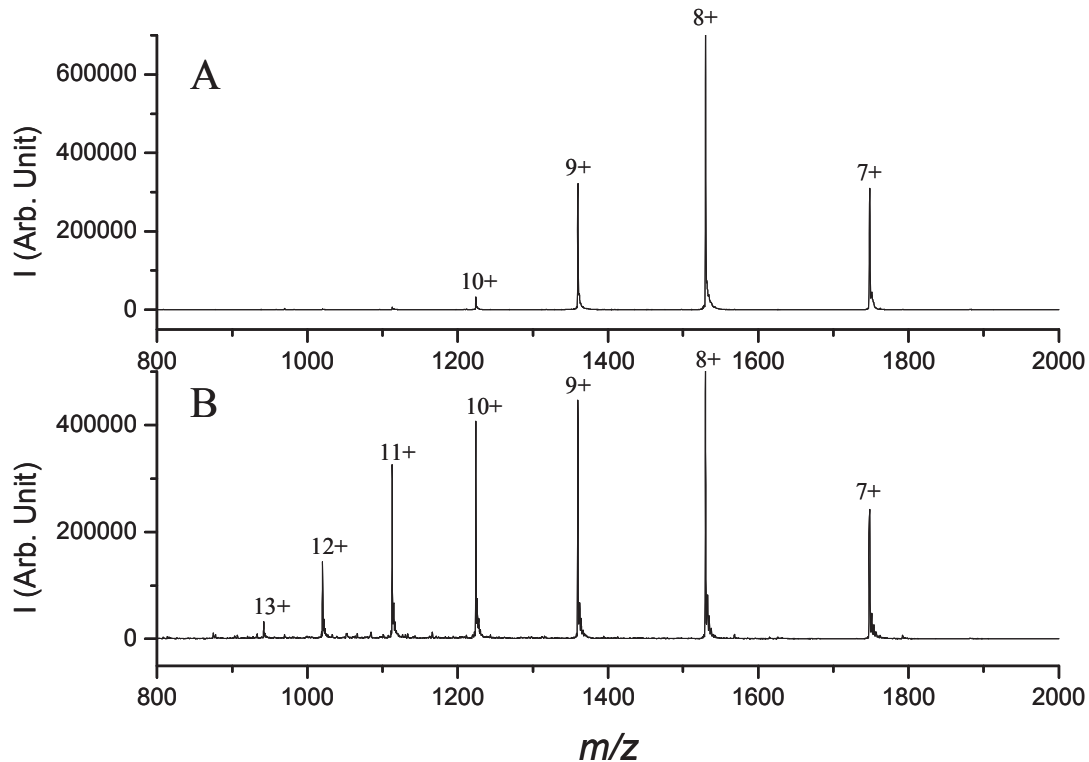


Figure II-1 : Section efficace de collision du Cytochrome C en fonction de l'état de charge. Les barres verticales correspondent à la structure native et dépliée.

On remarque que plus la protéine est chargée, plus elle a une structure dépliée. L'état de charge a donc une influence importante sur la structure adoptée par les molécules en phase gazeuse. Plus on charge une molécule plus elle va être contrainte par les répulsions coulombiennes et être dépliée.

Les états de charge adoptés en phase gazeuse sont dépendants de la solution, il y a une « mémoire de la solution »<sup>26</sup>. Par exemple si on infuse une solution de cytochrome C de cœur

de bœuf en solution dans l'eau on observe un spectre de masse comportant les états de charge de +7 à +10. En revanche si on travail avec une solution eau/méthanol (50/50) on observe les états de charges +7 à +13 (cf fig II-2).



**Figure II-2 : Spectre de masse du Cytochrome C de cœur de bœuf en fonction du solvant. A) 100% eau. B) 50/50 eau/méthanol.**

En solution dans l'eau la protéine est dite « native », elle adopte une conformation repliée ainsi les protons ont accès à peu de sites basiques. En solution avec 50% de méthanol la protéine est dénaturée, elle a une conformation dépliée, les protons ont accès à plus de sites basiques. Ce qui explique ce décalage vers les hauts états de charge. Le pH de la solution a également son importance. En effet plus le pH sera acide plus l'état de charge sera élevé.

Pour avoir une image de la structure native d'une protéine, il faut travailler avec des charges les plus basses possible (ceci dépend bien sur de la taille du système étudié). Pour diminuer l'état de charge en ionisation electrospray, une technique originale a été développée par Zenobi et al.<sup>27,28</sup>, l'ionisation par electrospray supersonique (ESSI). Nous avons voulu tester l'influence de cette source sur les distributions de mobilité ionique.

## 2. ESI vs ESSI :

La figure II-3 présente la source ESSI développée par Zenobi et al. La source est composée d'un nébuliseur où le débit de gaz est très important (10-50bar), ce qui crée un jet supersonique. Le spray contient de fines gouttelettes d'ions moléculaires peu solvatés. En présence d'une vapeur de base il y a de la rétention de charge qui a pour conséquence une diminution de l'état de charge.

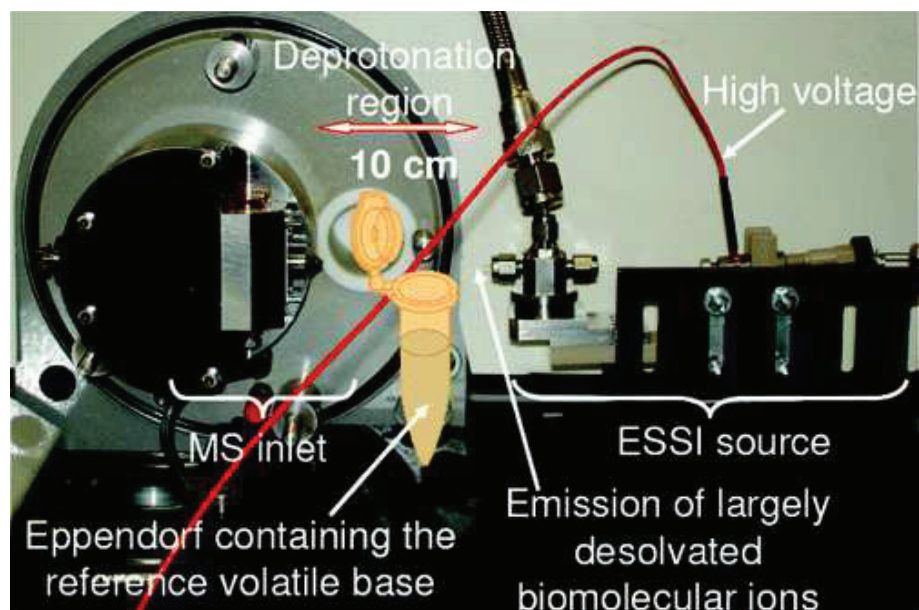


Figure II-3 : Dispositif ESSI.

Deux protéines ont été étudiées par IM-MS en utilisant cette technique, l'ubiquitine et le cytochrome C de cœur de cheval. L'objectif de l'étude est d'observer les conformations obtenues par mobilité ionique à l'issue du processus de rétention de charge. Ceci est réalisé en comparant pour le même état de charge, la structure avec et sans base (ammoniaque). La figure II-4 présente les spectres de masse avec et sans base pour le cytochrome C. On remarque un décalage des états de charge vers la droite quand on ajoute la base, ceci vient du fait qu'il y a rétention de charge par la base.

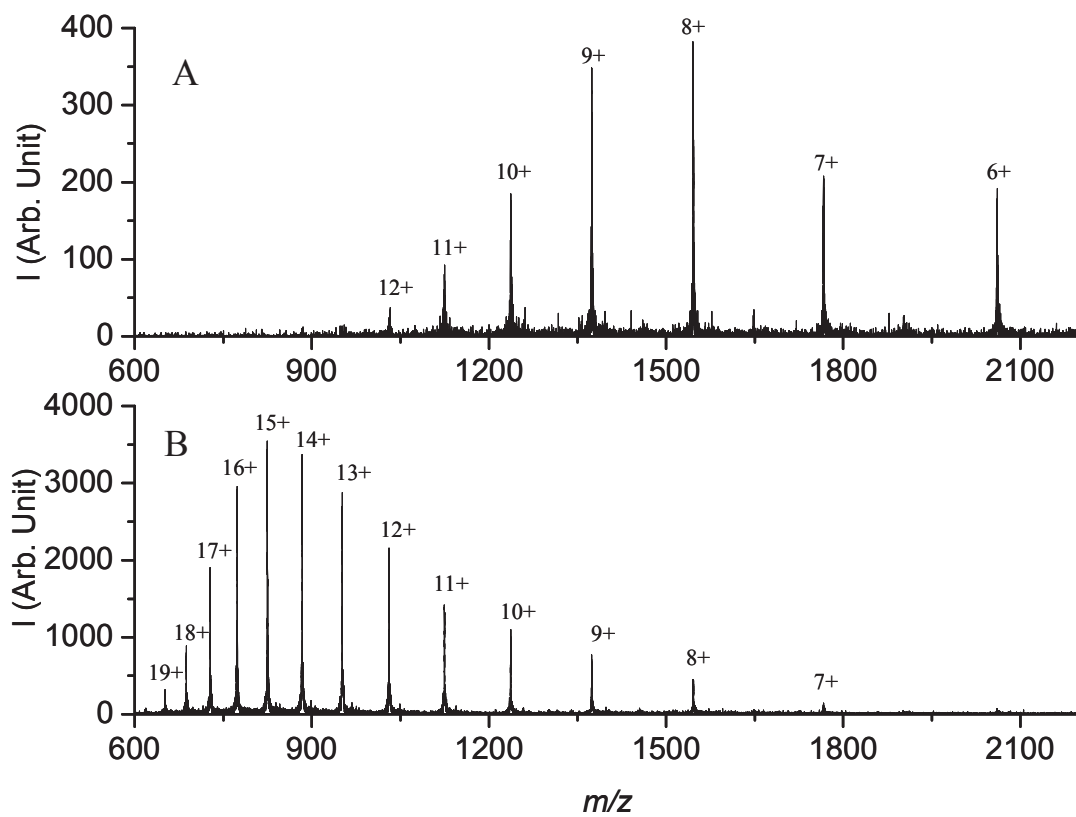
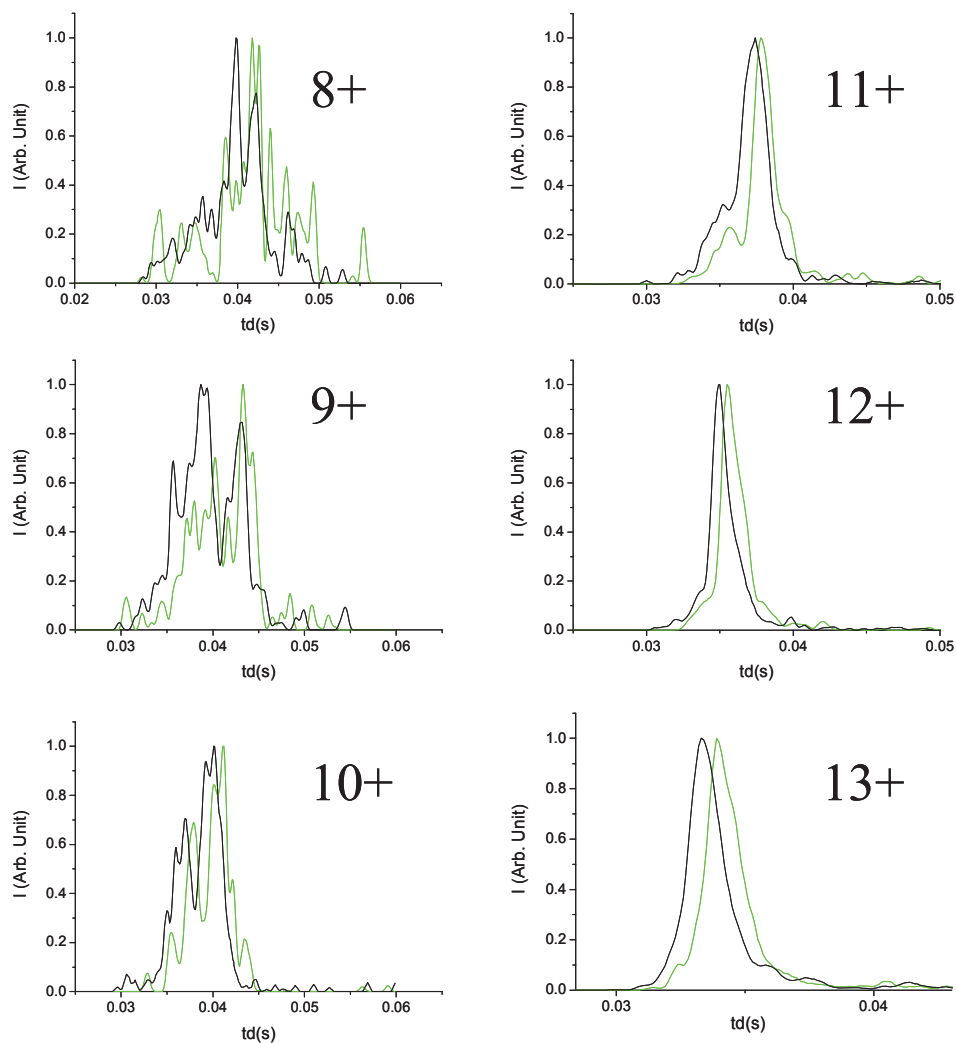


Figure II-4 : Comparaison des spectres de masse pour le cytochrome C sans base (B) et avec base (A).

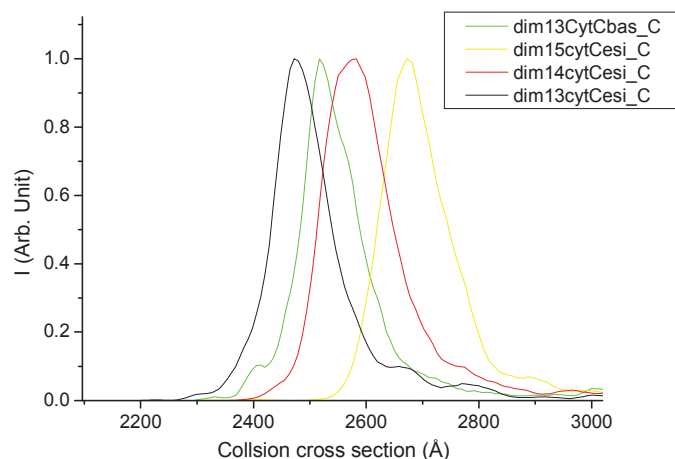
La figure II-5 compare pour le même état de charge les profils expérimentaux obtenus en temps de diffusion. En vert sont représentés les profils correspondant à l'ionisation avec vapeur d'ammoniaque et en noir sans base. On remarque que les profils avec base correspondent à des structures plus dépliées que celles obtenues sans base.





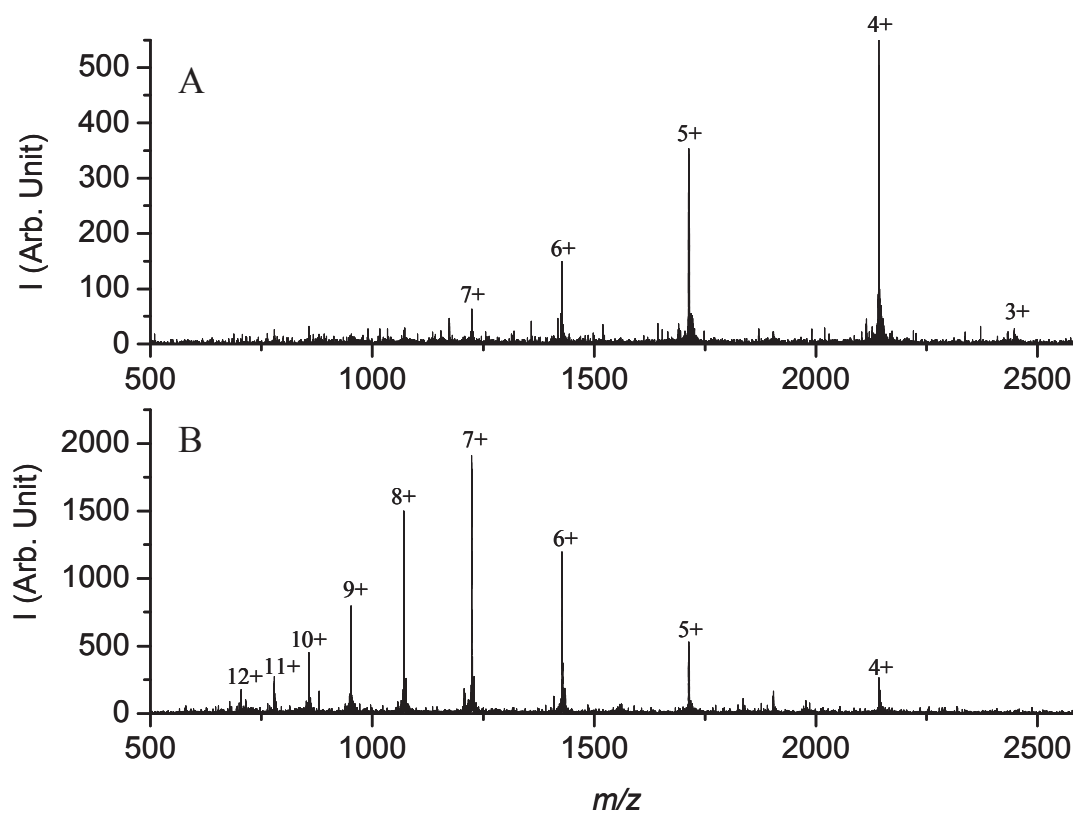
**Figure II-5 : Comparaison des profils de temps d'arrivée avec (vert) et sans base (noir) pour le cytochrome C.**

Si on compare pour l'état de charge +13 avec base en section efficace de collision, on remarque que la conformation de ce dernier correspond à une conformation intermédiaire entre le +13 et le +14 sans base (Cf. Fig. II-6). Ceci est dû au fait que lorsqu'il y a la rétention de charge, par exemple le passage du +14 au +13 par capture d'un proton par la base, la protéine se replie mais elle n'a pas le temps d'atteindre la conformation correspondant à l'état de charge +13 dans cet exemple.



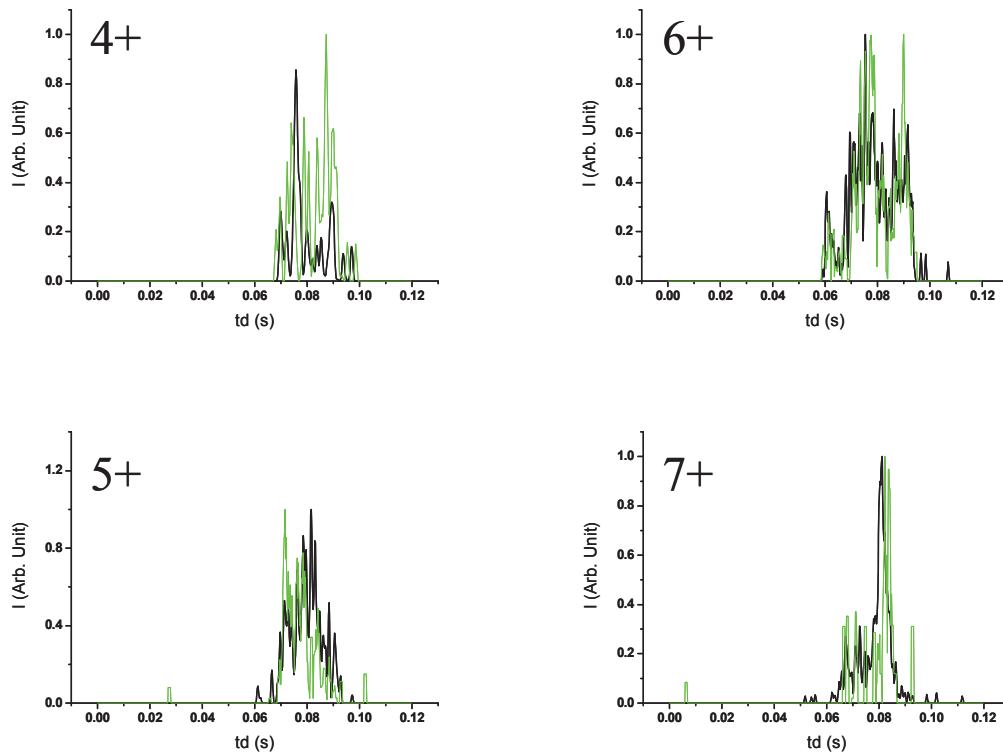
**Figure II-6 : Comparaison en section efficace de collision entre l'état de charge +13 avec base et les états de charge +13, +14 et +15 sans base pour le CytochromeC.**

L'exemple suivant est basé sur la même expérience que précédemment en prenant comme système d'étude l'ubiquitine. Cette protéine est de plus petite taille puisqu'elle a un poids moléculaire d'environ 8kDa. On observe un décalage du spectre de masse, comme montré sur la figure II-7, lorsque l'on ajoute la base.



**Figure II-7 : Comparaison des spectres de masse obtenus pour l'ubiquitine sans base (B) et avec base (A).**

Par contre, en ce qui concerne les profils en temps d'arrivées, ils sont les mêmes avec et sans base (Cf. Fig. II-8).



**Figure II-8 : Comparaison des profils de temps de diffusion avec (vert) et sans base (noir) pour l'ubiquitine**

Ceci peut être expliqué par le fait que l'ubiquitine est de plus petite taille que le cytochrome C, ainsi elle a le temps de se replier entre la perte d'un proton (capté par la base) et son passage dans le tube de diffusion.

### III. Lysozyme, dépliement et repliement

Le lysozyme est une protéine structurée comportant 129 acides aminés. Cette protéine a été découverte en 1922 par Alexander Fleming. In vivo, le lysozyme est une enzyme dont la fonction est de type hydrolase acide. Elle joue un rôle dans la défense de l'organisme contre les bactéries en détruisant leurs parois (antibiotique naturel). Son mode d'action est le suivant, elle hydrolyse les glycoaminoglycanes qui constituent la paroi bactérienne. Sa structure tridimensionnelle et sa séquence sont bien connues (elles sont représentées sur la figure III-1), sa structure cristallographique a été déterminée par diffraction des rayons X<sup>29,30</sup>, sa structure en solution a été déterminée par RMN<sup>31</sup>. Elle a la particularité de comporter 4 ponts disulfures qui contraignent sa structure tridimensionnelle. On remarque la présence d'un domaine en hélices- $\alpha$  (résidus 1-40 et 90-129), et d'un domaine en feuillets- $\beta$  (résidus 41-89), ces deux

sous domaines sont reliés par un pont disulfure, le Cys76-94. Il y a deux ponts disulfures localisés dans le domaine- $\alpha$  (Cys 6-127 et Cys 30-115) et un pont disulfures dans le domaine- $\beta$  (Cys 64-80).

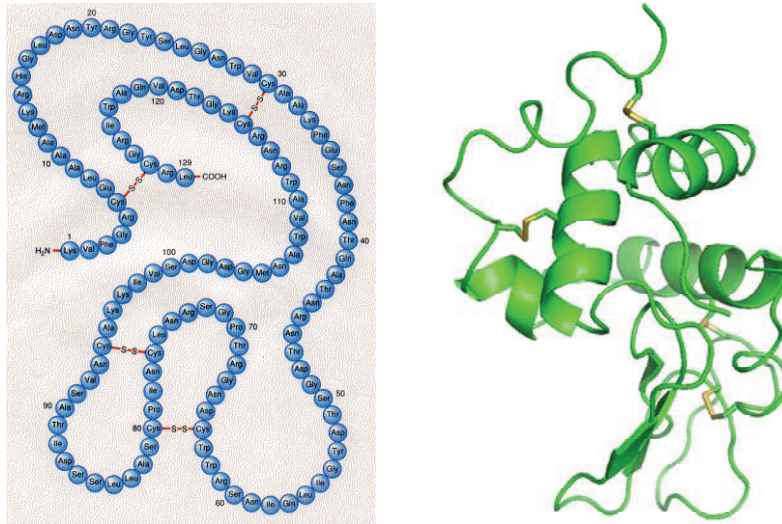


Figure III-1 : Séquence et structure du lysozyme obtenue par DRX.

C'est un système modèle dans l'étude du repliement des protéines contenant des ponts disulfures puisque de nombreux travaux ont été effectués<sup>32-36</sup>. De nombreuses études ont été faites sur le repliement du lysozyme dénaturé, c'est-à-dire en présence d'agents chaotropiques, mais en gardant les ponts disulfures intacts. Ces études ont permis d'observer la cinétique de renaturation qui est présentée sur la figure III-2.

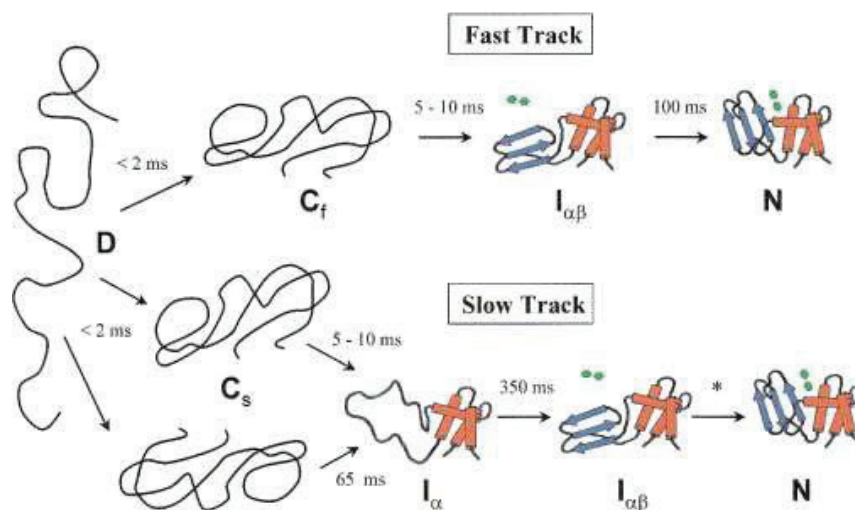


Figure III-2 : Mécanisme de renaturation du Lysozyme Matagne et al.<sup>35</sup>.

On remarque une première phase rapide qui correspond à l'hydrophobic collapse, ensuite des structures secondaires apparaissent : soit directement des feuillettes et des hélices soit seulement des hélices. Deux cinétiques différentes ont lieu. La première est rapide, la seconde plus lente.

On peut également citer les travaux de Van den Berg et al.<sup>37,38</sup> qui ont étudié les intermédiaires de repliement du lysozyme, dénaturé et réduit, en combinant le dichroïsme circulaire et l'échange H/D pulsé et la RMN. Cette étude a permis de définir une cinétique en trois étapes comme représentée sur la figure III-3.

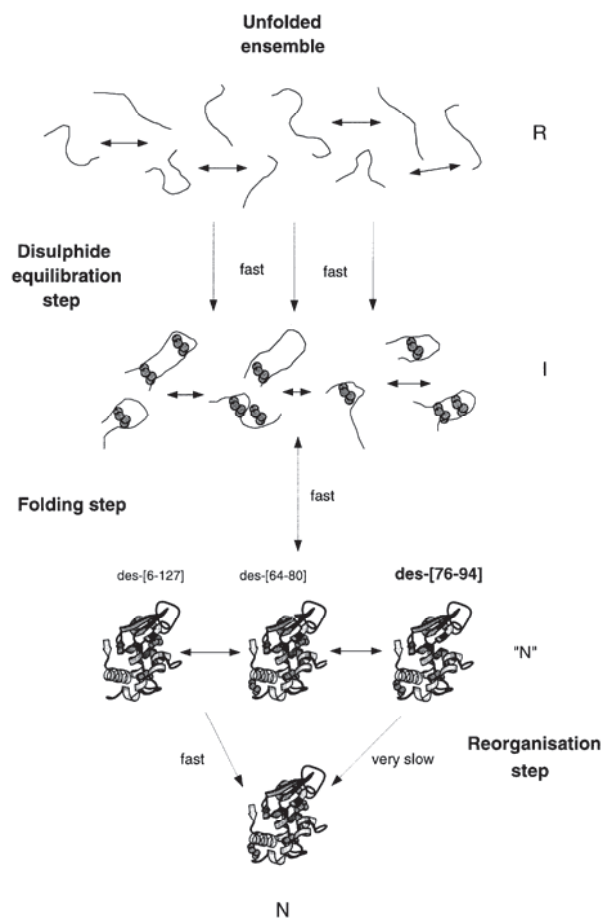


Figure III-3 : Mécanisme du repliement oxydatif du Lysozyme<sup>38</sup>.

On remarque une première étape où il y a les premiers ponts disulfures qui se forment, en moyenne deux ponts se forment rapidement. Ces intermédiaires se replient en formant des structures secondaires. Ces intermédiaires ont une structure quasiment native, ils leur manquent tous un pont disulfure mais l'intermédiaire accumulé majoritaire est le *des*-[76-94]. Ce pont disulfure relie deux domaines structurés de la protéine. Cet intermédiaire a une structure très proche de la structure native, mais c'est celui qui est le plus lent à former la structure native.

Dans notre étude nous allons nous attacher dans un premier temps à étudier la dénaturation et la réduction du lysozyme, puis sa renaturation et son oxydation. Puis nous nous intéresserons à la renaturation du lysozyme en clivant les fonctions thiols pour observer l'influence des ponts disulfures sur le repliement de la protéine.

### **1. Réversibilité du processus de dénaturation réduction et renaturation oxydation du lysozyme :**

Dans cette partie nous avons développé un protocole qui permet de dénaturer et de réduire les 4 ponts disulfures du lysozyme pour ensuite les réoxyder et renaturer la protéine. Ce processus est représenté sur la figure III-4.

#### **a. Protocole de réduction**

Le protocole de réduction utilisé est le suivant : la solution de départ est une solution de lysozyme à 150 $\mu$ M en solution dans l'eau cette solution s'appellera solution N (native). On additionne 3mM de guanidine et 6mM de dithiothréitol (DTT) ou 10mM de tris(2-carboxyéthyle)phosphine (TCEP) on chauffe a 60°C pendant une heure, cette solution sera appelée R (réduite). Le DTT ou le TCEP sont des réducteurs spécifiques aux ponts disulfures.

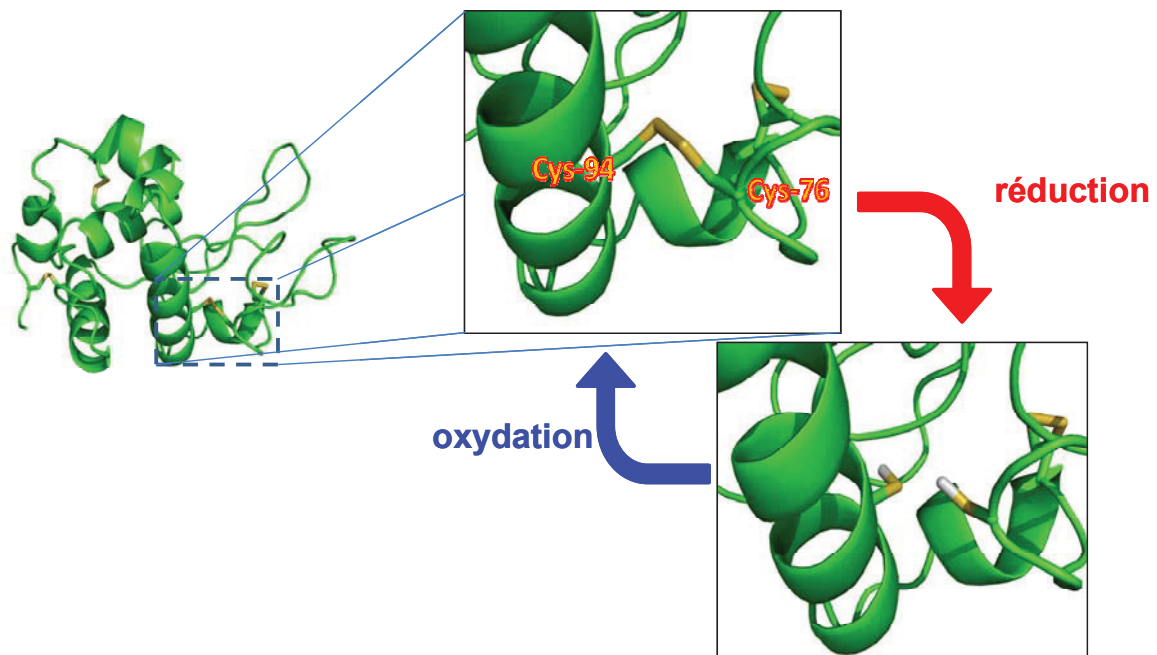


Figure III-4 : Réduction et oxydation du lysozyme.

Ces deux molécules qui sont représentées sur la figure III-5 sont de natures chimiques différentes.

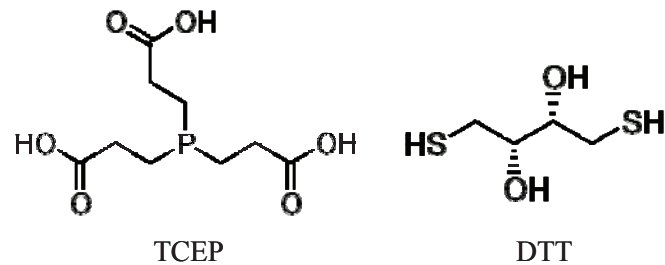


Figure III-5 : Structures d'agents réducteurs spécifiques aux ponts disulfures.

Le DTT réagit sur les ponts disulfures par une réaction d'oxydo-réduction. Sa forme oxydée présente un cycle à 6, comme représenté sur la figure III-6, ceci est la force motrice du processus de réduction.

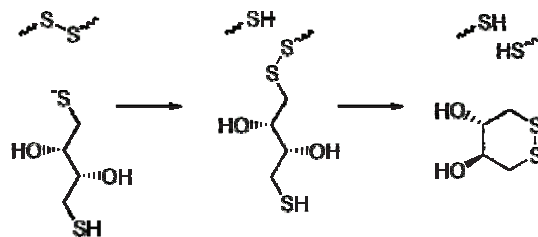
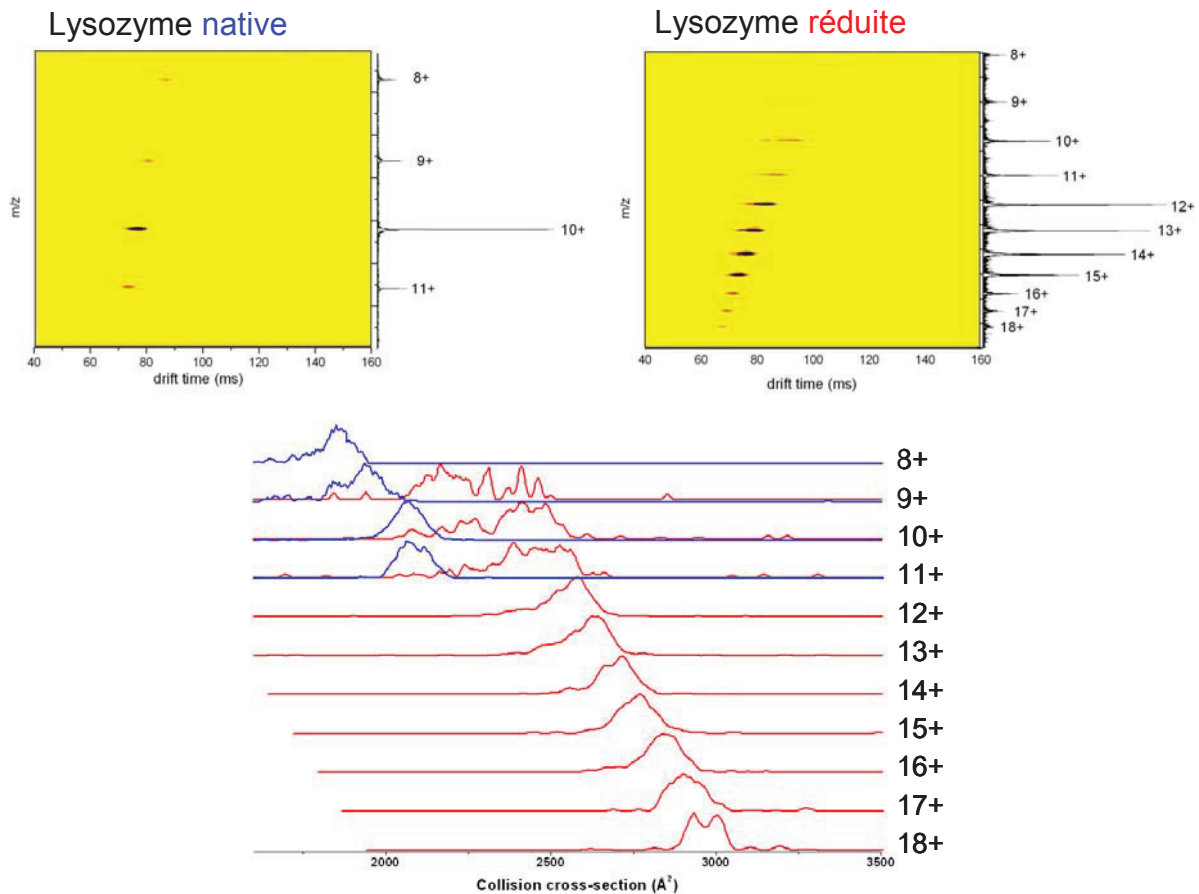


Figure III-6 : Réaction de réduction d'un pont disulfure par le DTT.

La réduction des ponts disulfures de surfaces de la protéine est aisée, tandis que pour les ponts se trouvant à l'intérieur il faut utiliser des agents chaotropes, la guanidine dans notre cas, pour rendre ces ponts disulfures accessibles. La réaction se passe à pH neutre, elle est optimale pour un pH de 8.3 (pKa des thiols) mais le lysozyme est peu soluble à pH basique.

En ce qui concerne le TCEP, le mécanisme est plus complexe. Cette réaction nécessite les mêmes conditions d'utilisation de guanidine. L'avantage de cet agent réducteur est qu'il ne comporte pas de fonction disulfure ce qui nous permettra par la suite à ne pas avoir de réactions secondaires, de plus il est plus efficace que le DTT.

La figure III-7 présente les résultats obtenus par IM-MS du lysozyme native et réduite.



**Figure III-7 : Comparaison Lysozyme natif et réduit, carte IM-MS 2D et profil en section efficace de collisions des états de charge 8+ à 11+ pour la native et de 9+ à 18+ pour la réduite.**

On remarque que le fait d'enlever les ponts disulfures donne plus de degré de liberté à la protéine. En effet pour un état de charge donné les structures correspondantes sont plus dépliées et les profils plus larges. De plus on remarque une distribution de charge différente entre l'état natif (+8 à +11) et réduit (+8 à +18). Pour s'assurer que la réduction est bien totale il faut un gain de masse de +8uma, ce qui est observé sur la figure III-8. Ce gain de masse est dû au fait que lorsqu'un pont disulfure est réduit, la liaison covalente qui lie les deux souffres est rompue et un atome d'hydrogène substitue cette lacune. On remarque que lorsque la protéine est native, elle est beaucoup moins chargée que lorsqu'elle est réduite, ceci est dû au fait que les protons ne peuvent pas accéder aux sites basiques se trouvant dans le cœur hydrophobe de la protéine.



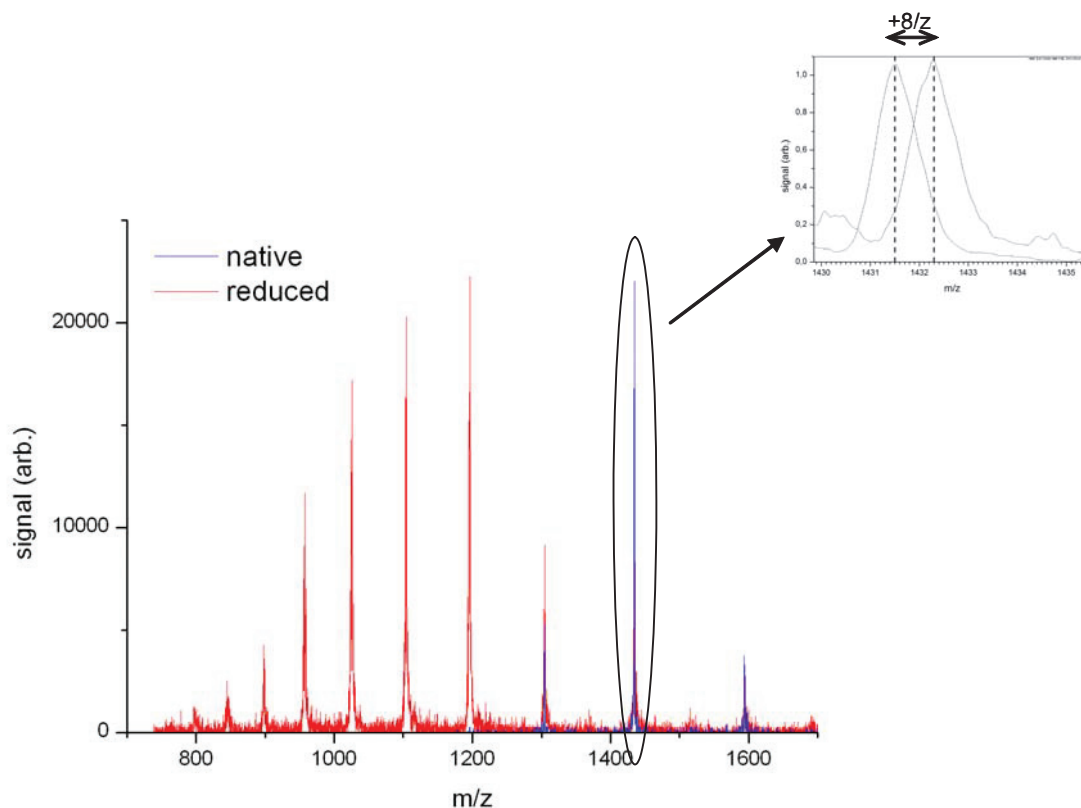


Figure III-8 : Spectres de masse du Lysozyme natif (bleu) et réduit (rouge).

### b. Protocole d'oxydation :

La solution R précédente est ensuite centrifugée en utilisant des filtres dont la limite en masse est de 3 kDa (ainsi on ne garde que la protéine réduite). On procède à 4 cycles de centrifugation de 20 min chacun à 6500g. On part de 2.5mL de solution au premier cycle, les 20min de centrifugation permettent de récupérer 250µl de solution initiale que l'on rince par 2.5mL d'eau, on répète cette opération à chaque cycle. La solution obtenue est ensuite remise en solution dans 2mL d'eau. On ajoute ensuite un mélange de glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) à 2 et 0.4mM respectivement. Le GSH est utilisé pour réduire les ponts disulfures, tandis que GSSG permet d'oxyder les ponts qui seraient mal formés. La solution est mise au frigo à 4°C pendant 12h. Cette solution sera appelée par la suite F (folded).

La figure III-9 présente les spectres de masse ainsi que les profils de mobilité de l'ion 10+ (qui est le plus intense et celui qui est commun à toutes les espèces) du lysozyme N, R et F. Au niveau des spectres de masse on voit la réversibilité du processus de par les états de charge adoptés. Au niveau des profils en temps d'arrivée de l'ion 10+ on remarque pour N et F une structure avec peu de degré de liberté (étroitesse du pic), même si plusieurs conformations

sont présentes sous ce pic. Pour R par contre il existe un grand nombre de conformations possibles, majoritairement plus étendues même si on remarque quelques structures plus compactes. Ce résultat nous a permis de contrôler que notre protocole de réduction et de réoxydation étaient bien réversible et que l'on pouvait continuer l'étude du repliement du lysozyme. Il faut rester vigilant lorsque l'on parle de renaturation. En effet la résolution de l'expérience permet d'observer si globalement on retrouve une structure semblable par contre pour savoir si la protéine est active il faudrait utiliser un test d'activité biologique<sup>38</sup>. Les cinétiques de repliement sont assez rapides, il est donc difficile par des techniques comme l'IM-MS d'observer les intermédiaires réactionnelles. En effet il faut plusieurs dizaines de minutes pour enregistrer un spectre ce qui n'est pas compatible avec une cinétique de repliement (quelques secondes). Pour pouvoir suivre le processus de repliement il va falloir piéger les intermédiaires de manière chimique.

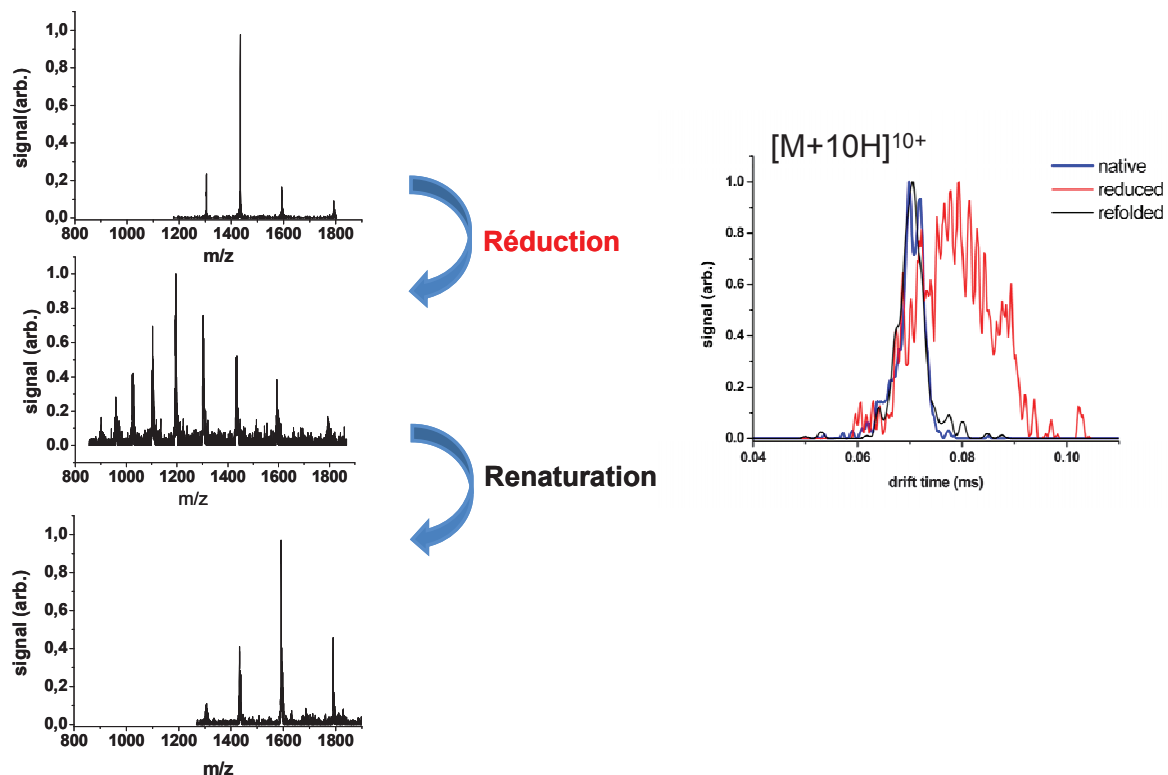


Figure III-9 : Lysozyme natif réduite et réoxydé, spectres de masse et profils de temps d'arrivé pour l'ion 10+.

## 2. Cyanilation des groupements sulfhydriles après réduction totale :

La cyanilation des groupes sulfhydriles permet de protéger la fonction sulfhydryl résultant de la rupture d'un pont disulfure. Le réactif de cyanilation utilisé est le CDAP (1-Cyano-4-diméthylaminopyridinium tétrafluoroborate). La réaction se fait en solution à pH acide

(pH=3), à température ambiante pendant 15 minutes. Le schéma de réaction est présenté figure III-10.

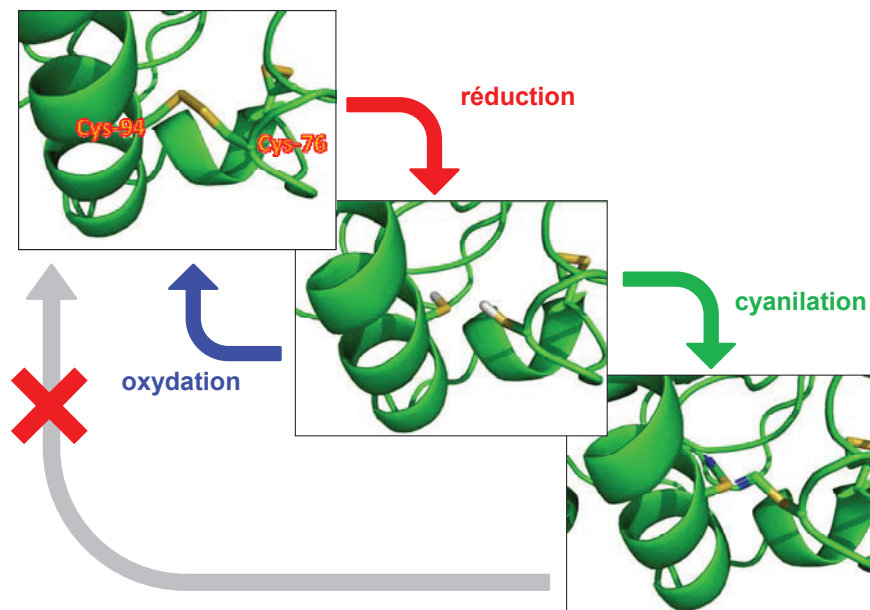


Figure III-10 : Réduction et cyanilation du lysozyme.

Après avoir réduit les ponts disulfures en utilisant du TCEP (même protocole que précédemment), on effectue la réaction de cyanilation en additionnant environ 15mM de CDAP (si on a une concentration de départ de 150 $\mu$ m de lysozyme). La réaction se fait à température ambiante en quinze minutes. Puis on centrifuge le mélange réactionnel en utilisant un filtre (masse limite 5kDa) pour récupérer la protéine cyanilée. On laisse cette dernière se replier en solution aqueuse avec du glutathion (réduit et oxydé comme précédemment), afin d'être dans les mêmes conditions et pouvoir comparer le repliement avec et sans pont disulfures. Les résultats expérimentaux obtenus par IM-MS sur l'état de charge 10+ sont présentés sur la figure III-11. On remarque que le profil de la protéine cyanilée et remise en solution dans une solution « renaturante » ne revient pas à la position de la solution native de départ. Ceci implique que la reformation des ponts disulfures est une étape clefs dans la restructuration d'une protéine. Sans la reformation de ces derniers la protéine ne peut atteindre sa forme active.

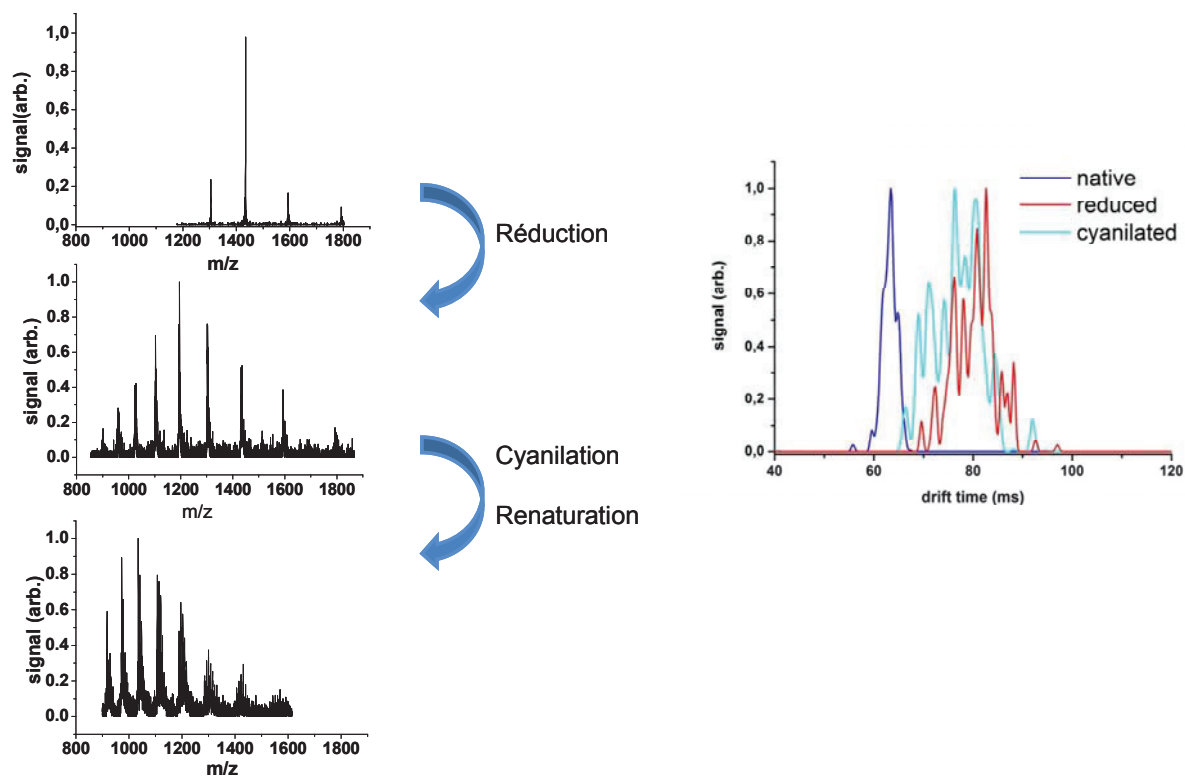


Figure III-11 : Spectre de masse et profil de mobilité ionique de l'ion 10+ du lysozyme natif, réduit et cyanilé.

### 3. Piégeages des intermédiaires de réduction :

La partie précédente a permis de mettre en évidence la nécessité de reformer les ponts disulfures pour pouvoir obtenir la forme native du lysozyme. De plus le protocole de cyanilation a pu être optimisé et adapté au lysozyme. L'objectif maintenant est de piéger les intermédiaires de réduction, c'est-à-dire les espèces ayant un, deux et trois ponts disulfures réduits. Pour ce faire nous avons étudié la cinétique de réduction. Ceci dans le but d'observer à partir de quel moment il fallait stopper la réduction pour qu'elle ne soit pas totale et que l'on ait un mélange des différentes espèces réduites. La figure III-12 présente les spectres de masse mesurés à différents temps de réduction en utilisant le protocole précédemment détaillé. La mesure de masse a été réalisée sur un appareil commercial comportant un piège quadripolaire linéaire (LTQ) de chez Thermo. On remarque un décalage vers les hauts états de charge au cours du temps, ceci est dû au fait que la protéine se déplie et donc que les sites basiques du cœur deviennent accessibles.

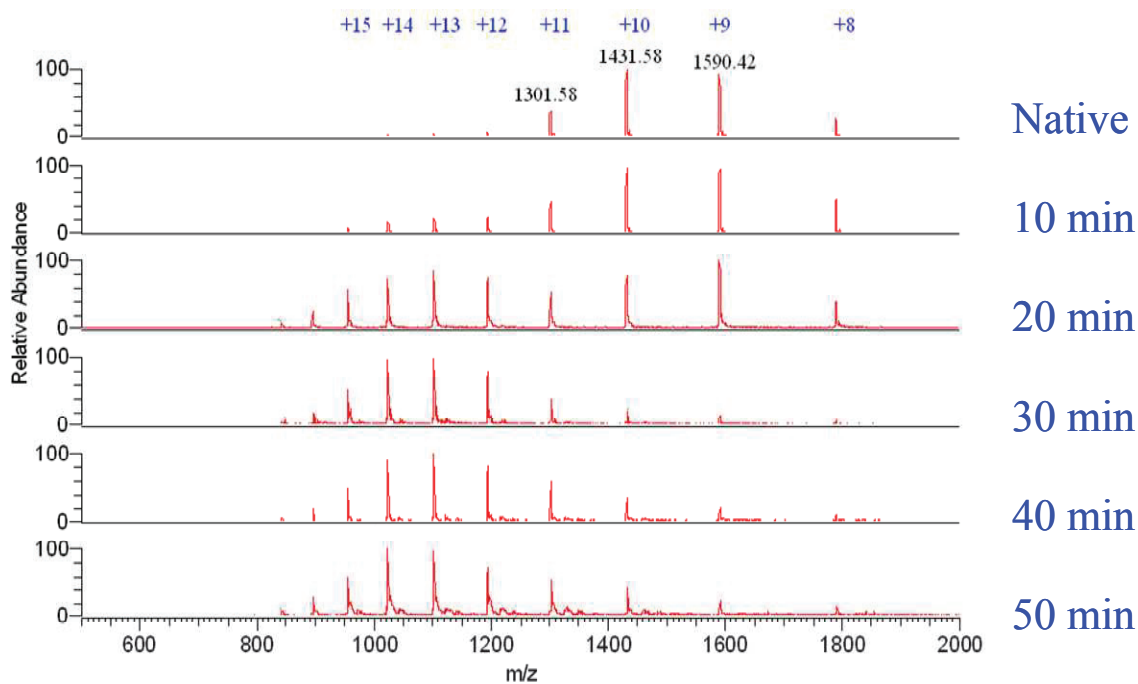


Figure III-12 : Spectres de masse ne fonction du temps de réduction.

On remarque une distribution bimodale pour  $t=20\text{min}$ . Ceci peut laisser penser qu'à ce temps nous avons bien un mélange des différents degrés de réduction. Une acquisition en zoomant sur le pic de l'état de charge  $10+$  a été fait en fonction du temps. Les spectres de masse correspondant sont représentés sur la figure III-13.

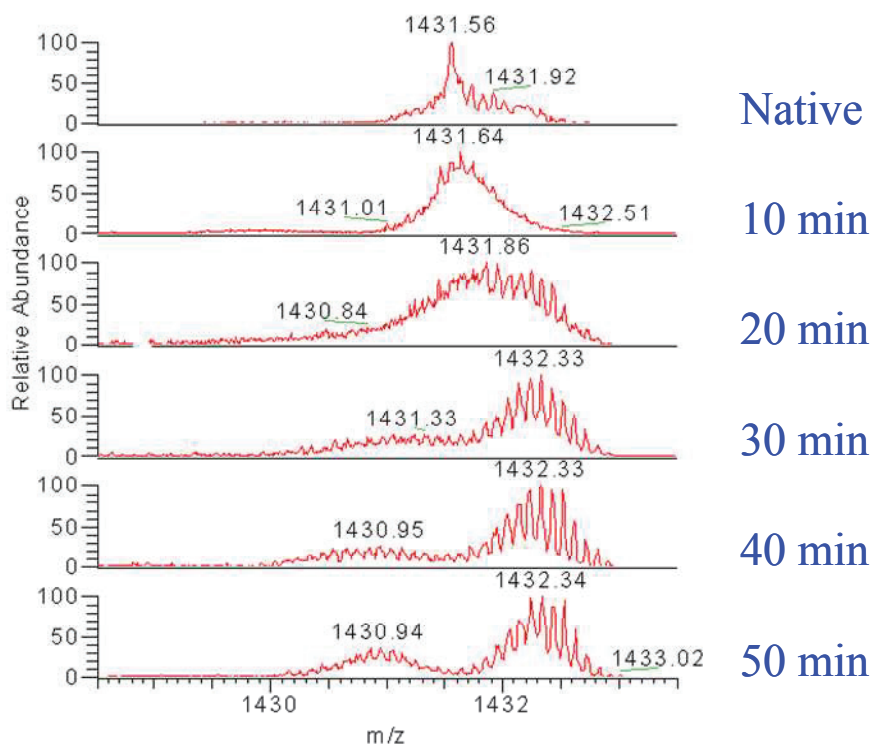


Figure III-13 : Spectre de masse zoomé sur l'état de charge  $10+$  en fonction du temps de réduction.

On remarque bien un décalage global vers les hauts rapports m/z (dû au gain de masse de deux protons par ponts disulfures réduits). A t=20min on a un mélange des différentes espèces, on peut ainsi espérer qu'en faisant une cyanilation à ce moment les différents intermédiaires peuvent être extraits.

#### 4. Perspectives :

Il s'agit maintenant de réaliser les mesures de mobilité ionique sur les intermédiaires piégés par cyanilation. On pourra ainsi étudier en détail l'influence d'un pont donné sur la conformation. De plus si le tube de mobilité est thermalisé, il serait possible d'étudier la thermodynamique des espèces partiellement réduites.

Ces expériences sur le lysozyme sont une base de départ dans l'étude de dynamique et thermodynamique du repliement de protéines et de complexes protéiques. Pour pouvoir caractériser les intermédiaires piégés des expériences complémentaires peuvent être mise en œuvre. En effet, une des propriétés des groupements sulfhydriles cyanilés est qu'ils sont stables à pH acide, par contre si on augmente le pH aux alentours de 8, une réaction de cyclisation a lieu. Cette dernière a été utilisée par Watson et al.<sup>39</sup>. En augmentant le pH il y a une déprotonation de la fonction amine de la liaison peptique qui va induire une réaction de cyclisation avec le groupement carbonyle. Le schéma de la réaction est présenté sur la figure III-14. Cette technique peut permettre d'étudier les positions des groupements sulfhydriles cyanilés et donc de connaître le mécanisme de réduction de manière plus précise. Ainsi on peut remonter aux processus de réduction et d'oxydation de manière précise en identifiant les fragments comportant encore des ponts disulfures et ceux qui n'en comportent pas. Pour ce faire il faut utiliser dans un premier temps la chromatographie liquide pour séparer les différentes espèces. Ensuite augmenter le pH pour que la réaction de fragmentation ait lieu. Et enfin analyser les fragments par spectrométrie de masse.

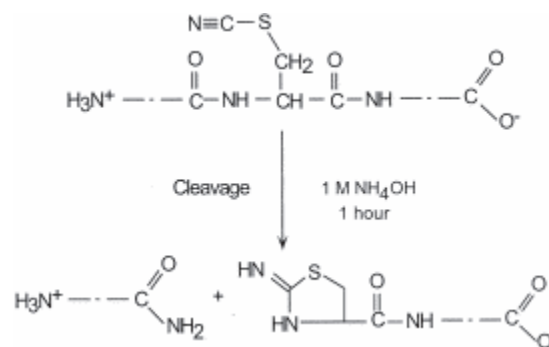


Figure III-14 : Réaction de fragmentation des groupes sulfhydriles cyanilés à pH basique.

## IV. Conclusion :

Ce chapitre a permis d'aborder dans un premier temps la structure des protéines en phase gazeuse en fonction des conditions de solutions et d'ionisation mais aussi de l'état de charge. Puis nous avons présenté le début d'une étude sur le processus de réduction et de réoxydation d'une protéine contenant des ponts disulfures. Le système choisi est un système modèle qui nous permet de voir ce qui est observable avec cette expérience. Cependant la faible résolution temporelle de la méthode ne permet pas d'observer la cinétique en temps réel. C'est pourquoi le protocole chimique développé pour piéger les intermédiaires réactionnelles semble être un bon compromis.

L'étude de structures en phase gazeuse permet d'avoir des données sur les facteurs intrinsèques qui stabilisent une structure tridimensionnelle au sein de ces macros objets moléculaires. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus en phase liquide, en RMN, par des méthodes spectroscopiques, permet de comprendre le rôle du solvant dans les processus de stabilisation de structure in vivo. La mobilité ionique ne permet pas de remonter à une structure de manière précise avec des molécules de cette taille, par contre il est possible d'observer de manière qualitative les changements de structures. Une des possibilités pour assigner une structure est de déterminer la section efficace de collision de la structure RMN ou DRX et de comparer avec ce que l'on observe en mobilité ionique. Une application de la mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse dans l'analyse structurale de protéine est le contrôle du repliement de ces dernières lorsqu'elles sont synthétisées de manière linéaire par voie chimique. En ce qui concerne les complexes protéiques impliquant un cofacteur ou un médicament, la mobilité ionique peut permettre d'observer les changements structuraux induits par la formation du complexe.



1. Chaffotte, A. F., Cadieux, C., Guillou, Y. & Goldberg, M. E. A Possible Initial Folding Intermediate - the C-Terminal Proteolytic Domain of Tryptophan Synthase-Beta Chains Folds in Less Than 4 Milliseconds into a Condensed State with Non-Native-Like Secondary Structure. *Biochemistry* **31**, 4303-4308 (1992).
2. Anson, M. L. & Mirsky, A. E. The reversibility of protein coagulation. *Journal of Physical Chemistry* **35**, 185-193 (1931).
3. Wu, H. Studies on denaturation of proteins: a theory of denaturation. *Chin J Physiol* **3**, 321-344 (1931).
4. Kauzmann, W. Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation. *Advances in Protein Chemistry* **14**, 1-63 (1959).
5. Anfinsen, C. B. Principles That Govern Folding of Protein Chains. *Science* **181**, 223-230 (1973).
6. Levinthal. Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys.* **65**, 44-45 (1968).
7. Ellis, J. Protein Folding - Cytosolic Chaperonin Confirmed. *Nature* **358**, 191-192 (1992).
8. Camacho, C. J. & Thirumalai, D. Kinetics and Thermodynamics of Folding in Model Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6369-6372 (1993).
9. Guo, Z. & Thirumalai, D. Kinetics and thermodynamics of folding of a de Novo designed four-helix bundle protein. *Journal of Molecular Biology* **263**, 323-343 (1996).
10. Kendrew, J. C. et al. 3-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature* **181**, 662-666 (1958).
11. States, D. J., Dobson, C. M., Karplus, M. & Creighton, T. E. A Conformational Isomer of Bovine Pancreatic Trypsin-Inhibitor Protein Produced by Refolding. *Nature* **286**, 630-632 (1980).
12. Baldwin, R. L. Pulsed H/D-Exchange Studies of Folding Intermediates. *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 84-91 (1993).
13. Miranker, A., Robinson, C. V., Radford, S. E. & Dobson, C. M. Investigation of protein folding by mass spectrometry. *Faseb Journal* **10**, 93-101 (1996).
14. Balbach, J. et al. Following Protein-Folding in Real-Time Using Nmr-Spectroscopy. *Nature Structural Biology* **2**, 865-870 (1995).
15. Canet, D., Doering, K., Dobson, C. M. & Dupont, Y. High-sensitivity fluorescence anisotropy detection of protein-folding events: Application to alpha-lactalbumin. *Biophysical Journal* **80**, 1996-2003 (2001).
16. Schuler, B., Lipman, E. A. & Eaton, W. A. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* **419**, 743-747 (2002).
17. Konermann, L. & Douglas, D. J. Unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: A comparison of positive and negative ion modes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **9**, 1248-1254 (1998).
18. Adams, C. M., Kjeldsen, F., Zubarev, R. A., Budnik, B. A. & Haselmann, K. F. Electron capture dissociation distinguishes a single D-amino acid in a protein and probes the tertiary structure. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **15**, 1087-1098 (2004).
19. Zhang, Z. Q. & Smith, D. L. Determination of Amide Hydrogen-Exchange by Mass-Spectrometry - a New Tool for Protein-Structure Elucidation. *Protein Science* **2**, 522-531 (1993).
20. Ben Hamidane, H. et al. Periodic Sequence Distribution of Product Ion Abundances in Electron Capture Dissociation of Amphipathic Peptides and Proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20**, 1182-1192 (2009).



21. Shelimov, K. B. & Jarrold, M. F. Conformations, unfolding, and refolding of apomyoglobin in vacuum: An activation barrier for gas-phase protein folding. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 2987-2994 (1997).
22. Kamariotis, A. et al. Infrared spectroscopy of hydrated amino acids in the gas phase: Protonated and lithiated valine. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 905-916 (2006).
23. Bakker, J. M. et al. Folding structures of isolated peptides as revealed by gas-phase mid-infrared spectroscopy. *Chemphyschem* **6**, 120-128 (2005).
24. Vonhelden, G., Wyttenbach, T. & Bowers, M. T. Conformation of Macromolecules in the Gas-Phase - Use of Matrix-Assisted Laser-Desorption Methods in Ion Chromatography. *Science* **267**, 1483-1485 (1995).
25. Clemmer, D. E., Hudgins, R. R. & Jarrold, M. F. Naked Protein Conformations - Cytochrome-C in the Gas-Phase. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 10141-10142 (1995).
26. Konermann, L. & Douglas, D. J. Acid-induced unfolding of cytochrome c at different methanol concentrations: Electrospray ionization mass spectrometry specifically monitors changes in the tertiary structure. *Biochemistry* **36**, 12296-12302 (1997).
27. Jecklin, M. C., Touboul, D., Bovet, C., Wortmann, A. & Zenobi, R. Which electrospray-based ionization method best reflects protein-ligand interactions found in solution? A comparison of ESI, nanoESI, and ESSI for the determination of dissociation constants with mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **19**, 332-343 (2008).
28. Takats, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B. & Cooks, R. G. Electrosonic spray ionization. A gentle technique for generating folded proteins and protein complexes in the gas phase and for studying ion - Molecule reactions at atmospheric pressure. *Analytical Chemistry* **76**, 4050-4058 (2004).
29. Blake, C. C. F. et al. Structure of Hen Egg-White Lysozyme - a 3-Dimensional Fourier Synthesis at 2a Resolution. *Nature* **206**, 757-& (1965).
30. Strynadka, N. C. J. & James, M. N. G. Lysozyme Revisited - Crystallographic Evidence for Distortion of an N-Acetylmuramic Acid Residue Bound in Site-D. *Journal of Molecular Biology* **220**, 401-424 (1991).
31. Smith, L. J., Sutcliffe, M. J., Redfield, C. & Dobson, C. M. Structure of Hen Lysozyme in Solution. *Journal of Molecular Biology* **229**, 930-944 (1993).
32. Dobson, C. M., Evans, P. A. & Radford, S. E. Understanding How Proteins Fold - the Lysozyme Story So Far. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 31-37 (1994).
33. Goldberg, M. E., Rudolph, R. & Jaenicke, R. A Kinetic-Study of the Competition between Renaturation and Aggregation During the Refolding of Denatured Reduced Egg-White Lysozyme. *Biochemistry* **30**, 2790-2797 (1991).
34. Miranker, A., Radford, S. E., Karplus, M. & Dobson, C. M. Demonstration by Nmr of Folding Domains in Lysozyme. *Nature* **349**, 633-636 (1991).
35. Matagne, A. et al. Thermal unfolding of an intermediate is associated with non-arrhenius kinetics in the folding of hen lysozyme. *Journal of Molecular Biology* **297**, 193-210 (2000).
36. Valentine, S. J., Anderson, J. G., Ellington, A. D. & Clemmer, D. E. Disulfide-intact and -reduced lysozyme in the gas phase: Conformations and pathways of folding and unfolding. *Journal of Physical Chemistry B* **101**, 3891-3900 (1997).
37. van den Berg, B., Chung, E. W., Robinson, C. V. & Dobson, C. M. Characterisation of the dominant oxidative folding intermediate of hen lysozyme. *Journal of Molecular Biology* **290**, 781-796 (1999).

38. van den Berg, P., Chung, E. W., Robinson, C. V., Mateo, P. L. & Dobson, C. M. The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase. *Embo Journal* **18**, 4794-4803 (1999).
39. Watson, J. T., Yang, Y. & Wu, J. Capture and identification of folding intermediates of cystinyl proteins by cyanylation and mass spectrometry. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **19**, 119-128 (2001).



# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :**

Ce mémoire de thèse a présenté le développement instrumental de l'expérience MS+ couplant spectrométrie de masse et mobilité ionique. Ce développement a nécessité des simulations numériques pour dimensionner les différentes optiques et un travail de mise au point important. Ce dispositif est le premier du genre en France et est opérationnel depuis mars 2008.

Les études menées sur cette expérience ont porté sur la caractérisation structurale de peptides et de protéines en phase gazeuse. Nous avons montré dans ce manuscrit que l'expérience MS+ permet (i) d'extraire des familles de structures de peptides en phase gazeuse et (ii) de séparer différents isomères conformationnels. Trois sujets d'étude ont été développés. Les deux premiers s'intéressent à la structure secondaire de peptide en fonction de mutations de certains acides aminés. Ces études ont été menées en collaboration avec Yury Tsybin de l'EPFL. Les séries des polyalanines et de polyglycines ont permis d'observer l'influence, à courte et longue distance, de la substitution d'un acide aminé sur la structure. De plus le protocole de calcul développé par F. Calvo a pu être validé. La seconde étude, sur la partie transmembranaire de la protéine M2 et des différents variants synthétisés, a permis d'observer la stabilité d'une hélice en fonction de différentes mutations. Cette étude a permis d'émettre l'hypothèse d'un dépliement de l'hélice au cours de la diffusion dans le tube de mobilité ionique et ouvre des perspectives sur des études en fonction de la température sur ces systèmes bistables. Enfin la dernière étude porte sur les structures adoptées par le lysozyme en phase gazeuse. L'étude sur le repliement oxydatif du lysozyme ouvre des perspectives sur des études en fonction de la température pour avoir accès à des données thermodynamiques.

Il apparaît évident que la thermalisation du tube<sup>1</sup> est une étape incontournable dans l'évolution de l'expérience. En effet, ceci ouvrirait la voie à des études thermodynamiques sur la stabilité de structures secondaires (M2TMP), mais aussi sur le repliement de protéines. D'autres études pourraient être développées sur l'étude de complexes protéiques afin d'extraire des constantes d'association. Ceci est aussi envisageable sur des complexes entre molécules organiques bioactives et capsules moléculaires (cyclodextrines<sup>2</sup>, calixarènes<sup>3</sup>, éthers couronnes<sup>4</sup>), ces données peuvent avoir une importance considérable dans le domaine pharmaceutique.

Dans ce domaine, il est d'ailleurs possible d'imaginer une expérience sur une protéine cible sur laquelle on pourrait tester différents médicaments (qui auraient été préalablement

sélectionnés pour leurs activités biologiques) et observer les changements conformationnels induits<sup>5</sup>.

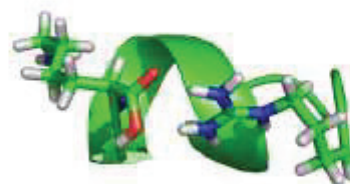
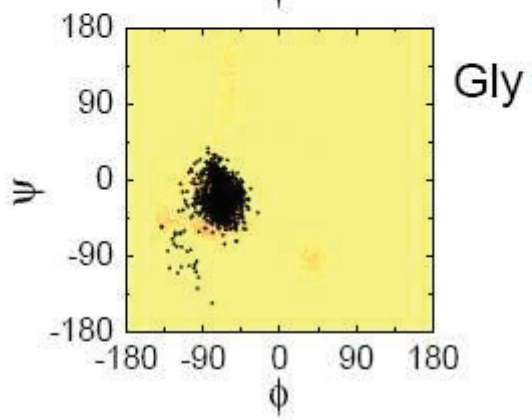
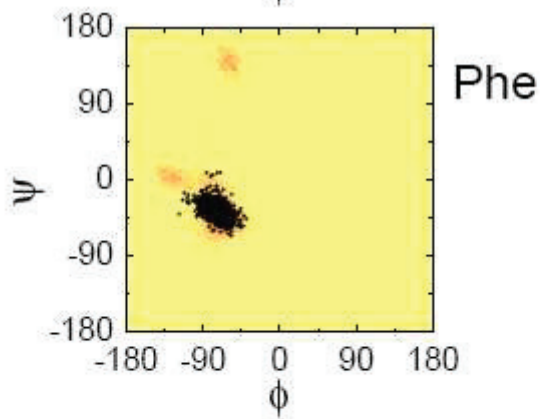
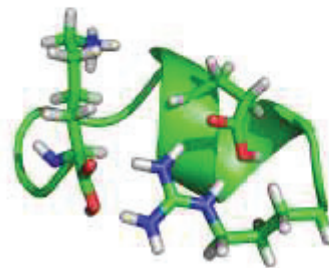
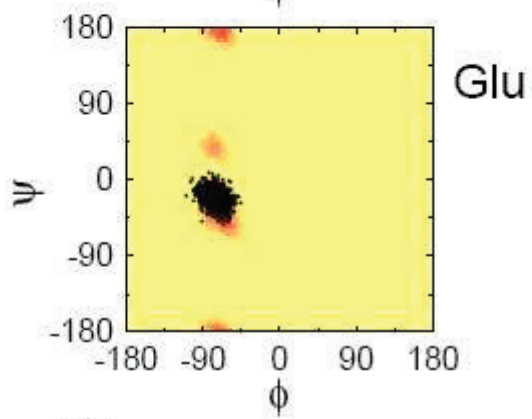
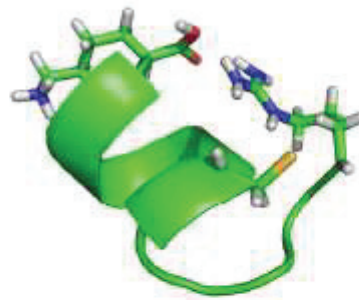
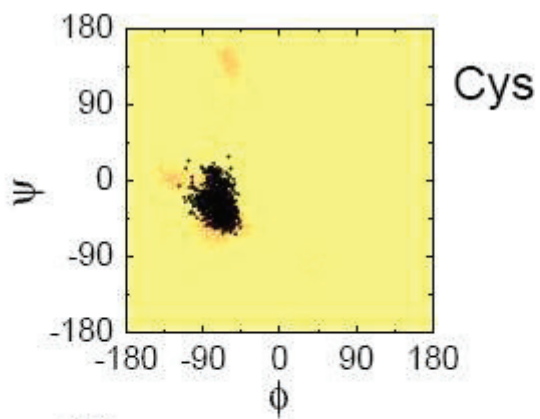
Pour poursuivre les études sur des systèmes biologiques, une étape incontournable est l'augmentation de la sensibilité de l'expérience. Un des points clefs pour gagner en signal est le développement d'un piège ionique plus efficace que celui qui a été développé durant ce travail de thèse. En utilisant la technologie des entonnoirs à ions, nous avons commencé à développer un entonnoir à ions couplé avec une zone de piégeage comme celui développé par Smith et al.<sup>6</sup> Le gain en sensibilité devrait permettre de travailler avec la résolution maximale de l'expérience.

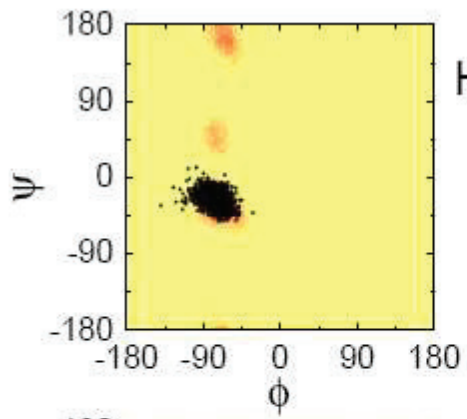
Afin de compléter les mesures de mobilité ionique, il apparaît intéressant de coupler ces observations avec d'autres techniques expérimentales qui permettent d'obtenir des informations structurales en phase gazeuse. Les méthodes de fragmentation induite par laser en spectrométrie de masse sont des méthodes de choix, c'est ce que nous avons commencé à faire avec le système oxytocine-Cuivre. On peut également citer les méthodes de fragmentation utilisant des électrons pour induire des fragmentations. Le tube de mobilité ionique placé en amont du spectromètre de masse permet de travailler sur des conformères résolus. Ainsi on peut étudier la réponse de ces derniers par différentes techniques. Un des aspects qui, peut être, est le plus prometteur, est l'utilisation de la mobilité ionique comme filtre conformationnel pour pouvoir faire de la spectroscopie d'action résolue en conformation. En effet dans le cas d'un système présentant plusieurs conformères, il est envisageable de coupler à l'expérience actuelle une optique ionique de stockage, à la sortie du tube de diffusion, où l'on pourrait accumuler un conformère et étudier sa réponse spectroscopique (IRMPD ou UVPD).

1. Dugourd, P., Hudgins, R. R., Clemmer, D. E. & Jarrold, M. F. High-resolution ion mobility measurements. *Review of Scientific Instruments* **68**, 1122-1129 (1997).
2. Saenger, W. Cyclodextrin Inclusion-Compounds in Research and Industry. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **19**, 344-362 (1980).
3. Danylyuk, O. & Suwinska, K. Solid-state interactions of calixarenes with biorelevant molecules. *Chemical Communications*, 5799-5813 (2009).
4. Muzzalupo, R. et al. A new crown ether as vesicular carrier for 5-fluoruracil: Synthesis, characterization and drug delivery evaluation. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **58**, 197-202 (2007).
5. Allan, G. F. et al. Hormone and Antihormone Induce Distinct Conformational-Changes Which Are Central to Steroid-Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 19513-19520 (1992).
6. Clowers, B. H. et al. Enhanced ion utilization efficiency using an electrodynamic ion funnel trap as an injection mechanism for ion mobility spectrometry. *Analytical Chemistry* **80**, 612-623 (2008).

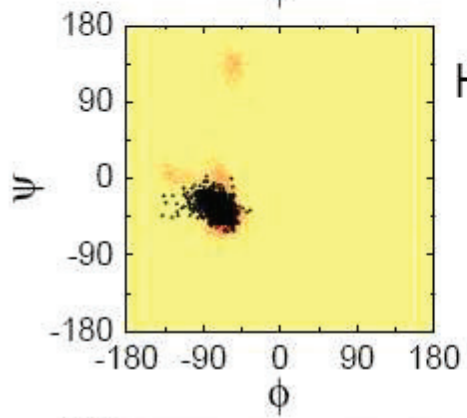
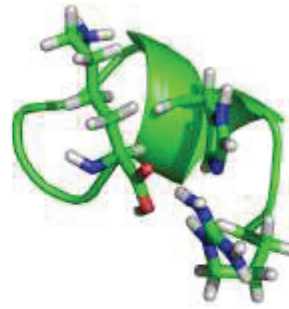
**ANNEXE 1 : Structure et diagramme de Ramachandran de la série des polyalanines**



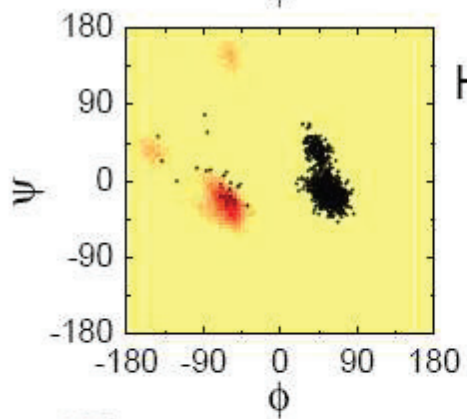
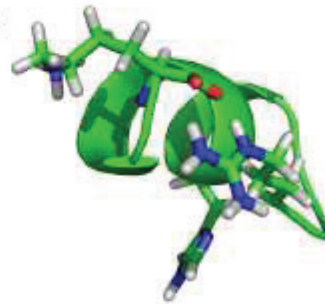




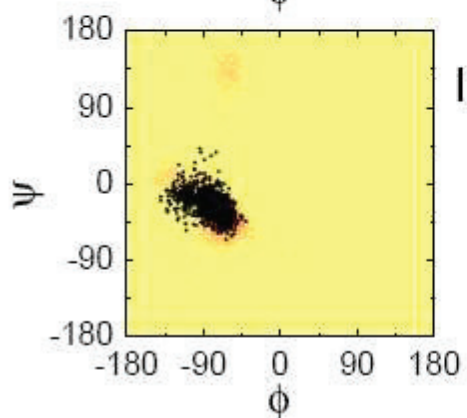
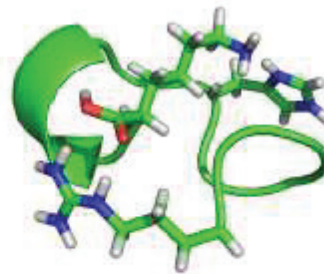
His(0 a)



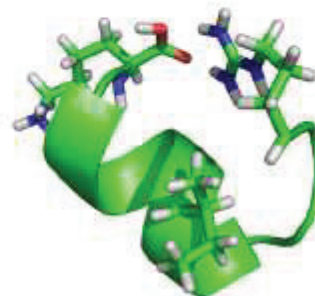
His(0 b)

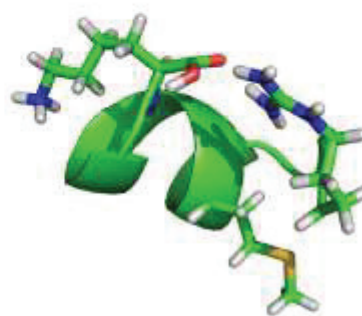
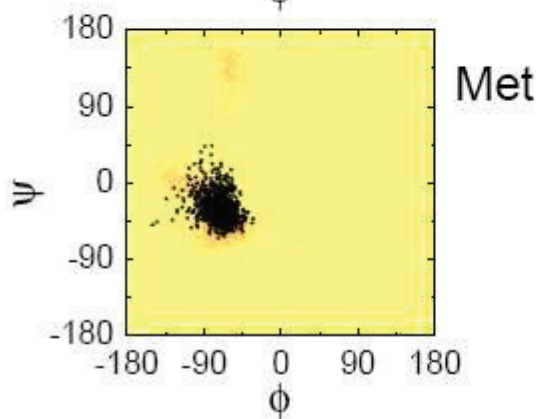
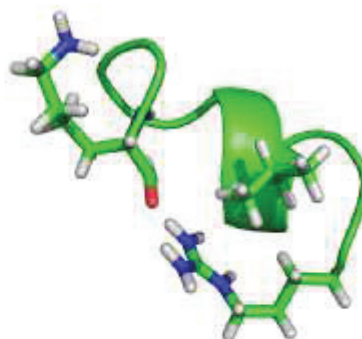
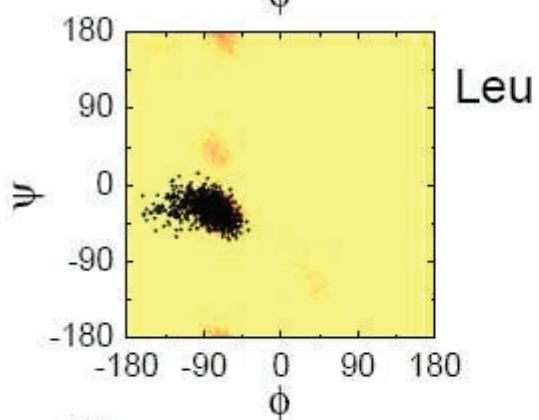
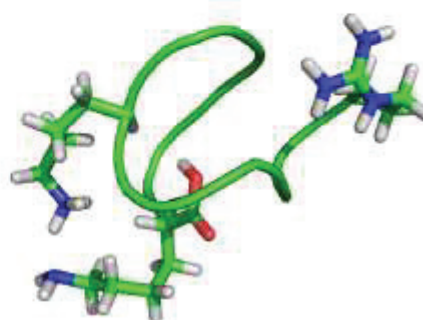
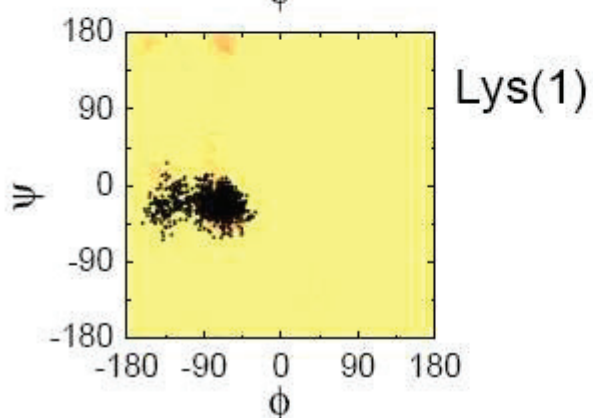
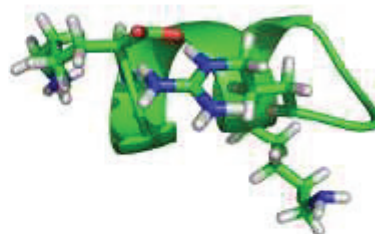
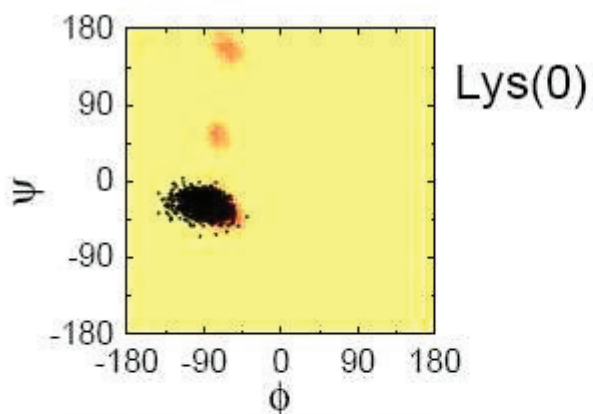


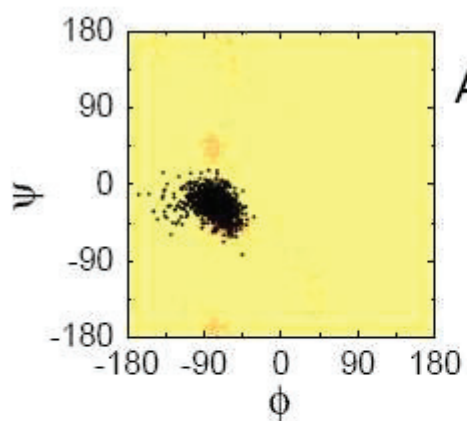
His(1)



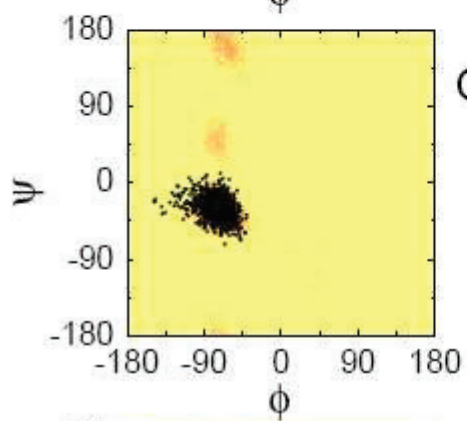
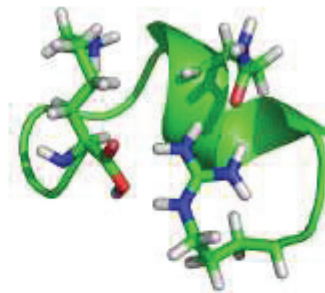
Ile



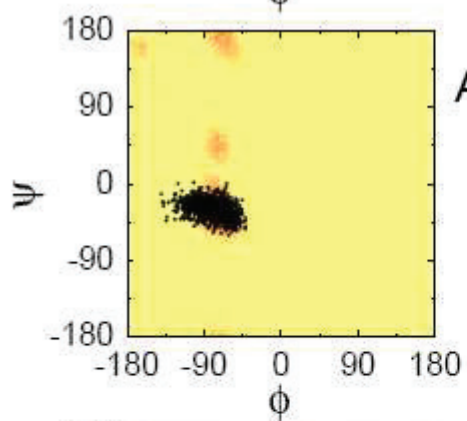
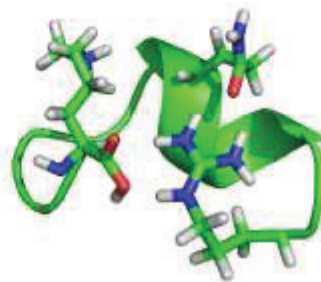




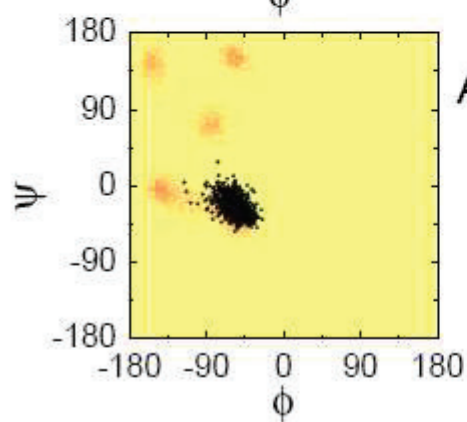
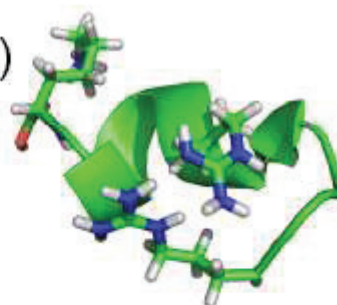
Asn



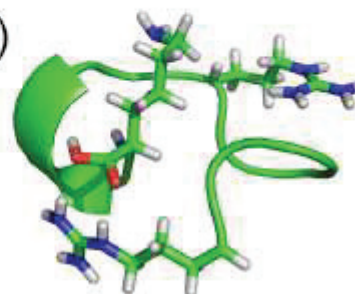
Gln

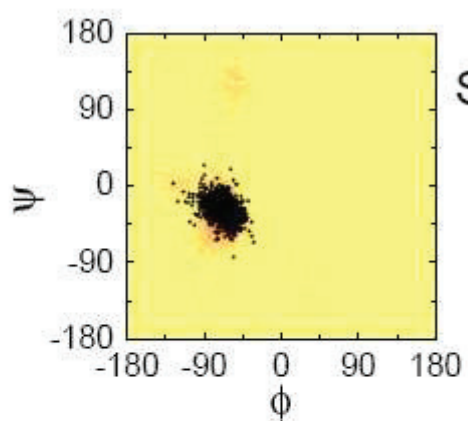


Arg(0)

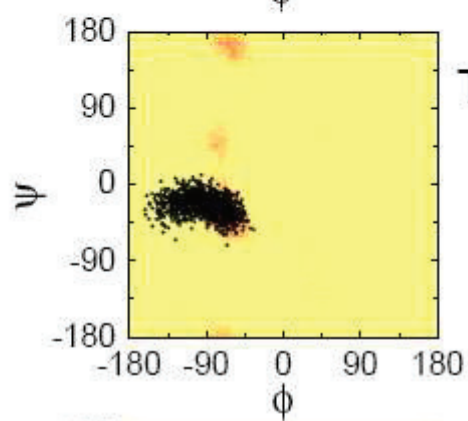


Arg(1)

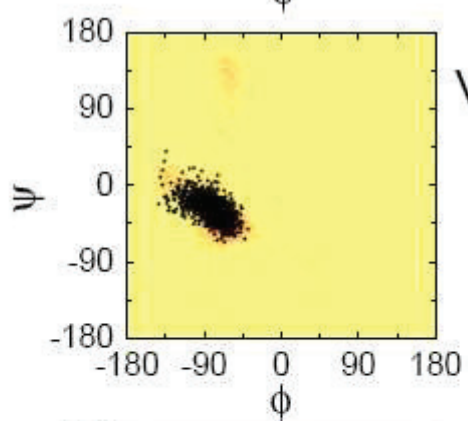




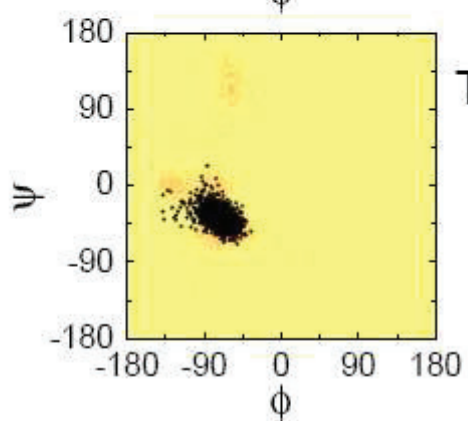
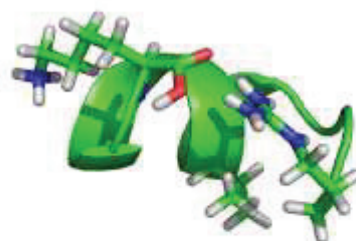
Ser



Thr



Val

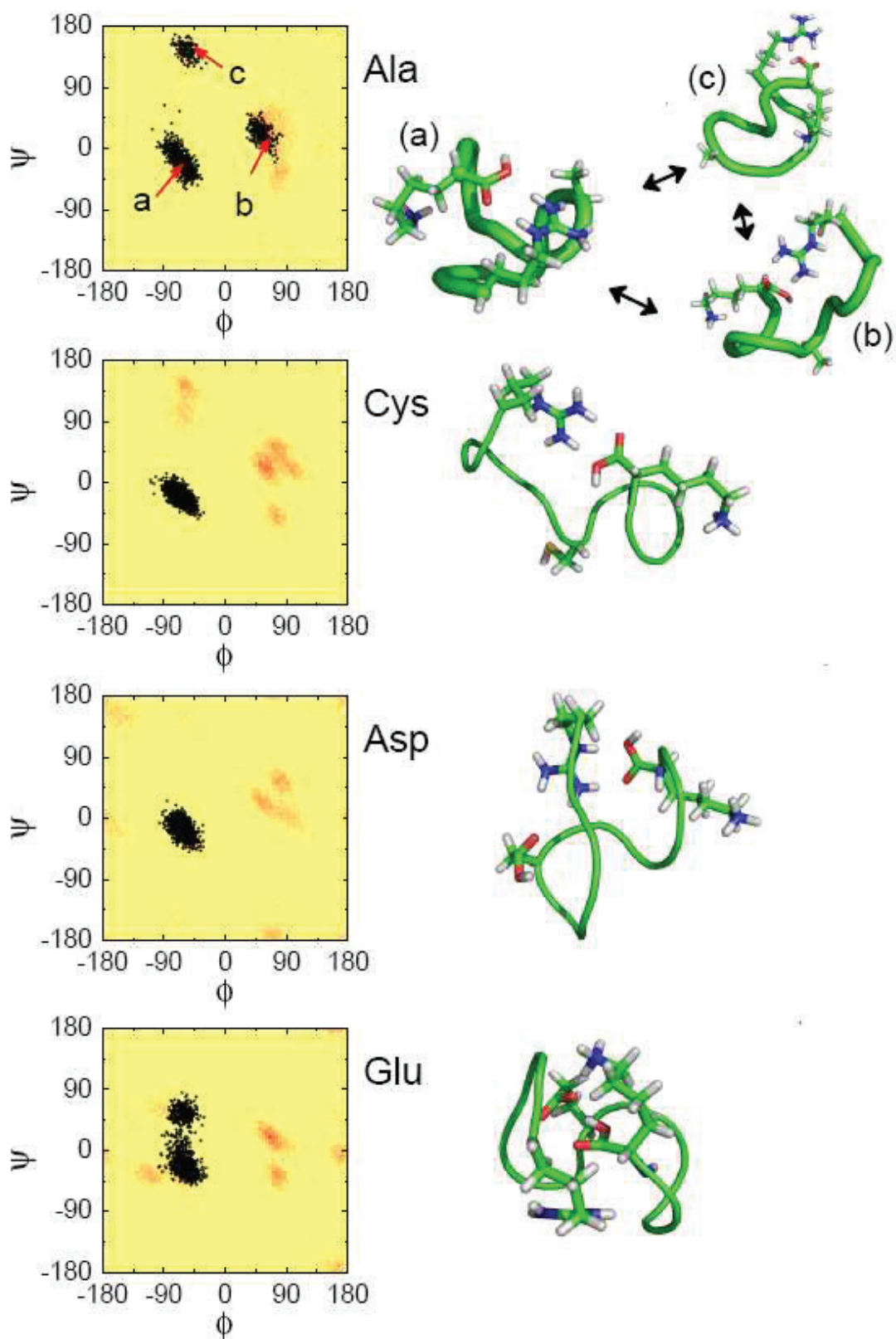


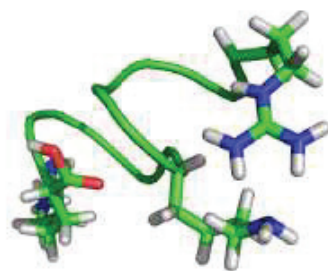
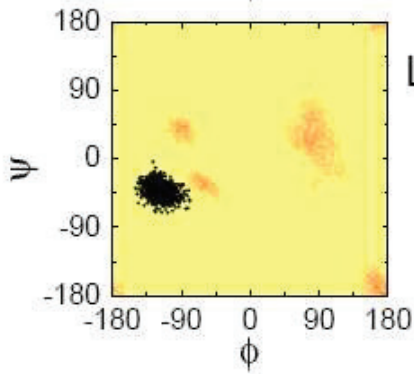
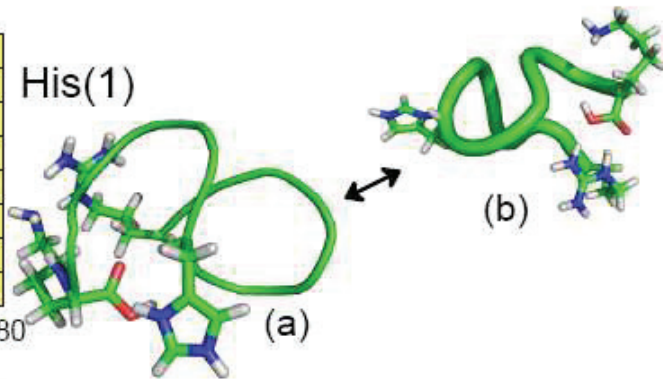
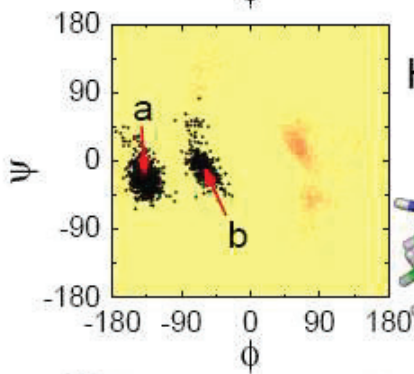
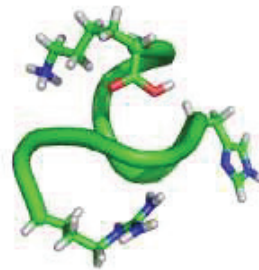
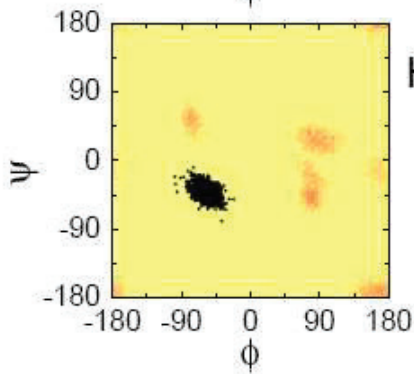
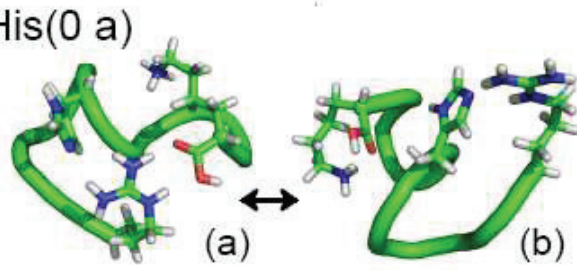
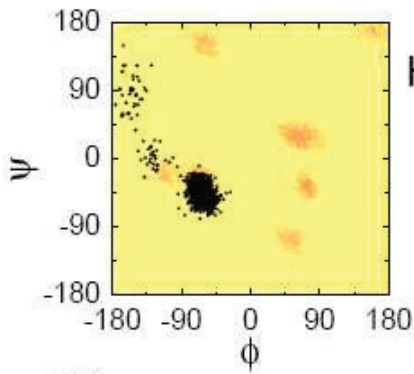
Tyr



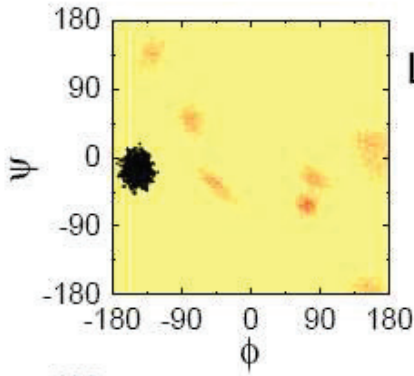
**ANNEXE 2 : Structure et diagramme de Ramachandran de  
la série des polyglycines**



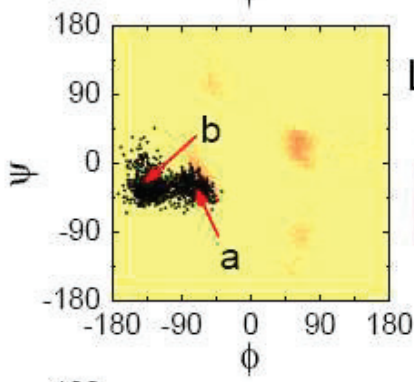
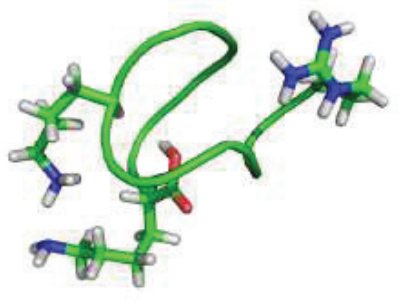




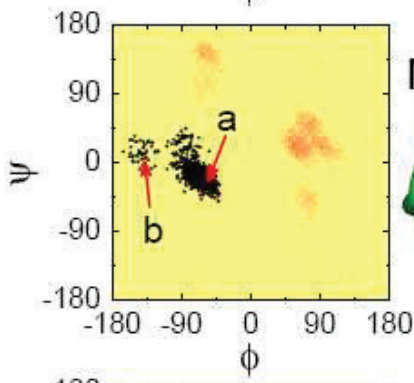
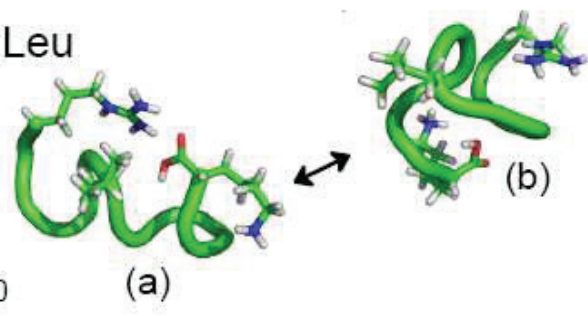




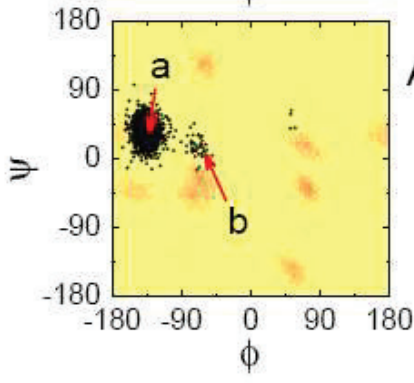
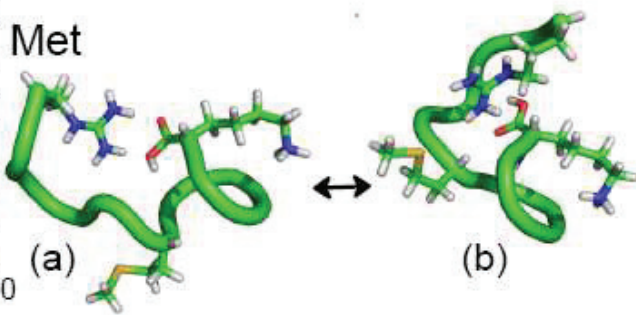
Lys(1)



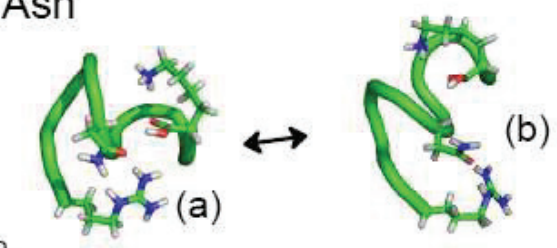
Leu

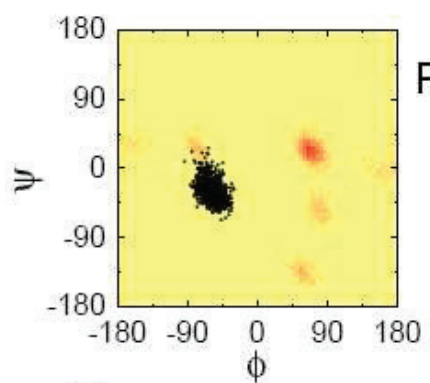


Met

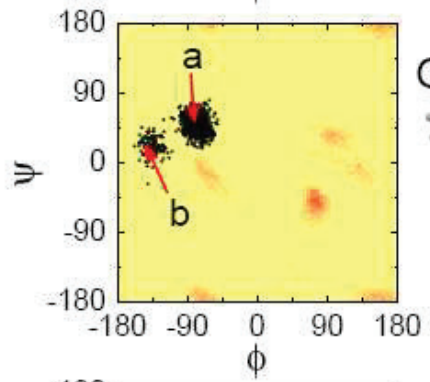
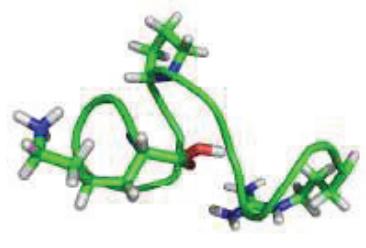


Asn

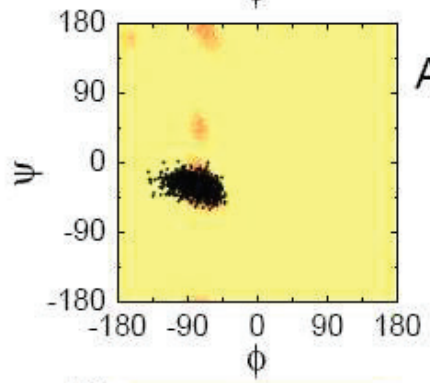
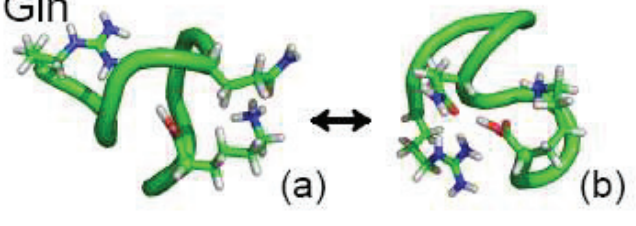




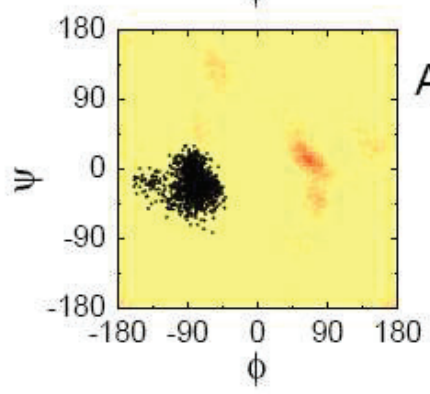
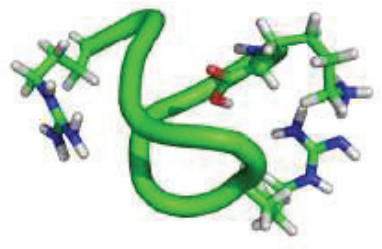
Pro



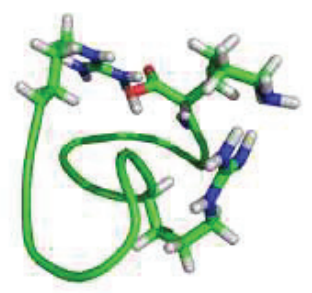
Gln

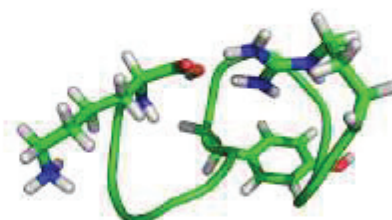
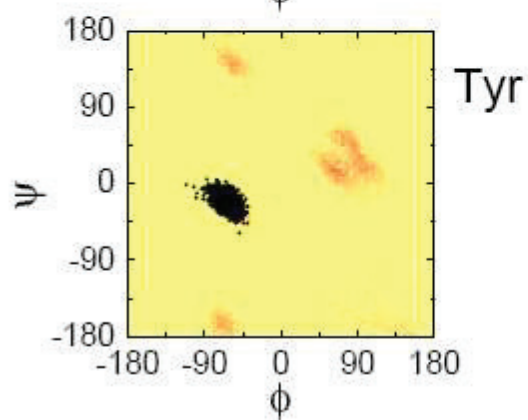
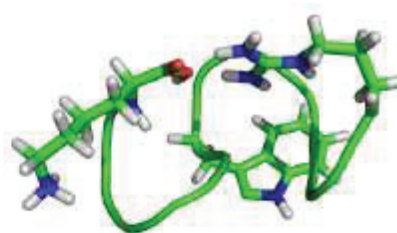
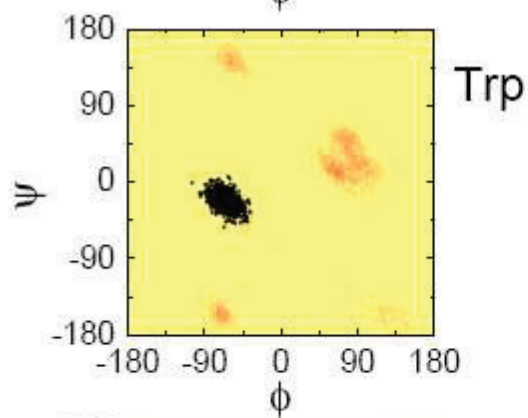
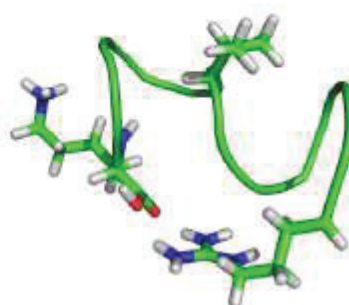
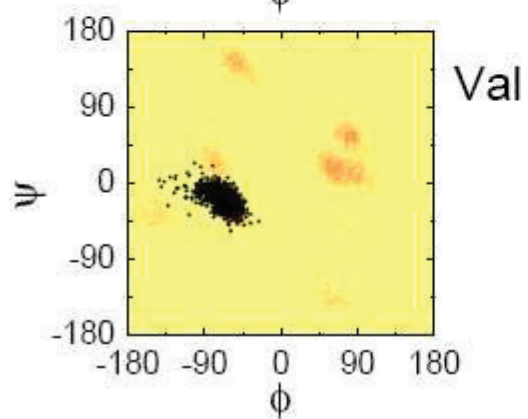
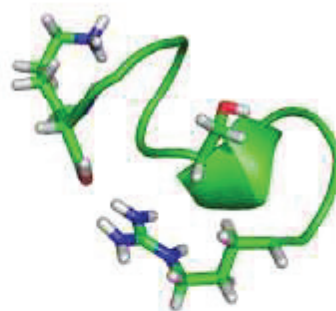
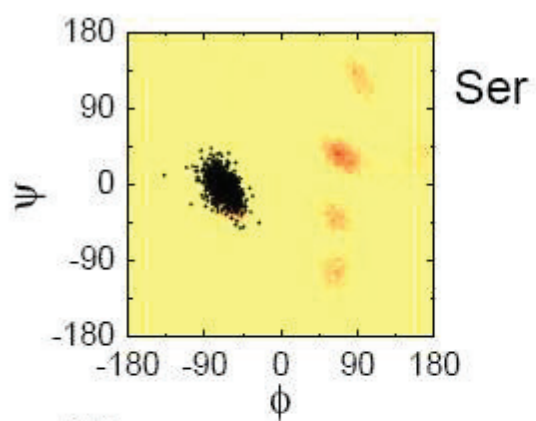


Arg(0)

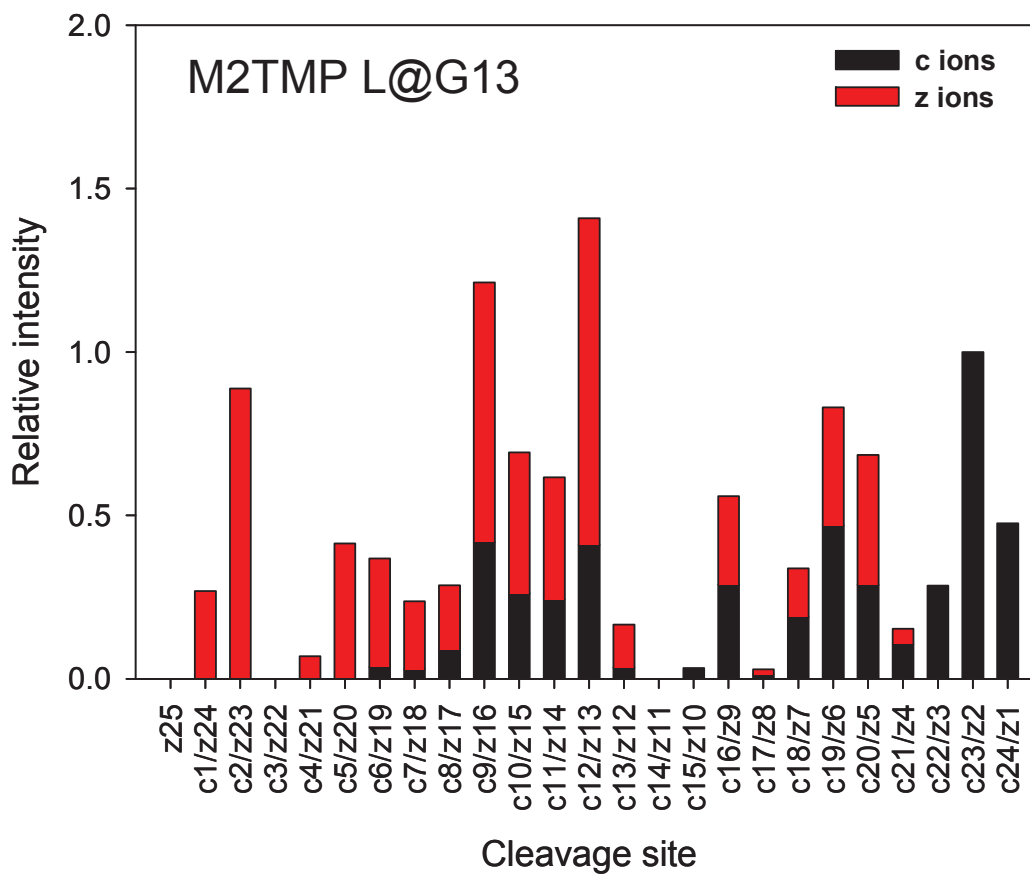
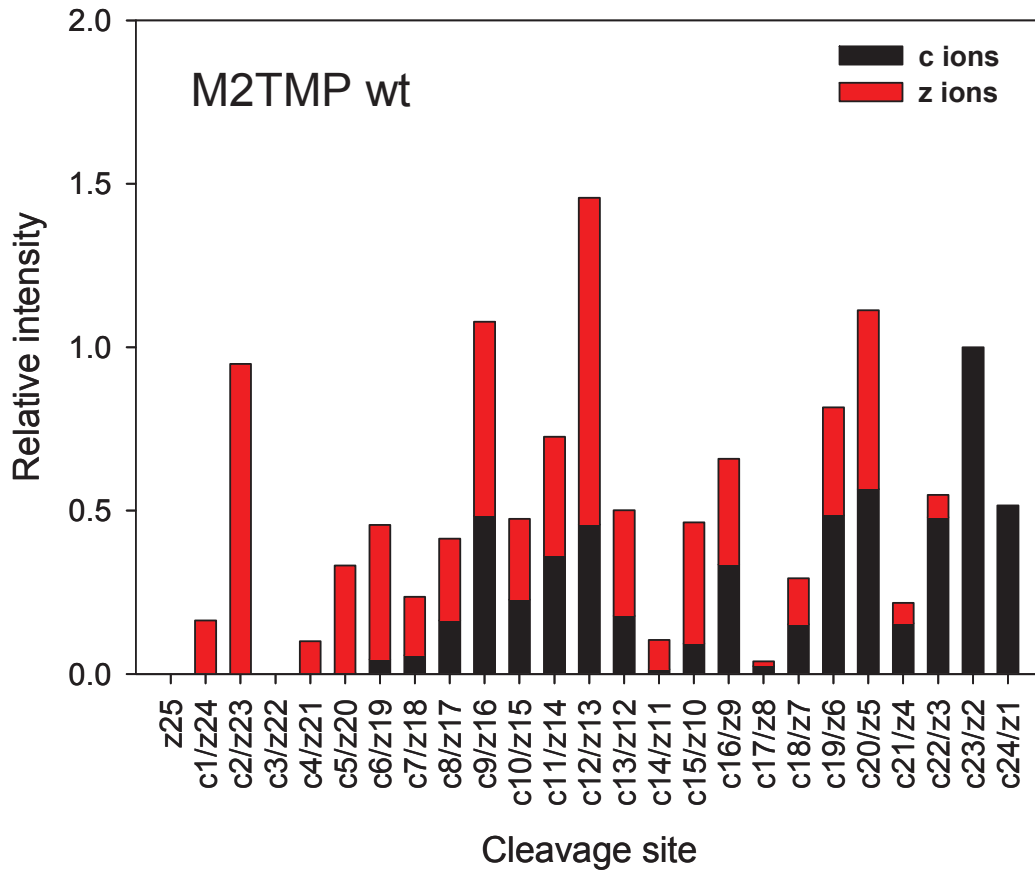


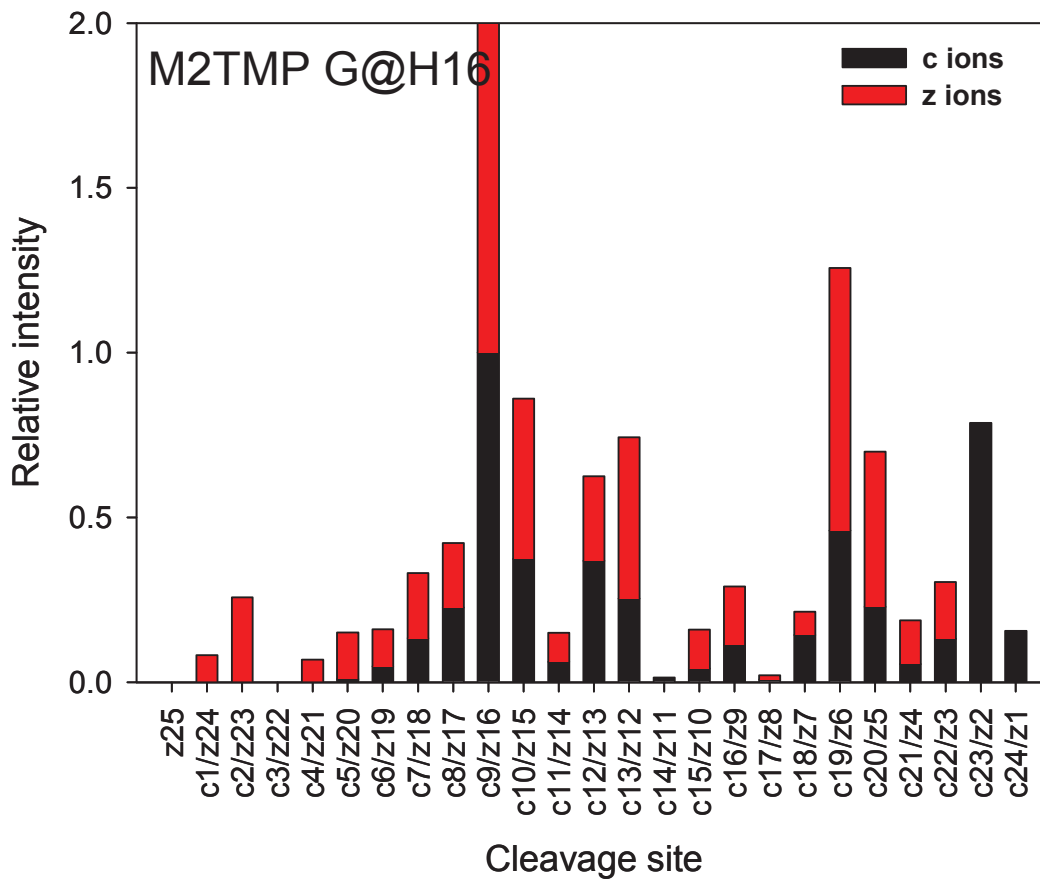
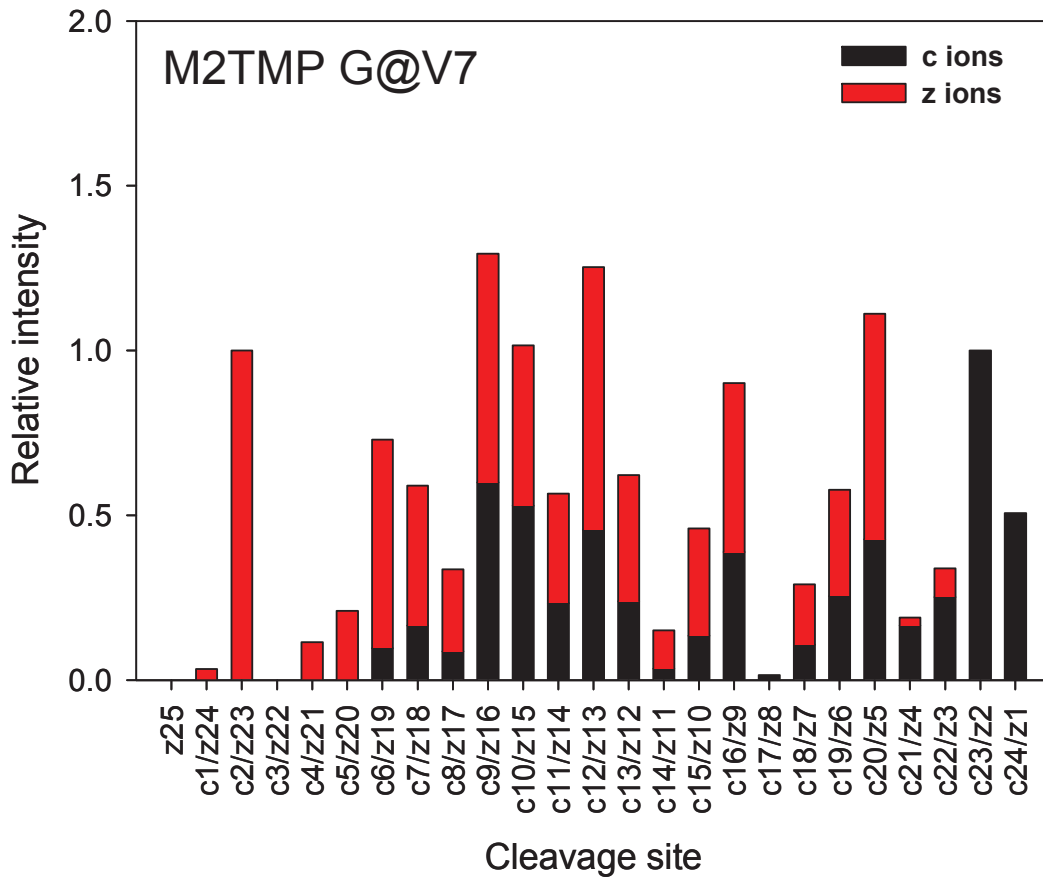
Arg(1)

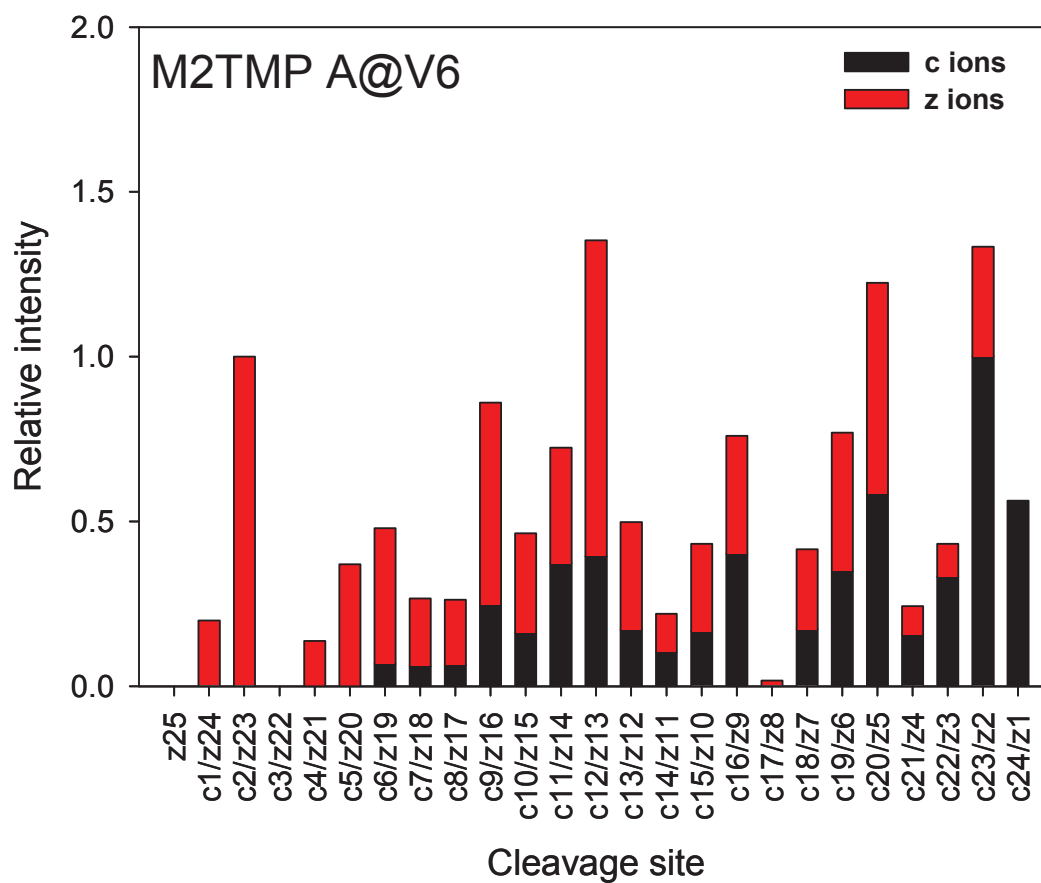
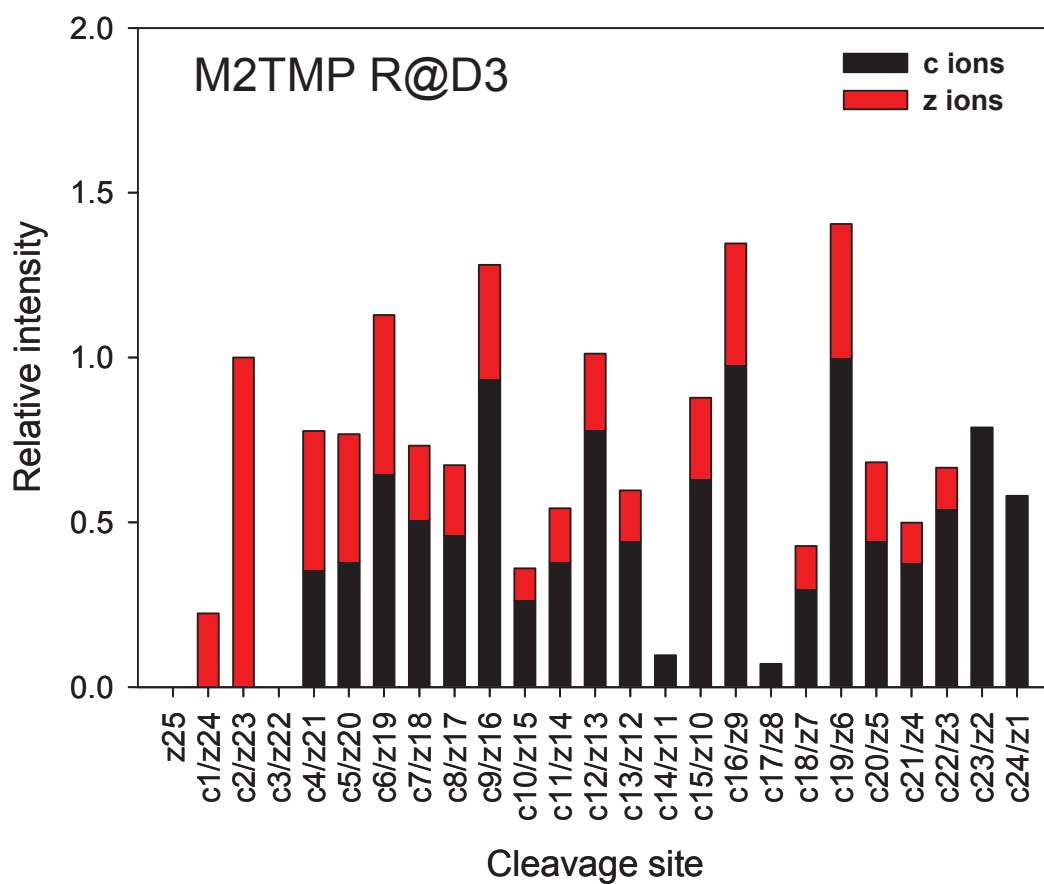


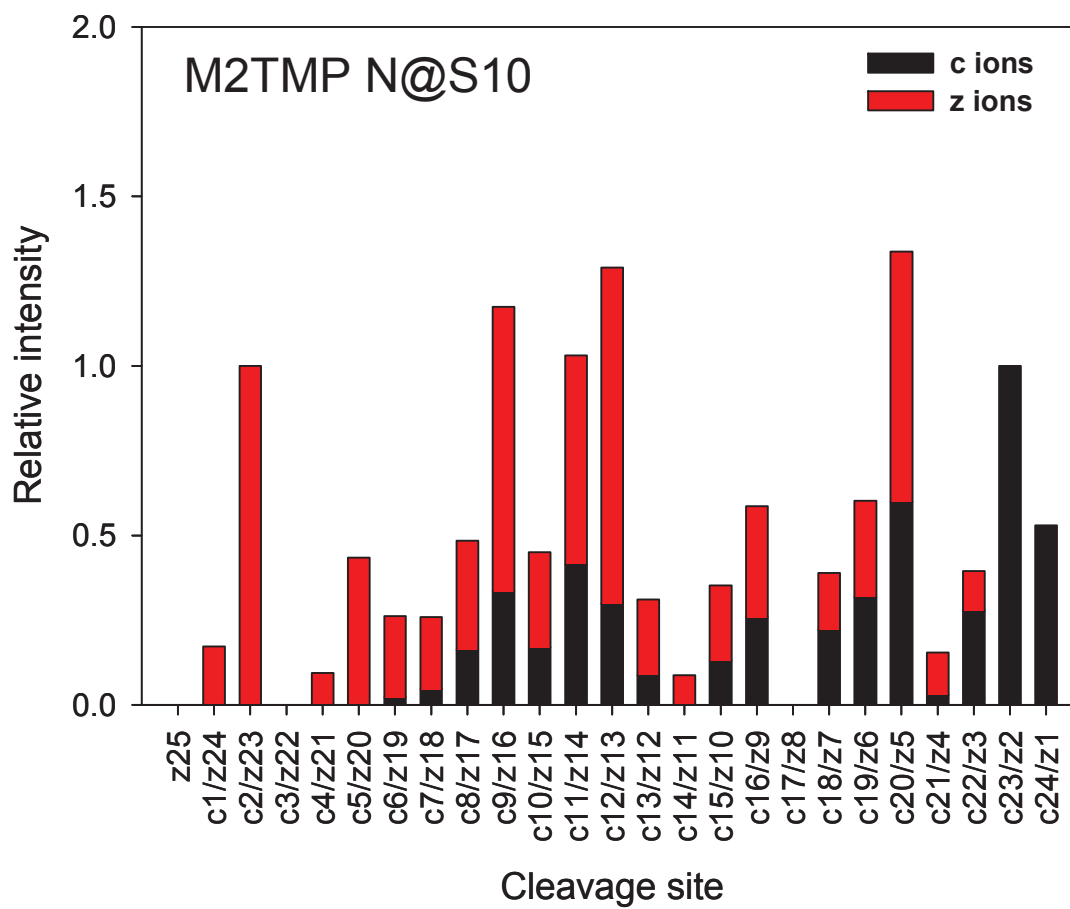


**ANNEXE 3 : Diagrammes de fragmentation ECD pour la partie transmembranaire de la protéine M2 et de certains variants.**













## **ANNEXE 4 : Publication Ocytocine-cuivre**

## Optical and Structural Properties of Copper–Oxytocin Dications in the Gas Phase

Laure Joly,<sup>†</sup> Rodolphe Antoine,<sup>\*,†</sup> Florian Albrieux,<sup>†</sup> Renaud Ballivian,<sup>‡</sup> Michel Broyer,<sup>†</sup> Fabien Chirof,<sup>‡</sup> Jérôme Lemoine,<sup>‡</sup> Philippe Dugourd,<sup>†</sup> Claudio Greco,<sup>§</sup> Roland Mitrić,<sup>||</sup> and Vlasta Bonačić-Koutecký<sup>§</sup>

Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire (UMR 5579) and Sciences Analytiques (UMR 5180), CNRS, Université Lyon 1, F-69622 Villeurbanne, France, Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin, Brook-Taylor-Strasse 2, 12489 Berlin, Germany, and Fachbereich Physik, Freie Universität Berlin, Arnimallee, 14, D-14195 Berlin, Germany

Received: April 23, 2009; Revised Manuscript Received: June 16, 2009

We present a joint experimental and theoretical investigation of the structural and optical properties of copper–oxytocin dications in the gas phase. Ion mobility and UV photodissociation experiments were performed, allowing the investigation of the influence of the Cu<sup>2+</sup> ion on the structural and optical properties of oxytocin. Density functional theory calculations were performed to find low energy structures for the bare and complexed peptide and to characterize optical spectral features. Copper complexation induces a drastic change in the structure of the oxytocin peptide. In particular, we predict a 4N chelation of the copper cation which leads to a contraction of the oxytocin ring. The gas phase lowest-energy structures are compared with the X-ray crystal structure of the oxytocin molecule bound to its receptor protein. The optical spectrum of oxytocin complexed with the copper cation displays a global enhancement of the photofragmentation yield as compared to the one recorded for the doubly protonated oxytocin. Moreover, experimental and calculated optical spectra of protonated tyrosine have also been determined, since its leading features are present in oxytocin as well.

## 1. Introduction

The complexation of metal ions with proteins plays crucial physiological roles.<sup>1,2</sup> In particular, metal ions can enhance the structural stability of a protein in the conformation required for biological activity. They take part in catalytic processes of enzymes and can also influence optical properties of proteins.<sup>3,4</sup> The structure, optical properties, and biological function of the complex are directly related to the binding between the metal and the protein and may also involve electronic excited states of the embedded metal.

Metal–oxytocin (OT) complexes have been investigated intensively as suitable model systems for studying the influence of metal ions on a peptide conformation. The biological activity of peptide hormones depends on their structural and conformational properties.<sup>5–9</sup> The crystal structure of the OT hormone complexed with its receptor protein neurophysin has been determined,<sup>10</sup> which has permitted the elucidation of the key residues that are involved in the hormone–receptor recognition. Moreover, it was shown that the presence of a divalent transition metal ion dramatically enhances the binding properties of OT to its cellular receptor.<sup>11</sup> Following this observation, numerous investigations, in particular potentiometric and photospectrometric studies, were performed on the metal–OT complexes.<sup>12–16</sup> The drawback of these experiments is that it is difficult to characterize the structure, in particular the stoichiometry, of the complexes which properties are measured and to evaluate the role of surrounding ions and solvent molecules.

Intrinsic chemical interactions can be investigated either theoretically by using first principle calculations or experimentally by using gas-phase approaches. Mass spectrometry based techniques have been successively used to transfer transition metal–OT complexes to the gas phase.<sup>17–19</sup> A fundamental understanding of the structural changes induced in OT by divalent metal ion coordination has been obtained by coupling mass spectrometry and ion mobility techniques.<sup>20,21</sup> Recently, we used gas phase UV spectroscopy to evaluate the influence of copper complexation on the optical spectra of OT peptide dianions.<sup>22</sup> In particular, UV spectra provided a direct diagnostic of the ionization state of the tyrosine residue in the complex.<sup>23</sup>

In recent years, density functional theory (DFT) calculations have provided a reliable description of structural and dynamical properties of the ground state of different complexes of copper ions and proteins.<sup>24–26</sup> Implementation of the time-dependent density functional theory (TDDFT) enabled the determination of absorption properties for fairly large molecules. Alternative approaches for calculating the ground state electronic structure and the optical response for metal–protein systems include semiempirical approaches and the hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) method, with TDDFT for the QM part.<sup>3,27</sup>

In the present work, we have performed a joint experimental and theoretical investigation of both structural and optical properties of doubly protonated OT and OT complexed with Cu(II) ions. We used ion mobility measurements and UV photodissociation experiments. These experimental approaches permit the investigation of the influence of the Cu<sup>2+</sup> ion on the structural and optical properties of OT. DFT calculations were performed to find how metal ions affect the peptide conformation. In the example of TyrH<sup>+</sup>, which is the aromatic amino acid present in OT, we compared three different theoretical

\* E-mail: ran@istm.univ-lyon1.fr.

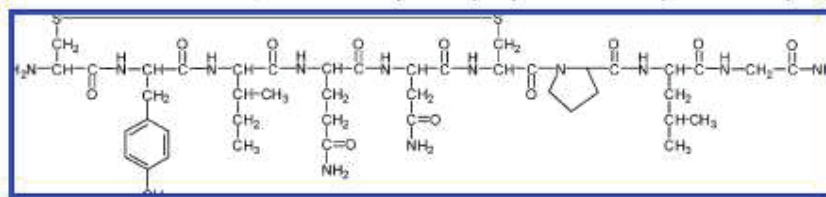
† Université de Lyon, LASIM (UMR 5579), CNRS.

‡ Université de Lyon, Sciences Analytiques (UMR 5180), CNRS.

§ Humboldt-Universität zu Berlin.

|| Freie Universität Berlin.



SCHEME 1: Chemical Structure of OT (Amino Acid Sequence Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH<sub>2</sub>)

approaches for the determination of absorption spectra: the ab initio approximate resolution-of-the-identity second order coupled cluster (RI-CC2),<sup>28,29</sup> the Semiempirical ab initio Model I (SAM1),<sup>30,31</sup> and the density functional linear response TDDFT approach.<sup>32</sup>

## II. Methods

**Sample Preparation.** OT, which sequence is given in Scheme 1, was purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Copper chloride (CuCl<sub>2</sub>) is high-purity crystal grade, and solvents are HPLC grade. The electrospray solution was prepared by dissolving the peptides (50 μM) and the copper chloride (200 μM) in a 1:1 mixture of water and acetonitrile. The addition of 1.5% acetic acid yielded a pH of 3–4. With these conditions, the [OT + H]<sup>+</sup> and [OT - H + Cu]<sup>+</sup> monocations and the [OT + 2H]<sup>2+</sup> and [OT + Cu]<sup>2+</sup> dications were observed in the positive ion electrospray mass spectrum.

**Mass Spectrometry and Laser Irradiation of Trapped Ions.** The experimental setup<sup>33</sup> consists of a commercial LCQ Duo quadrupole ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA) coupled to a Panther<sup>TM</sup> optical parametric oscillator laser pumped by a 355 nm Nd:YAG PowerLite<sup>TM</sup> 8000 (5 ns pulse width, 20 Hz repetition rate). Scanning was performed in the 230–315 nm UV range after frequency doubling. The vacuum chamber and the central ring electrode of the mass spectrometer were modified to allow the injection of the light at the center of the trap. An electromechanical shutter triggered on the radio frequency (RF) signal of the ion trap synchronizes the laser irradiation with the trapping of the ions. The ions are injected into the trap, mass selected, and then laser irradiated for 60 laser shots. Fragmentation spectra are systematically recorded as a function of the laser wavelength. The photofragmentation yield is given by  $\ln(\text{parent} + \text{fragment})/\text{parent}/\lambda P_l$  where  $\lambda$  is the laser wavelength and  $P_l$  is the laser power.

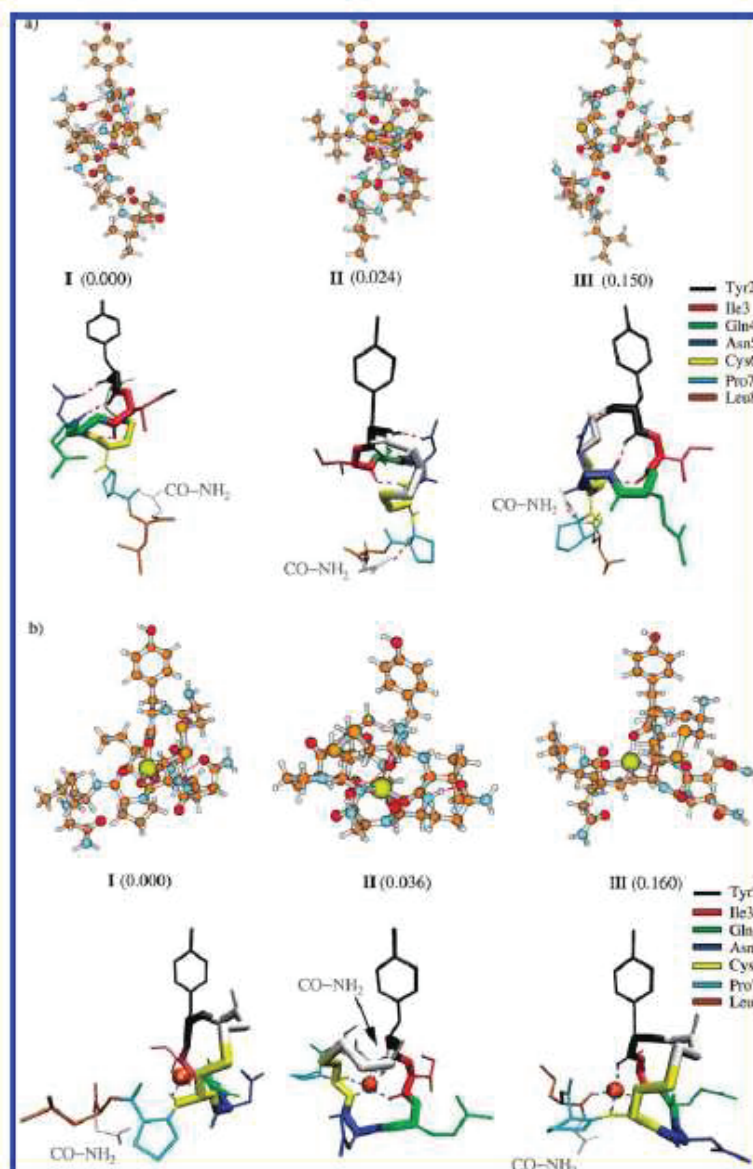
**Ion Mobility Experiments.** We used a custom-built ion mobility mass spectrometer to measure collision cross sections. Briefly, ions are formed by electrospray ionization (ESI) and transferred to the drift tube through an ion funnel and a RF cylindrical ion trap (CIT). The CIT is used to convert the continuous beam of ions provided by the source into short pulses of bunched ions. The ion packets are periodically injected into a 1 m long drift cell filled with 11.6 Torr of helium and maintained at 293 K. Ions are pulled through the cell under the influence of a weak direct current (DC) electric field. A second ion funnel is used to focus the diffuse ion packet at the exit of the drift tube. Ions exit this second ion funnel into a vacuum chamber through a 0.7 mm diameter aperture and are conveyed into the quadrupole time-of-flight mass spectrometer (microTOF<sub>0</sub>, Bruker) by a series of two ion funnels and detected as a function of their arrival time. The ion mobility and ion–helium collision cross section are deduced from the ion arrival time distributions (ATDs) recorded at different drift cell

voltages. Experiments were calibrated using the published cross section value for bradykinin ions.<sup>34</sup> The experimental precision on the cross section is estimated to ~2%. The width of ATDs was in agreement with the width expected for a single averaged ion structure<sup>35</sup> and led to a resolving power of  $t/\Delta t = 25$  (where  $t$  is the drift time and  $\Delta t$  is the width of the peak at half height). Experimental drift time was in the order of 44 ms for a drift voltage of 820 V.

**Computational Methods.** The search for geometries of doubly protonated OT [OT + 2H]<sup>2+</sup> and its complex with copper [OT + Cu]<sup>2+</sup> has been carried out using simulated annealing in the framework of semiempirical molecular dynamics (MD) simulations. The standard AM1 parametrization<sup>36</sup> has been used for the organic part, while for copper the AM1d set of parameters has been employed.<sup>37</sup> The annealing procedure has been carried out starting at  $T = 1500$  K and gradually cooling the system down to  $T = 300$  K. The structures obtained in this way were subsequently reoptimized at the DFT level using the BP86 functional<sup>38,39</sup> and TZVP atomic basis sets.<sup>40</sup> The character of stationary points has been checked by the analytic frequency calculations. The absorption spectra have been calculated using TDDFT employing the 6-31G\*\* basis set and the hybrid B3-LYP exchange-correlation functional.<sup>41,42</sup> Since TyrH<sup>+</sup>, [OT + 2H]<sup>2+</sup>, and [OT + Cu]<sup>2+</sup> are extended systems in which long-range charge transfer (CT) excitations can take place, we have checked the reliability of the TDDFT results by calculating the  $\Lambda$ -index introduced by Helgaker et al.<sup>43</sup> This parameter probes the modulus of the spatial overlap between occupied and virtual orbitals involved in the given electronic transition. Small  $\Lambda$ -values indicate a low overlap and therefore large long-range CT character. According to the test calculations, in these cases the transition energies are significantly underestimated indicating the failure of the TDDFT. To illustrate this, we calculated absorption patterns for TyrH<sup>+</sup> using the RI-CC2 and SAM1 methods and compared them with the TDDFT results.

## III. Results

**A. Structural Properties.** We present in Figure 1 the three lowest energy structures for (a) [OT + 2H]<sup>2+</sup> and (b) [OT + Cu]<sup>2+</sup> obtained from DFT calculations together with a schematic presentation allowing for the discussion of structural properties. The dihedral angles diagram of the peptide backbone for all three structures of [OT + 2H]<sup>2+</sup> and [OT + Cu]<sup>2+</sup> shown in Figure 2 permits the identification of the relative structural differences between the structures of both species as well as differences introduced by copper complexation. For [OT + 2H]<sup>2+</sup>, the three structures differ mainly by the relative orientations of residue side chains such as Tyr2, Ile3, and Asn5 as well as by the position of CONH<sub>2</sub> group in the Gly9 residue, as can be depicted from Figure 1a. The changes of the backbone in different structures of [OT + 2H]<sup>2+</sup> can be seen from the left side of Figure 2. For example, differences in the dihedral angles of Pro7 and Asn5 are more pronounced than for the other



**Figure 1.** Lowest energy structures obtained from DFT calculations (upper half) and schematic structural presentation (lower half) for (a)  $[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$  and (b)  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$ . The relative stabilities of the structures are given in eV in brackets. In the schematic presentation, the legend with color codes for the residues is given. Bonds defining the 20 member OT ring are represented by thicker lines. Dashed red lines label hydrogen bonds in (a). Blue dashed lines label the coordination with the copper atom in (b).

residues. The hydrogen bonding patterns of  $[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$  structures are very similar since the binding to the same residues in the OT ring occurs (compare Figure 1a). In fact, three conserved hydrogen bonds arise among Tyr2, Ile3, Asn5, and Cys6. Notice that the second and third structures of  $[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$  contain an additional hydrogen bond between the protonated amine group of Pro7 and the amidated C-terminus of the peptide. For all of the three structures, the side chain of Tyr2 points away from the hormone ring.

Dramatic change in the conformation of OT occurs by coordination to  $\text{Cu}(\text{II})$ , as can be seen from Figure 1b. For the three lowest energy structures, the  $\text{Cu}^{2+}$  ion is found to be chelated by the backbone carbonyl oxygen of the OT ring. For structure I, the  $\text{Cu}^{2+}$  is found to be chelated by three carbonyl oxygens, while in two other structures (II and III) it is chelated by four carbonyl oxygens. In structure II, the  $\text{Cu}^{2+}$  ion forms a distorted trigonal bipyramidal complex with four oxygens of the backbone carbonyls which belong to Tyr2, Ile3, Cys6, and



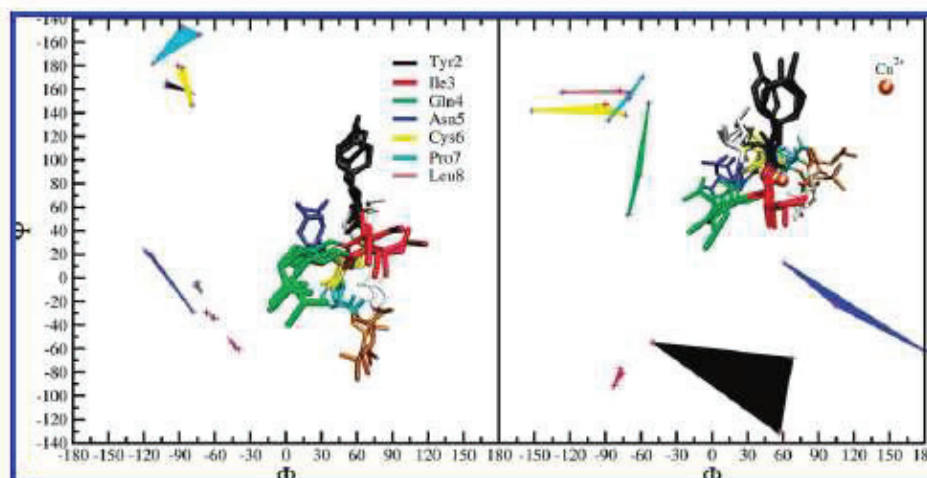


Figure 2. Superimposed plot of backbone dihedral angles  $\Phi$  and  $\Psi$  for three structures of  $[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$  (left) and for the  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$  complex (right). The areas connecting the three structures for each residue are shown using the color code of the legend.

Gly9 and with the N-atom of Cys6 at the distance of 2.43 Å, indicating weaker interaction. The average of the Cu–O distance is 2.07 Å which compares well with the sum of copper and oxygen ionic radii, which is 2.14 Å. The “five-fold” coordination of  $\text{Cu}^{2+}$  with OT in structure II induces closer vicinity of side chains of Ile3, Gln4, and Asn5 to form a cohesive, contracted 20-member disulfide-containing ring, as can be depicted from Figure 1b. Because of the key position of Tyr2,<sup>10</sup> special attention has been paid to its side chain orientation relative to the OT ring. For structures I and III, the side chain of Tyr2 points away from the hormone ring, while for structure II, the aromatic ring of Tyr2 moves closer toward the top of the OT ring. Furthermore, for structures II and III the acyclic  $\text{CONH}_2$ -terminal tripeptide moiety points toward the  $\text{Cu}^{2+}$  chelated ring. This enhances the structural compactness of Cu complexes with respect to diprotonated OT. The differences in structural properties of three OT–Cu complexes can be easily seen from the dihedral angles diagram on the right side of Figure 2. The main differences are found for Tyr2 and Asn5, while smaller deviations occur for Gln4. Comparison of the dihedral angle plots of  $[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$  with  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$  shows that only the conformations of the Cys6, Pro7, and Ile3 residues do not undergo considerable changes due to complexation with copper.

In contrast to  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$  structures, the previously reported  $[\text{OT} + \text{Zn}]^{2+}$  structures<sup>21</sup> contain octahedrally coordinated  $\text{Zn}^{2+}$  ions. Moreover, in  $[\text{OT} + \text{Zn}]^{2+}$  the N-terminal amine group behaves as a competitive ligand, while in  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$  this group is never coordinated to the copper center. However, nitrogen–metal bonding interaction also takes place in structure II of  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$ , but in this case the nitrogen atom of Cys6 is involved in the copper coordination by a weak interaction as described above.

We calculated the average value of the collision cross sections for the series of structures obtained during MD runs at 300 K starting from the lowest-energy structures of  $[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$  and  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$ . Structures were extracted every 100 steps. The average values correspond to panels of 100 (50) structures for  $[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$  ( $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$ ) along the MD trajectory. For the cross-section calculation, we used the projection approximation (PA)<sup>44</sup> which treats the atoms as hard spheres. We used 3.5 Å for the  $\text{Cu}^{2+}$  collision radius. Experimental and calculated cross

TABLE 1: Comparison of Experimental and Calculated Cross Sections<sup>a</sup>

peptide	exp. cross section $\Omega_{\text{exp}}$ (Å <sup>2</sup> )	calc. cross section $\Omega_{\text{calc}}$ (Å <sup>2</sup> )
$[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$	$246 \pm 5$	251.7
$[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$	$235 \pm 5$	234.3

<sup>a</sup> See text for details.

sections for  $[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$  and  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$  ions are given in Table 1. A good agreement between experimental and calculated values is observed. It can be seen that the cross section of  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$  is lower than the one measured for  $[\text{OT} + 2\text{H}]^{2+}$ . This decrease in the cross section, well-reproduced by the calculations, arises mainly from the contracted structure induced by the chelation of the copper by the OT ring in OT. Notice also that the experimental cross section for  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$  is very close to the one measured for  $[\text{OT} + \text{Zn}]^{2+}$  ( $232 \pm 3$  Å<sup>2</sup>),<sup>21</sup> indicating that, in the gas phase, both complexes adopt compact structures with a high coordination of the OT ring.

**B. Optical Properties.** As already mentioned, OT is a nonapeptide that possesses a tyrosine residue. Tyrosine is an aromatic amino acid with optical absorption in the near UV range. The optical properties of  $[\text{OT} + \text{Cu}]^{2+}$  are the result of several contributions including transitions localized on the tyrosine residue, on the “embedded” copper, and of CT excitations among copper, the peptide backbone, and the tyrosine. Thus, before addressing the optical properties of the OT peptide with or without complexation with copper, we wish to present the experimental and theoretical investigations of the optical properties of protonated tyrosine  $[\text{TyrH}]^+$ . This permits the testing of the robustness of different theoretical approaches such as ab initio and semiempirical wave function based methods (RI-CC2 and SAM1) as well as TDDFT calculations to describe the electronic transitions in the aromatic amino acid.

*a. Optical Properties of  $[\text{TyrH}]^+$ .* We first recorded the photofragmentation yields of protonated tyrosine  $[\text{TyrH}]^+$  as a function of the laser wavelength (see Figure 3). The spectrum for  $[\text{TyrH}]^+$  is dominated by one band at 275 nm and the emergence of a second band below 250 nm. The present gas phase spectrum is very similar to the one recorded in solution<sup>45</sup> and in the gas phase for cold protonated tyrosine molecules.<sup>46</sup>

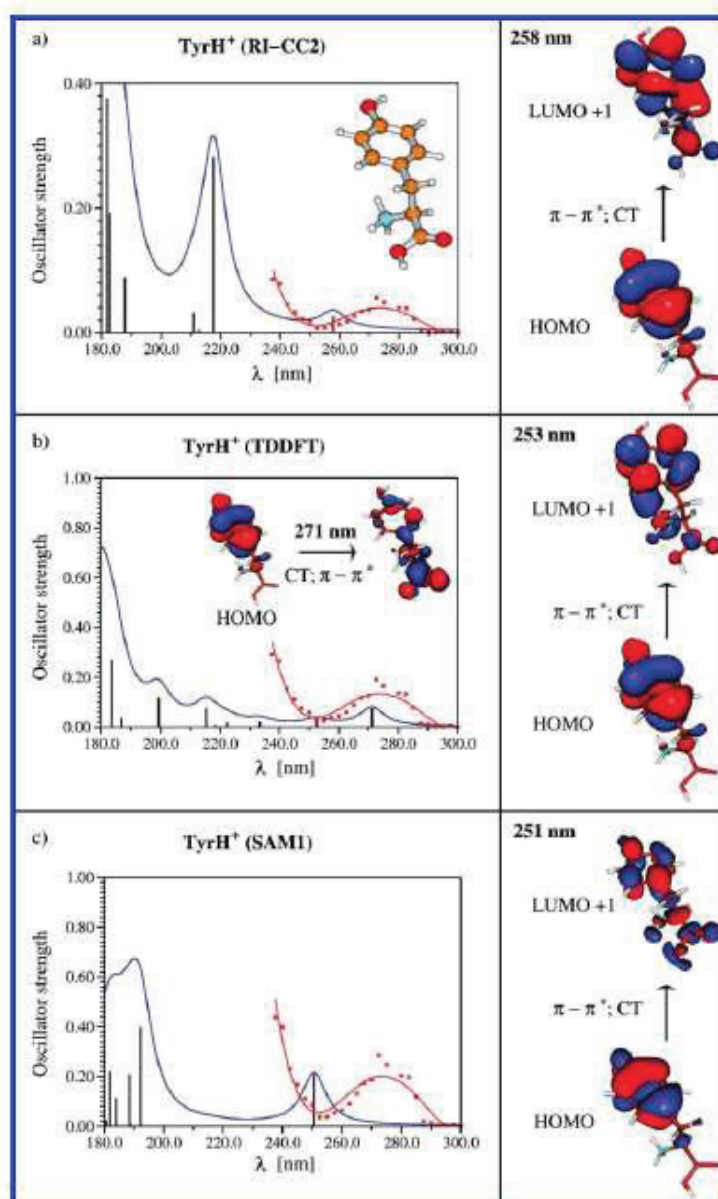


Figure 3. Calculated absorption spectra for TyrH<sup>+</sup> using (a) RI-CC2, (b) TDDFT, and (c) SAM1 methods. The structure is given in insert of (a). The molecular orbitals involved in leading excitations for transitions at a given wavelength are plotted. The broadening of the lines is simulated by a Lorentzian function with the width of 10 nm (blue lines).

The experimentally recorded photodissociation spectrum of [TyrH]<sup>+</sup> is compared with the calculated absorption spectra at the RI-CC2, TDDFT, and SAM1 levels of theory (Figure 3a–c). For calculations, the tyrosine molecule was protonated on the NH<sub>2</sub> group. The three methods give rise to a transition around 258 nm (RI-CC2), 253 nm (TDDFT), and 251 nm (SAM1), respectively, characterized by  $\pi$ – $\pi^*$  excitations and short-range CT. The deviation from the experiment is in all three cases ~20 nm. For the transition at 253 nm obtained from TDDFT the

calculated  $\Lambda$ -index is 0.6, indicating that the overlap between the occupied and the virtual orbitals involved in excitations is reasonably large, and thus only a short-range CT contribution is present. The TDDFT transition at 271 nm is in agreement with the wavelength of the experimental band. However, the  $\Lambda$ -index for this transition is 0.38, indicating a weak overlap and CT transfer with long-range character (which we have drawn in the middle part of Figure 3b). Thus, regarding  $\Lambda$ -index value, a significant underestimation of the transition energy is expected



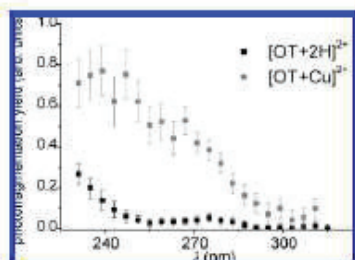


Figure 4. Experimental fragmentation yields of  $[OT + 2H]^{2+}$  and  $[OT + Cu]^{2+}$  ions measured as a function of the laser wavelength.

to occur for this excitation. RI-CC2 should give most reliable results and is in close agreement with the recent theoretical work performed for the protonated tyrosine<sup>47</sup> but fails to reproduce accurately the experimental spectra. The semiempirical SAM1 method is obviously missing some states between 200 and 240 nm and fails to reproduce the experimental spectrum, in particular the emergence of the second band below 250 nm.

*b. Optical Properties of  $[OT + 2H]^{2+}$  and  $[OT + Cu]^{2+}$ .* The experimental photofragmentation yields of  $[OT + 2H]^{2+}$  and  $[OT + Cu]^{2+}$  as a function of the wavelength are presented in Figure 4. The experimental spectrum for  $[OT + 2H]^{2+}$  is dominated by one band at 275 nm and the emergence of a second band below 250 nm. The experimental spectrum for  $[OT + 2H]^{2+}$  is very similar to the one observed for the protonated tyrosine (see Figure 3). This similarity in optical spectra indicates that the optical properties of  $[OT + 2H]^{2+}$  are mainly driven by the aromatic tyrosine side chain in the nonapeptide and that the phenol optical properties in OT are weakly influenced by the peptide backbone. The fact that the tyrosine side chain in  $[OT + 2H]^{2+}$  points away from the hormone ring may prevent strong coupling with the peptide backbone.

The experimental spectrum for  $[OT + Cu]^{2+}$  is dominated by a monotone increase in the photofragmentation yield below 300 nm. In the 230–300 nm range, the photofragmentation yield of  $[OT + Cu]^{2+}$  is higher than the one recorded for  $[OT + 2H]^{2+}$ . The theoretical spectra of  $[OT + 2H]^{2+}$  and  $[OT + Cu]^{2+}$

obtained from TDDFT suffer from low lying long-range CT transitions. In the case of  $[OT + 2H]^{2+}$ , since the structure is less compact than in the complex with copper, the long-range CT character of transitions is expected to be more pronounced. Therefore, a reliable comparison of the TDDFT results with the experiment is not possible. This has been confirmed by an extensive analysis of electronic transitions (not shown) for which the calculated  $\Lambda$ -index values are not in the validity range of the TDDFT calculations. On the other hand, the semiempirical SAM1 method also does not give rise to the appropriate description due to the minimal basis set used and the significantly reduced number of transitions in the region of interest. Notice that unfortunately the calculation of optical properties of  $[OT + 2H]^{2+}$  and  $[OT + Cu]^{2+}$  is presently beyond the reach of the RI-CC2 method.

#### IV. Discussion

The present results show that the structural properties of OT are strongly affected by the presence of copper. An important issue concerns the relevance of the structural changes induced by  $Cu^{2+}$  on the biological activity of OT and in particular on its binding properties to its receptor protein. To obtain better insight into this biological relevance, we have compared the structures obtained for the  $[OT + 2H]^{2+}$  and  $[OT + Cu]^{2+}$  with the X-ray crystal structure of the neurophysin–OT complex, called bound OT (PDB code: 1NPO).<sup>10</sup> Figure 5 presents the superposition of the  $[OT + 2H]^{2+}$  structure I (left) and  $[OT + Cu]^{2+}$  structure II (right) with those of the OT bound to neurophysin. The superposition gives root-mean-square (rms) deviations ranging from 2.00 to 2.19 Å for  $[OT + 2H]^{2+}$  and from 3.17 to 3.72 Å for  $[OT + Cu]^{2+}$ , thus showing much larger deviation due to copper complexation. In Figure 6, we plotted the dihedral angles diagram of the peptide backbone for the X-ray 1NPO OT structure. From the rms values and the comparison of the dihedral angles diagram between bound OT (Figure 6) and  $[OT + 2H]^{2+}$  and  $[OT + Cu]^{2+}$  (left and right side of Figure 2, respectively), it is evident that the dihedral angles of the OT ring are closer to the OT structure for the  $[OT + 2H]^{2+}$  than for the  $[OT + Cu]^{2+}$  structure. However, the complexation with the copper induces changes in the

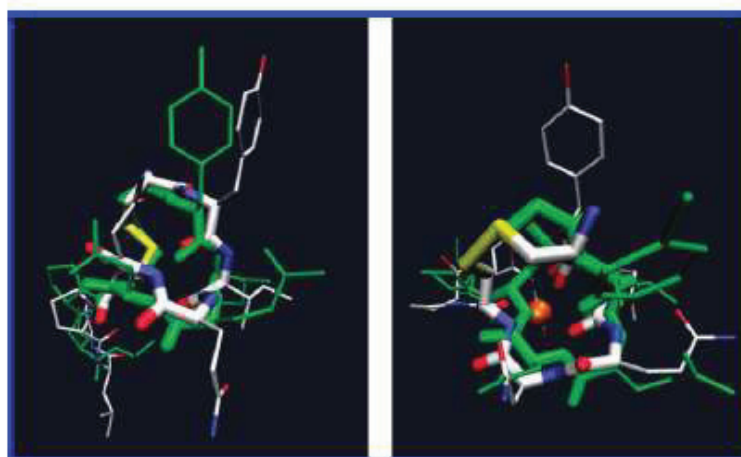


Figure 5.  $C_{\alpha}$ -based superposition of the OT X-ray structure (green, PDB code: 1NPO) with the calculated structure I of  $[OT + 2H]^{2+}$  (left) and structure II of  $[OT + Cu]^{2+}$  (right), in which standard colors for atoms have been used (N, blue; O, red; S, yellow; C, white). Thicker lines label bonds building the 20-member OT ring.



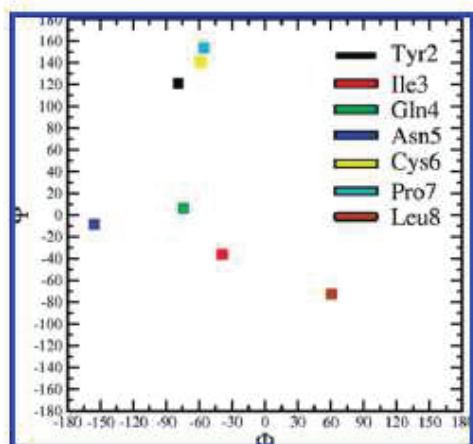


Figure 6. Plot of backbone dihedral angles  $\Phi$  and  $\Psi$  for the bound OT X-ray structure together with the color code legend for the seven residues.

dihedral angles for Asn5 and Tyr2 residues, which are related to a modification of the orientation of the side chain of these residues. These two residues also undergo drastic dihedral angles and side chain changes between free OT and OT bound to neurophysin.<sup>10</sup> In conclusion, copper induces a reorientation of the Tyr2 and Asn5 side chains. These two residues are key residues involved in the neurophysin–hormone recognition. This type of reorientation might explain the increase in the binding properties in presence of metal dications.

Concerning optical properties (Figure 4), the position of the bands in the action spectra is weakly affected by the complexation with the copper cation. A global enhancement of the photofragmentation yield is the main change upon complexation with Cu(II). A direct interaction between the metal cation and the chromophore would induce a strong shift in the absorption spectrum as recently observed for silver peptide complexes<sup>46</sup> and as predicted by calculations (not shown). This confirms that the tyrosine side chain in OT is almost always away from the ring (see Figure 1) and thus is not very sensitive to the presence of copper. The global enhancement observed for the fragmentation yield of [OT + Cu]<sup>2+</sup> is not completely understood because of the lack of quantitative theoretical description of the optical absorption. Several different processes may explain this enhancement. First, we wish to emphasize that, in the gas phase, we record photofragmentation spectra and not absorption spectra. A first explanation may be a different relation between absorption and fragmentation in the two systems. The rigidity imposed by the presence of the copper cation to the global structure of OT and the nature of charges (metal cation versus protons) may affect the position of and the intersection between the potential surfaces of the different electronic states and the dynamics of relaxation. The analysis of the photofragment peaks in mass spectra shows that the fragments corresponding to the peptide bond cleavage between Tyr2 and Ile3 ( $y_7$  and  $y_{7-17}$  fragments) are intense and only observed for [OT + Cu]<sup>2+</sup>. This difference in relaxation pathways may explain the different fragmentation yields. The second possible explanation is a modification of the optical absorption of OT due to the presence of a chelated divalent metal ion. Indeed, the presence of the Cu(II) cation increases the overall

oscillator strength. The copper dication may also induce shifts in the electronic transitions, leading to the increase in absorption in the 230–310 nm range.

## V. Concluding Remarks

Copper complexation induces a drastic change in the structure of the OT peptide. In particular, we predict that Cu<sup>2+</sup> ion is chelated by the carbonyl oxygen of the OT ring, which leads to a contraction of the OT ring. Furthermore, the Tyr2 side chain residue points away from the ring, and thus tyrosine orientation is little affected by the presence of the copper. These structural changes are well-characterized by the combination of ion mobility experiments and DFT calculations.

**Acknowledgment.** We acknowledge the financial support from the Région Rhône-Alpes (CIBLÉ 07 016857 01) and the Humboldt foundation. One of us (M.B.) is a senior professor at the Institut Universitaire de France.

## References and Notes

- (1) Glusker, J. R. *Adv. Protein Chem.* 1996, 42, 1.
- (2) *The Biological Chemistry of the Elements*; Cleland Press: Oxford, 1991.
- (3) Cascella, M.; Cuendet, M. A.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 10248.
- (4) Deffino, I.; Sato, K.; Harrison, M. D.; Andolfi, L.; Bizzarri, A. R.; Denton, C.; Cannistraro, S. *Biochemistry* 2005, 44, 16090.
- (5) Breslow, E. *Annu. Rev. Biochem.* 1978, 48, 251.
- (6) Gimpl, G.; Fahrenholz, F. *Physiol. Rev.* 2001, 81, 629.
- (7) Fanelli, F.; Barbier, P.; Zanchetta, D.; De Benedetti, P. G.; Chini, B. *Mol. Pharmacol.* 1999, 56, 214.
- (8) Sliuzars, M. J.; Susarz, R.; Clarkowski, J. *J. Pept. Sci.* 2006, 12, 171.
- (9) Conner, M.; Hawtin, S. R.; Simms, J.; Woolfen, D.; Lawson, Z.; Conner, A. C.; Parslow, R. A.; Wheatley, M. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 17405.
- (10) Rose, J. P.; Wu, C.-K.; Hsiao, C.-D.; Breslow, E.; Wang, B.-C. *Nat. Struct. Biol.* 1996, 3, 163.
- (11) Pearlmutler, A. F.; Soloff, M. S. *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 3899.
- (12) Bal, W.; Kozłowski, H.; Lammek, B.; Pettit, L. D.; Rolka, K. *J. Inorg. Biochem.* 1992, 45, 193.
- (13) Campbell, B. J.; Chu, F. S.; Hubbard, S. *Biochemistry* 1963, 2, 764.
- (14) Danyi, P.; Varnagy, K.; Sovago, I.; Schon, I.; Sanna, D.; Micera, G. *J. Inorg. Biochem.* 1995, 60, 69.
- (15) Kozłowski, H.; Radomska, B.; Kupryszewski, G.; Lammek, B.; Livera, C.; Pettit, L. D.; Pyburn, S. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1989, 173.
- (16) Chruscińska, E.; Derdowska, I.; Kozłowski, H.; Lammek, B.; Luckowski, M.; Oldziej, S.; Swiatek-Kozłowska, J. *New J. Chem.* 2003, 27, 251.
- (17) Kleijnjenhuis, A. J.; Mihalca, R.; Heeren, R. M. A.; Heck, A. J. R. *Int. J. Mass Spectrom.* 2006, 253, 217.
- (18) Wei, H.; Luo, X.; Wu, Y.; Yao, Y.; Guo, Z.; Zhu, L. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2000, 4196.
- (19) Mihalca, R.; van der Burgt, Y. E. M.; Heck, A. J. R.; Heeren, R. M. A. *J. Mass Spectrom.* 2007, 42, 450.
- (20) Wyttenbach, T.; Liu, D.; Bowers, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 5993.
- (21) Liu, D.; Seuthe, A. B.; Ehrler, O. T.; Zhang, X.; Wyttenbach, T.; Hsu, J. F.; Bowers, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 2024.
- (22) Joly, L.; Antoine, R.; Allouche, A.-R.; Broyer, M.; Lemaire, J.; Dugourd, P. *J. Phys. Chem. A* 2009, 113, 6607.
- (23) Joly, L.; Antoine, R.; Allouche, A. R.; Broyer, M.; Lemaire, J.; Dugourd, P. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 8428.
- (24) Rulisek, L.; Havlas, Z. *J. Phys. Chem. A* 2002, 106, 3855.
- (25) Ghosh, S.; Dey, A.; Sun, Y.; Schöles, C. P.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131.
- (26) Bruschi, M.; De Gioia, L.; Mitrić, R.; Bonacic-Koutecky, V.; Fantucci, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008, 10, 4573.
- (27) Sinnecker, S.; Neese, F. *J. Comput. Chem.* 2006, 27, 1463.
- (28) Hättig, C.; Weigend, F. *J. Chem. Phys.* 2000, 113, 5154.
- (29) Hättig, C.; Kohn, A. *J. Chem. Phys.* 2002, 117, 6939.
- (30) Dewar, M. J. S.; He, C. X.; Yu, J. G. *Tetrahedron* 1993, 49, 5003.
- (31) Holder, A. J.; Dennington, R. D.; He, C. *Tetrahedron* 1994, 50, 627.

- (32) Furches, F.; Rappoport, D. *Density functional methods for excited states: equilibrium structure and electronic spectra*, Olivucci, M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2005.
- (33) Talbot, F. O.; Tabarin, T.; Antoine, R.; Broyer, M.; Dugourd, P. *J. Chem. Phys.* 2005, *122*, 074310.
- (34) Clemmer, D. E. Collision cross section database. [http://www.indiana.edu/~clemmer/Research/cross%20section%20database/Peptides/misc\\_peptide\\_cs.htm](http://www.indiana.edu/~clemmer/Research/cross%20section%20database/Peptides/misc_peptide_cs.htm) (accessed 2009).
- (35) Revercomb, H. E.; Mason, E. A. *Anal. Chem.* 1975, *47*, 970.
- (36) Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, *107*, 3902.
- (37) Kayl, H.; Clark, T. *J. Mol. Model.* 2007, *13*, 965.
- (38) Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* 1986, *33*, 8822.
- (39) Becke, A. D. *Phys. Rev. A* 1988, *38*, 3098.
- (40) Schafer, A.; Hüber, C.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* 1994, *100*, 5829.
- (41) Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* 1988, *37*, 785.
- (42) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* 1993, *98*, 1372.
- (43) Peach, M. J. G.; Benfield, P.; Helgaker, T.; Tozer, D. J. *J. Chem. Phys.* 2008, *128*.
- (44) von Helden, G.; Wyttenbach, T.; Bowers, M. T. *Int. J. Mass Spectrom.* 1995, *146*, 349.
- (45) Creighton, T. E. *Proteins*, W.H. Freeman and Company: New York, 1993.
- (46) Boyarkin, O. V.; Mercier, S. R.; Kamariotis, A.; Rizzo, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 2816.
- (47) Gregoire, G.; Jouvet, C.; Dedonder, C.; Sobolewski, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*, 6223.
- (48) Tabarin, T.; Kulesza, A.; Antoine, R.; Mitric, R.; Broyer, M.; Dugourd, P.; Bonacic-Koutecky, V. *Phys. Rev. Lett.* 2008, *101*, 213001.

JP9037478





## Titre

Etude conformationnelle de peptides et protéines par mesure de mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse

## Résumé

Ce travail de thèse porte sur l'analyse conformationnelle de biomolécules en phase gazeuse. L'étude d'objets complexes en phase gazeuse permet de connaître les facteurs intrinsèques stabilisant leur structure.

La première étape de mes travaux a été le couplage entre un appareil de mobilité ionique (IMS) et un appareil de spectrométrie de masse (MS). Nous avons simulé (SimIon) et développé différentes optiques ioniques fonctionnant à haute pression (entonnoirs à ions, piège ionique). Ces modifications expérimentales nous ont permis de commencer des études conformationnelles de biomolécules en phase gazeuse.

Les premières expériences avaient pour objectif d'observer les facteurs stabilisants une structure secondaire sur des séries de peptides analogues. La première étude a été réalisée sur des séries de polyalalanines et de polyglycines de formules  $\text{Arg(Ala)}_4\text{XxxAla}_4\text{Lys}$  et  $\text{Arg(Gly)}_4\text{Xxx(Gly)}_4\text{Lys}$ , où Xxx est l'un des 20 acides aminés naturels. Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'acide aminé central sur la conformation globale. Puis nous avons observés la stabilité de l'hélice de la partie transmembranaire de la protéine M2 du virus de la grippe A et de différents mutants. Ces études ont permis de montrer l'importance de la solvatation des charges en phase gazeuse.

Enfin nous avons initié une étude sur le repliement des protéines en utilisant une protéine modèle, le lysozyme. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes de repliements en fonction du degré d'oxydation de cette dernière.

## Mots clés

Mobilité ionique, spectrométrie de masse, biomolécules, étude conformationnelle, développement instrumental, étude structurale, phase gazeuse, physico-chimie.

## Title

Conformational studies of peptides and proteins by ion mobility-mass spectrometry.

## Abstract

This work deals with the conformational studies of biomolecules in gas phase. The gas phase allows observing the intrinsic factors that stabilize the structure.

The first step of this work consisted in coupling an ion mobility tube and a mass spectrometer (IM-MS). Especially, ion optics working at high pressure had to be developed (ion funnels, cylindrical ion trap). These experimental modifications allowed us to realising conformational studies *in vacuo*.

This work is build around two major axes. The first one deals with the understanding of the factors that stabilize the secondary structure in gas phase. We have studied series of peptides with similar sequences. We studied a series of polyalanines and polyglycines who have the following formula  $\text{Arg(Ala)}_4\text{XxxAla}_4\text{Lys}$  et  $\text{Arg(Gly)}_4\text{Xxx(Gly)}_4\text{Lys}$ , where Xxx is one of the 20 natural amino acids. We are looking the influence of central amino acid on the global structure of peptides. After that we have observed the stability of the helix of the transmembran domain of the M2 protein of virus Influenza A and some mutants. These studies allow showing the importance of the charge solvation in the gas phase.

Finally, we are initiated a study on the refolding of proteins and more particularly on a model protein: the Lysozyme. We are studied the refolding in function of oxide degrees.

**Discipline** Physico chimie moléculaire et spectrométrie de masse.

## Adresse laboratoire

Laboratoire de Spectrométrie Ionique et moléculaire  
Unité mixte de Recherche (UMR 5579) CNRS/UCBL  
Domaine scientifique de la Doua-Université Claude Bernard Lyon 1  
Bâtiment Alfred Kastler,  
43 Bd du n11 novembre 1918  
69622 Villeurbanne, FRANCE