HAL
open science

Dynamique de photofragmentation de molécules d'intérêt biologique protonées

Marie Perot Pérot-Taillandier

To cite this version:

Marie Perot Pérot-Taillandier. Dynamique de photofragmentation de molécules d'intérêt biologique protonées. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112204 . tel-00667013

HAL Id: tel-00667013

https://theses.hal.science/tel-00667013v1

Submitted on 6 Feb 2012

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.

Orsay

N° d'ordre

Université Paris-Sud 11

U.F.R. Scientifique d'Orsay

Thèse

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11

Discipline : Chimie-Physique

par

Marie PEROT-TAILLANDIER

Sujet :

Dynamique de photofragmentation de molécules d'intérêt biologique protonées

Soutenue le 10 janvier 2011 devant la commission d'examen composée de :

Mme	H. Mestdagh	Présidente
M.	L. Adoui	Rapporteur
M.	G. Van-der-Rest	Rapporteur
M.	C. Afonso	Examinateur
M.	M. Mons	Examinateur
Mme	J. Fayeton	Directrice de thèse

Résumé

L'expérience Arc-En-Ciel permet d'étudier la dynamique de photofragmentation UV de biomolécules produites par une source « électrospray ». La spécificité du dispositif expérimental utilisé repose sur la détection en coïncidence des photo-fragments ioniques et neutres issus d'un même évènement physique de fragmentation. L'étude de molécules simplement chargées permet d'identifier chaque canal de fragmentation par la masse du fragment ionique émis. En corrélant les informations temporelles et spatiales des photo-fragments détectés, on définit :

- le nombre et la masse des fragments neutres associés à chaque fragment ionique
- le nombre d'étapes de fragmentation de chaque canal et leurs temps caractéristiques ($20\ \text{ns} \leq \tau < 1\ \mu\text{s}$).

L'ensemble de ces informations permet une description complète de la dynamique de photo-fragmentation du système étudié.

La dynamique de photofragmentation du tryptophane protoné est régie par des transferts concertés d'électron et de proton à l'état excité. Lorsque le tryptophane protoné est complexé à un éther-couronne, les transferts de protons sont inhibés. Nous observons alors une modification de la dynamique de fragmentation.

Pour de petits peptides protonés contenant le tryptophane, la dynamique à l'état excité est gouvernée par la position du tryptophane dans la chaîne peptidique. Les voies de fragmentation spécifiques UV, mises en évidence pour ces peptides, sont expliquées par les mêmes mécanismes de transfert concerté d'électron et de proton. Nous montrons cependant que ces mécanismes diffèrent suivant la composition du peptide.

Abstract

The Arc-En-Ciel experiment allows the investigation of UV photo-fragmentation dynamics of protonated biomolecules produced by an electrospray ion source. The specificity of the set-up is based on the detection in coincidence of ionic and neutral photo-fragments coming from the same fragmentation event. The study of simple charged molecules allows the identification of each fragmentation channel by the mass of the emitted ionic fragment. With the time and spatial correlation of the information of detected photo-fragments we identify:

- the number of neutral fragments as well as their masses associated with each ionic fragment
- the number of fragmentation steps of each channel as well as their fragmentation times ($20\ \text{ns} \leq \tau < 1\ \mu\text{s}$)

This information provides a comprehensive understanding of the photo-fragmentation dynamics.

The photo-fragmentation dynamics of protonated Tryptophan is driven by concerted electron and proton transfers in the excited state. When protonated Tryptophan is complexed with a crown-ether, proton transfers are inhibited and dynamics is modified.

The excited state dynamics of small protonated peptides containing Tryptophan is governed by the position of Tryptophan in the peptide chain. The specific fragmentation channels involved are explained by concerted electron and proton transfers. We show how these mechanisms change with the composition of peptides.

Remerciements

Merci à tous les membres de mon jury pour s'être intéressés à mon travail de thèse et pour le temps qu'ils ont passé à lire ce manuscrit. Merci à Guillaume Van der Rest et Lamri Adoui pour avoir accepté de rapporter ce travail, à Hélène Mestdagh d'avoir présidé mon jury de thèse et à Michel Mons et Carlos Afonso d'y avoir participé. Je remercie également ce dernier pour tout ce que j'ai appris avec lui depuis le début de mon post-doc.

Merci à M. Philippe Bréchignac, directeur de l'ISMO et de l'ex-LPPM, de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire. Merci aussi à Victor Sidis, directeur de l'ex-LCAM de m'avoir accueillie dans les locaux de son laboratoire. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'aller à des conférences qui m'ont beaucoup appris.

Un grand merci à tous ceux avec qui j'ai travaillé pendant ces 3 ans. J'ai beaucoup apprécié le fait de travailler en équipe pendant ma thèse. Il valait mieux plusieurs paires d'yeux plutôt qu'une seule avec un tel dispositif expérimental pour voir où il y avait un problème ! Merci à Jacqueline Fayeton pour avoir encadré ma thèse, merci de m'avoir coachée au quotidien pour faire fonctionner ce dispositif complexe et pour tout le savoir faire expérimental qu'elle a pu me transmettre. Merci à Christophe Jouvet d'avoir également encadré ma thèse après le stage de M2, merci pour les discussions scientifiques, pour avoir été là avec un œil extérieur, nous permettant de prendre du recul par rapport à l'expérience. Merci à Michel Barat pour tout ce que j'ai pu apprendre en sa sage compagnie. Merci à Bruno Lucas pour son soutien, le plaisir de discuter et de travailler ensemble. Un grand merci à Umesh Khadane malgré le peu de temps passé ensemble mais qui m'a beaucoup apporté à mi-parcours de cette thèse. Merci à Sunil Kumar d'avoir pris la relève sur le dispositif expérimental quand je rédigeais ma thèse. Merci à Satchin pour son soutien et sa gentillesse sur la fin de ma thèse. J'ai également apprécié d'avoir pu travailler avec Maj Britt et Nam, doctorants danois et coréen, ainsi qu'avec Sébastien Gruat, stagiaire de L3.

Merci à tout le personnel du bâtiment 351 : chercheurs, enseignants, ingénieurs, techniciens, secrétaires… Merci pour l'ambiance chaleureuse et familiale partagée au sein de ce bâtiment, pour le temps passé ensemble à la salle café, les barbecues d'été, les repas de Noël et pour Roscoff. Merci à tous ceux qui ont pris le temps de discuter avec moi de tout et de rien. Merci pour ce soutien quotidien.

Merci à l'ensemble de l'équipe « Structure et dynamique des systèmes complexes isolés » de l'ISMO que je côtoie depuis mon stage de Master et qui n'a jamais été très loin. Merci aussi à tous les gens avec qui j'ai pris plaisir à discuter sur le campus, en faisant le chemin du RER ou lorsque je me déplaçais des bâtiments 349 à 351 pour aller de la salle de manip' au labo. Je voudrais en profiter pour remercier également tous mes enseignants de la primaire à l'Université pour tout ce qu'ils m'ont apporté.

Merci aux doctorants du bâtiment 351 avec qui j'ai partagé le bureau mais surtout de très bons moments. Merci à Pierre qui a commencé la thèse en même temps que moi et avec qui j'ai pu partager les hauts et les bas vécus pendant ces trois années ! Merci à Erika pour sa bonne humeur et son énergie au quotidien, merci d'avoir été là pour nous remonter le moral. Merci à Yang pour tout ce que nous avons pu partager. Merci aussi à Damien, Caroline, Hicham, Adnan, Sha, Sergio, Isabel, Bobekeur, Viktoria… pour tous les bons moments et pour les pauses « thé ». Merci aussi à Ivan.

Merci à tous ceux qui m'ont encouragée et soutenue pendant ces trois ans, famille et amis. Un grand merci à Laetitia et Pierre, Delphine, Sylvain et à tous les copains du Master, en particulier à Hélène et Sidi. Merci à Jean-Paul et tous les copains de la chorale Achor. Merci à Céline et Hervé d'être venus assister à ma soutenance de thèse ! Merci aussi à Justine et Chloé. Merci à ma mère qui m'a donné le goût des sciences expérimentales et de la physique-chimie, merci à mon père de m'avoir toujours encouragée. Merci à ma sœur, Céline, et à mes deux frères, Mathieu et Pierre-Yves, de vous être intéressés à ce que je faisais et d'être tous venus à ma soutenance de thèse ! Enfin, merci à mon chéri, Pascal, pour m'avoir supportée et soutenue toutes ces dernières années, merci d'avoir accepté de m'épousée et d'être toujours là près de moi.

Mon dernier remerciement s'adresse à vous, lecteurs, pour le temps que vous passerez à lire ce manuscrit.

Marie

A mon mari...

Table des matières

INTRODUCTION **5**

CHAPITRE I. DESCRIPTION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL **21**

I.1 Description générale **21**

I.2 Source d'ions électrospray **24**
I.2.1 Formation du cône de Taylor 24
I.2.2 Formation du jet vaporisé et désolvatation des gouttelettes 25
I.2.3 Formation des ions en phase gazeuse 26
I.2.4 Dispositif électrospray utilisé et optimisation des paramètres influençant le rendement d'ionisation de l'électrospray 28

I.3 Formation, accélération et sélection en masse des paquets d'ions **29**
I.3.1 Hexapole, zone de confinement avant extraction 30
I.3.2 Formation de paquets d'ions 31
I.3.3 Contrôle du signal d'ions 32
I.3.4 Tube de Gauss et déflecteur électrostatique 32

I.4 Laser **33**

I.5 Piège ionique électrostatique **34**
I.5.1 Description du piège 35
I.5.2 Synchronisation 38
I.5.3 Piégeage des ions fragments 39
I.5.4 Résultats expérimentaux obtenus avec le piège électrostatique 41

I.6 Expériences en coïncidence **48**
I.6.1 Post-accélération et zone d'interaction polarisée 48
I.6.2 Analyseur électrostatique 50
I.6.3 Observations expérimentales 52

I.7 Limitation angulaire du système de détection **56**
I.7.1 Condition de détection des espèces neutres 57
I.7.2 Condition de détection des espèces chargées 58

I.8 Détecteurs à localisation et acquisition de données **60**
I.8.1 Détection et localisation des particules neutres par la méthode des lignes à retard 60
I.8.2 Codage des données issues du détecteur de neutres 61
I.8.3 Détection et localisation des ions par la méthode de division de charge 63
I.8.4 Codage des données issues du détecteur d'ions 64

I.9 Synchronisation temporelle de l'expérience **65**

I.10 Conclusion **68**

Bibliographie **70**

Annexe 1 : CTNM3 ..... **72**

Annexe 2 : programme d'acquisition **74**

CHAPITRE II. ANALYSE DES DONNÉES EN COÏNCIDENCE ISSUES DE LA ZONE POLARISÉE 79

II.1 Expériences en coïncidences 79
II.1.1 Principe des expériences réalisées 80
II.1.2 Problème des fausses coïncidences 80

II.2 Traitement : des données brutes aux observables 83

II.3 Diagrammes de corrélation 84
II.3.1 Généralités 85
II.3.2 Diagrammes $N(y_i, t_i\text{-}t_n)$ 86
II.3.3 Filtres des diagrammes bidimensionnels 89
II.3.4 Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ 89
II.3.5 Compétition entre photofragmentation et collision 92

II.4 Programme de simulation 94

II.5 Mesure des temps de fragmentation 95
II.5.1 Principe des expériences de fragmentation dans un champ électrique 96
II.5.2 Mesure des constantes de temps 99
II.5.3 Elargissement temporel des pics 100
II.5.4 Modélisation des données expérimentales 101

II.6 Traitement des mécanismes séquentiels 104
II.6.1 Généralités 104
II.6.2 Cas $\tau_1 \ll \tau_2$, séparation temporelle des fragments neutres 106
II.6.3 Cas où les deux fragmentations τ_1 et τ_2 sont rapides (< 100 ns), analyse des fragments neutres suivant leurs déviations relatives 113

II.7 Conclusion 119

Bibliographie 120

Annexe 1 121

Annexe 2 125

CHAPITRE III. COMPARAISON DE LA PHOTOFRAGMENTATION DU TRYPTOPHANE PROTONE ISOLE ET SOLVATE PAR UN ETHER-COURONNE 133

III.1 Etat de l'art des connaissances sur la fragmentation du Trp-H^+ 134

III.2 Mécanismes de fragmentation dans l'état excité du Tryptophane protoné 139
III.2.1 Analyse des canaux de fragmentation *m/z* 130 et *m/z* 132 du Trp-H^+ 139
III.2.2 Rupture de la liaison C_α-C_β du Trp-H^+, de la Tyr-H^+ et de leurs dérivés décarboxylés 142
III.2.3 Etats excités du Trp-H^+ impliqués dans les mécanismes UVPD 147
III.2.4 Modèle de transfert d'électron / transfert de H^+ 149

III.3 Influence d'un éther-couronne sur les mécanismes de transfert de proton 152
III.3.1 Résultats obtenus avec le piège électrostatique 154
III.3.2 Résultats obtenus avec la zone polarisée 156
III.3.3 Discussion sur les temps de fragmentation statistiques observés 162

III.3.4 Perte de NH_3(CE) dans l'état excité 163
III.3.5 Discussion sur les temps de fragmentation non-statistiques 165

III.4 Comparaison avec les expériences effectuées à Aarhus 167
III.4.1 Principe des expériences réalisées à Aarhus 167
III.4.2 Comparaison des résultats obtenus 168
III.4.3 Différence entre les deux dispositifs expérimentaux d'Aarhus et d'Orsay 170

III.5 Evaluation de l'énergie interne des molécules étudiées avec notre dispositif 171
III.5.1 Rappels sur la théorie RRKM 171
III.5.2 Calcul effectué 172
III.5.3 Résultats obtenus 172

III.6 Conclusion 176

Bibliographie 178

CHAPITRE IV. ETUDE DES MECANISMES DE PHOTOFRAGMENTATION DE DIPEPTIDES PROTONES CONTENANT LE TRYPTOPHANE 185

IV.1 Généralités 185
IV.1.1 Peptide et liaison peptidique 185
IV.1.2 Fragmentation d'un peptide 186
IV.1.3 Molécules étudiées 186

IV.2 Récapitulatif des résultats expérimentaux 188

IV.3 Résultats obtenus avec le piège électrostatique 191
IV.3.1 Résultats expérimentaux 192
IV.3.2 Analyse des résultats obtenus avec le piège 193
IV.3.3 Fragmentations secondaires à la perte de H observées avec la zone polarisée 195
IV.3.4 Conclusion sur les fragmentations observées aux longs temps 199

IV.4 Fragmentations initiées dans l'état excité 200
IV.4.1 Fragmentations initiées dans l'état excité pour les dipeptides $[WX +H]^+$ 201
IV.4.2 Fragmentations initiées dans l'état excité pour les dipeptides $[XW +H]^+$ 203
IV.4.3 Conclusion sur les mécanismes de fragmentations initiées dans l'état excité 211

IV.5 Fragmentations induites après conversion interne 212
IV.5.1 Fragment *m/z* 144 213
IV.5.2 Perte de H_2O et CO 215
IV.5.3 Fragmentations $a_1 - y_1$ 216
IV.5.4 Autres fragmentations produites par conversion interne 224

IV.6 Temps de fragmentation déterminé par interaction ion-laser dans un champ électrique 230

IV.7 Comparaison à des peptides contenant la Tyrosine 233

IV.8 Conclusion 237

Bibliographie 239

CHAPITRE V. PHOTOFRAMENTATION DE L'ADENINE PROTONEE **244**

CONCLUSION **246**

Bibliographie.....258

INTRODUCTION

La protéomique s'est fortement développée ces dernières années grâce aux progrès de la spectrométrie de masse et à l'augmentation exponentielle des séquences de génomes disponibles dans le domaine publique. Le génome, ensemble du matériel génétique d'une espèce ou d'un individu, est contenu dans les chromosomes (figure 1.a). Chaque gène est codé par des séquences de bases de l'ADN (figure 1.b). Des séquences de 3 paires de bases de l'ADN (triplet), transcrites en ARNm, sont ensuite traduites en acide aminé, les acides aminés étant les constituants des protéines. Notons que le Projet Génome Humain [1], commencé en 1990 et achevé en 2003, a permis d'identifier les séquences de pairs de bases de l'ADN codant les 20000 à 25000 gènes de l'espèce humaine.

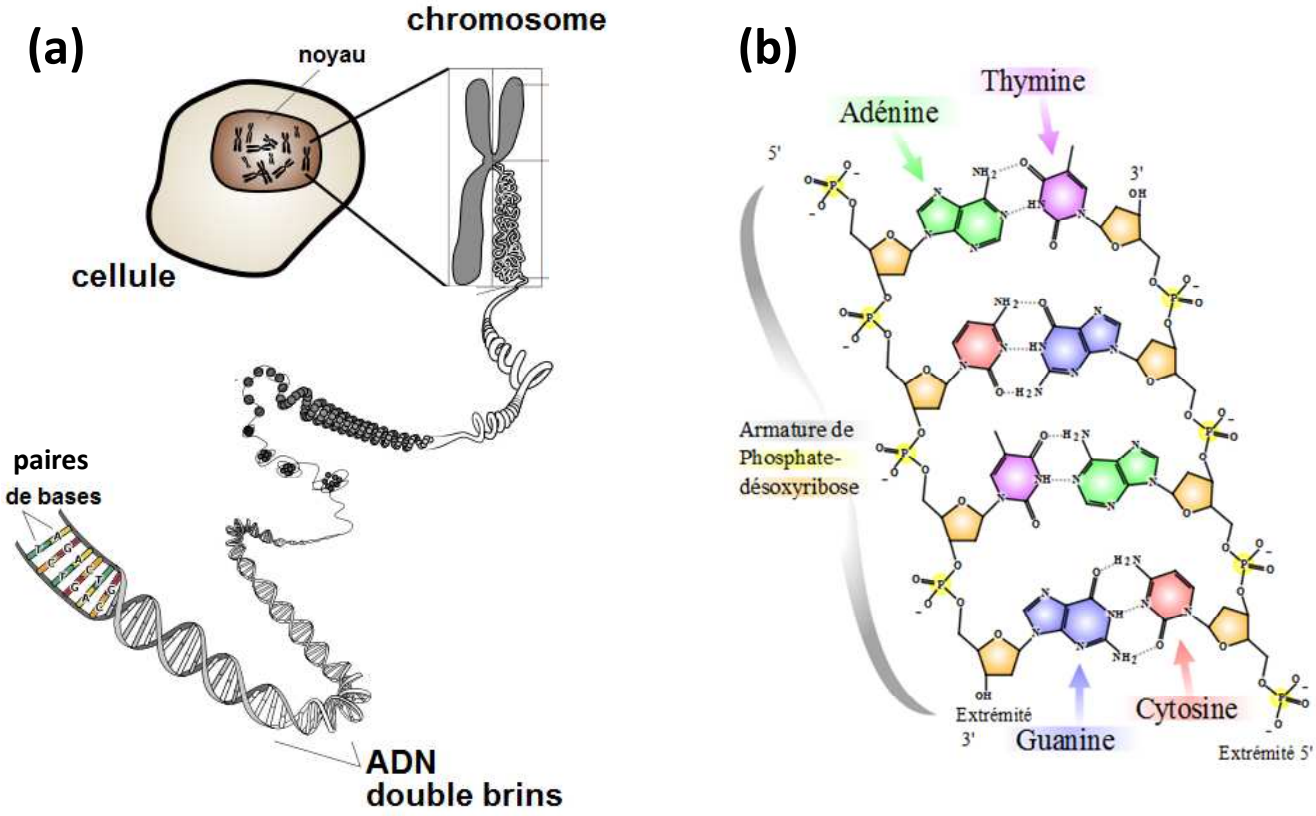


figure 1 : (a) de l'ADN à la cellule ; (b) ADN double brin composé des 4 bases : Adénine (A), Thymine (T), Guanine (G), Cytosine (C) qui s'associent par paires, A-T et G-C, grâce à des liaisons hydrogène [2].

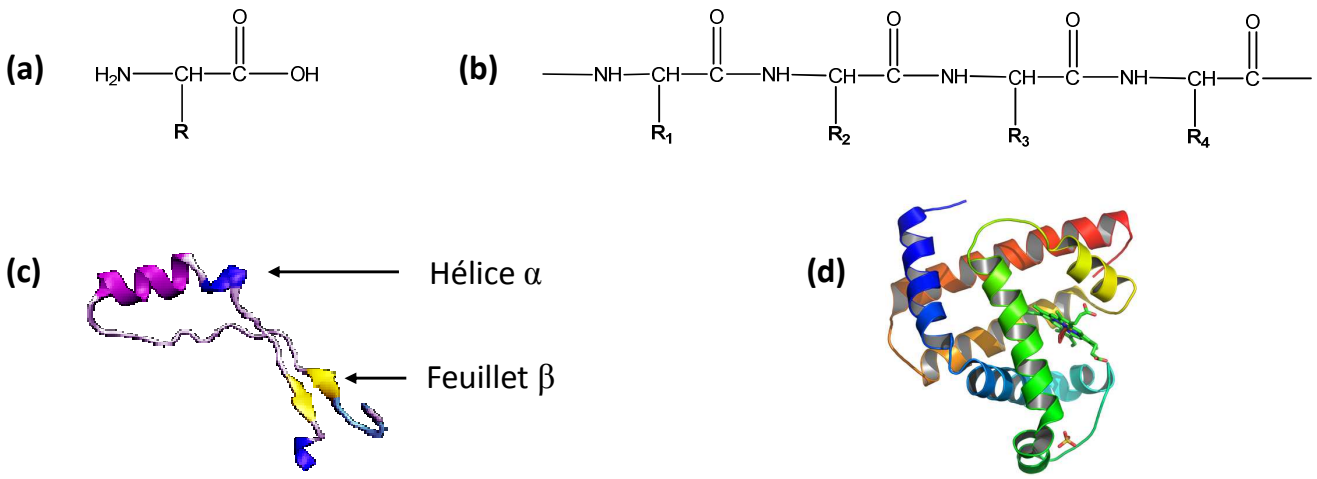


figure 2 : (a) acide aminé où –R est une des 20 chaînes latérales du vivant qui existent ; (b) peptide dont l'enchaînement d'acides aminés constitue la structure primaire ; (c) hélice α et feuillet β, deux exemples de structure secondaire ; (d) structure tertiaire (myoglobine)

Les protéines sont des macromolécules biologiques qui assurent la majorité des fonctions cellulaires. Elles peuvent jouer un rôle structurel, catalytique, enzymatique, réguler la compaction de l'ADN ou l'expression des gènes. Le code génétique animal fait appel à 20 principaux acides aminés qui se différencient par leur chaîne latérale (figure 2.a). L'ordre dans lequel s'enchaînent les acides aminés qui composent une protéine constitue la structure primaire d'une protéine (figure 2.b). L'agencement dans l'espace des acides aminés d'une protéine, les uns par rapport aux autres, constitue sa structure secondaire (figure 2.c). La structure tertiaire correspond à l'agencement des hélices et des feuillets entre eux (figure 2.d). La fonction et l'activité d'une protéine vont dépendre de sa structure tridimensionnelle définie par ces différents niveaux de structure (primaire, secondaire, tertiaire, …).

Des protéines déficientes peuvent être remplacées par des médicaments qui miment leur partie fonctionnelle. Cependant, pour de nombreuses protéines, le lien qui existe entre leur fonction et leur structure n'est pas encore bien connu. La protéomique, qui vise entre autre à mieux comprendre la relation entre la structure et la fonction des protéines, est un domaine en plein essor. Différentes techniques ont été développées pour extraire, séparer, identifier et quantifier des protéines. L'identification et la caractérisation se fait principalement par spectrométrie de masse. Les protéines étudiées sont ionisées et mises en phase gazeuse. La spectrométrie de masse étant basée sur la mesure du rapport masse sur charge, une ionisation préalable est donc nécessaire. Grâce au développement, dans les années 80, de sources à ionisation douce utilisées en spectrométrie de masse (ESI : Electrospray Source Ionisation [3], MALDI :

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation [4, 5]), la mise en phase gazeuse de systèmes biologiques de haut poids moléculaire a été rendue possible. De façon générale, l'étude de molécules biologiques sous vide permet de caractériser leurs propriétés intrinsèques en éliminant toutes les perturbations extérieures liées à la présence d'un solvant.

Pour un ensemble de protéines issues d'une extraction cellulaire, l'analyse par spectrométrie de masse des peptides produits après digestion enzymatique permet difficilement d'identifier les protéines initiales. Chaque molécule ionisée est isolée puis fragmentée. En comparant les fragments obtenus à des bases de données, on peut alors identifier précisément les protéines issues de l'extraction. Chaque fragment peut être isolé et fragmenté plusieurs fois de façons consécutives afin d'identifier plus précisément sa composition (spectrométrie de masse tandem, MS^n). La fragmentation en phase gazeuse est également utilisée pour identifier la localisation de modifications structurelles (phosphorylation, glycosylation…) d'un peptide ou d'une protéine. Ces modifications structurelles jouent un rôle important dans l'activité biologique de ces molécules. Il existe de nombreuses méthodes de fragmentation qui ont chacune leur spécificité. On différencie deux principaux types de fragmentation : les fragmentations produites par excitation vibrationnelle et celles produites par excitation électronique. Dans la suite de cette introduction nous présenterons les principaux types de fragmentations utilisés en spectrométrie de masse et leurs caractéristiques et nous terminerons par la photofragmentation UV dont la caractérisation des mécanismes est le sujet de cette thèse.

La dissociation induite par collisions (CID), méthode d'activation vibrationnelle, est la fragmentation la plus utilisée en protéomique [6-8]. De multiples collisions à basse énergie (de 1 eV à quelques dizaines d'eV) entre la molécule et un gaz neutre induisent un chauffage vibrationnel progressif de la molécule. La molécule fragmente suivant ses liaisons les plus fragiles (liaisons peptidiques [9]) dès que l'énergie suffisante est apportée. La fragmentation de ces liaisons qui relient les acides aminés entre eux permet d'obtenir des informations sur la structure primaire du peptide étudié. Les collisions à haute-énergie (keV) consistent en une forte activation vibrationnelle. Ici, l'énergie apportée au système peut être transformée en excitation électronique, via le couplage aux états excités, et produire un autre type de fragmentation que celles classiquement observées en CID [10]. La dissociation induite par des photons infra-rouge (IRMPD) [11-13] est également une technique d'activation vibrationnelle. Ce type de fragmentation est principalement utilisé dans les dispositifs qui nécessitent un vide poussé (FT-ICR) afin de ne pas y introduire de gaz supplémentaire. Ce processus d'absorption multiphotonique produit le même type de fragmentations que celles observées en CID.

En CID, l'énergie est répartie de façon statistique sur l'ensemble des modes de vibrations du système. Le temps de fragmentation augmente donc avec la taille du système. Pour les systèmes de grande taille, la fragmentation par CID est peu efficace. C'est pourquoi, au début des années 2000, de nouvelles méthodes de fragmentation mettant en jeu une activation électronique (ergodique, non-reliée à la taille du système) ont été mises au point, induisant des fragmentations différentes et complémentaires à celles observées en CID. Les fragmentations induites par capture d'électron (ECD) [14] et par transfert d'électron (ETD) [15, 16] ont été développées pour l'étude de protéines et peptides positivement chargés. Un électron de faible énergie (quelques dixièmes d'eV) est capté sur le site de protonation ou par un atome fortement électronégatif de la molécule (oxygène des carbonyles). L'attachement de cet électron de faible énergie modifie la structure électronique du système et entraîne la fragmentation de liaisons particulières, plus coûteuses en énergie que les liaisons peptidiques. Ces fragmentations se produisent avant redistribution de l'énergie sous forme vibrationnelle (fragmentations ergodiques ou non-statistiques). Ainsi les liaisons plus fragiles telles les liaisons peptidiques, celles des modifications post-traductionnelles et certaines liaisons hydrogène [17] peuvent être conservées. Ce type de fragmentation permet donc d'obtenir une information partielle sur la structure secondaire du peptide étudié.

Les méthodes de photodissociations UV et VUV sont également des techniques d'activation électronique mais mettent en jeu des mécanismes plus complexes. Après absorption d'un photon UV (ou VUV), comme illustré sur la figure 3, on observe :

- des fragmentations ergodiques ou non-statistique, spécifiques UV, induites dans l'état excité
- des fragmentations statistiques, de type CID, non-spécifiques UV, induites après conversion interne vers l'état fondamental et relaxation vibrationnelle.

La photodissociation VUV a essentiellement été étudiée dans le cas d'ions positifs, avec des lasers à 193 nm (6.4 eV) et 157 nm (7.9 eV) [18, 19]. A ces longueurs d'onde, la plupart des électrons des liaisons π peuvent être excités, en particulier les doubles liaisons π des CO. De nombreuses fragmentations de liaisons peptidiques sont observées comme en CID mais, récemment, cette technique a mis en évidence des fragmentations spécifiques (rupture de chaînes latérales) [20, 21].

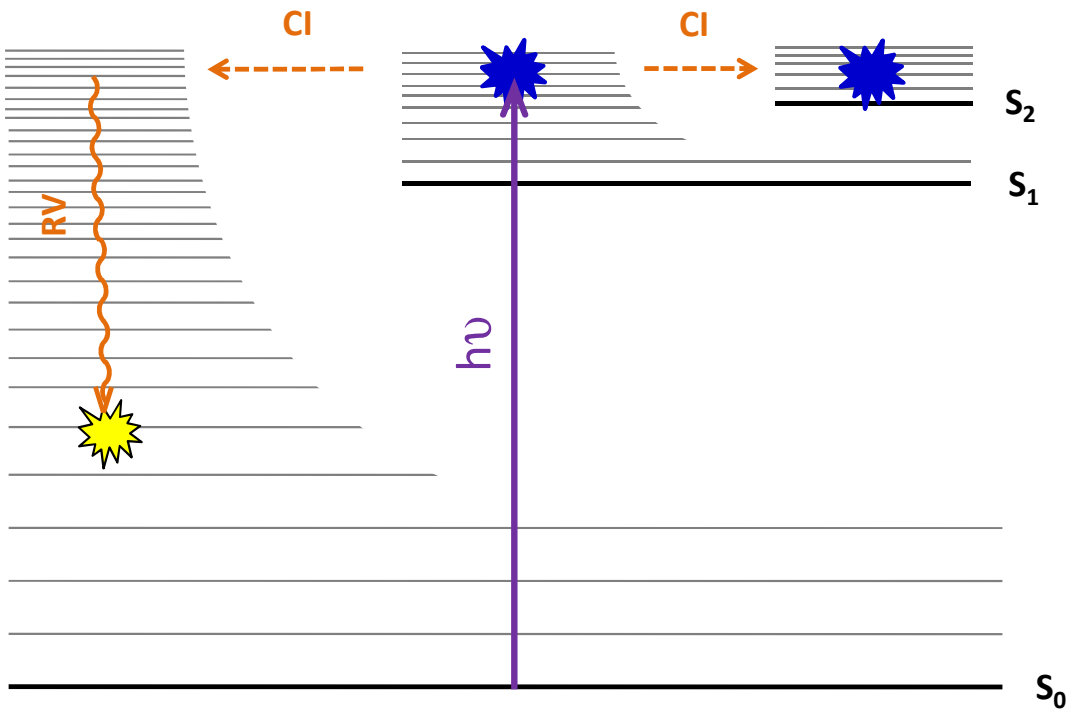


figure 3 : partie d'un diagramme de Perrin-Jablonski illustrant différents processus induits après absorption d'un photon UV (CI : Conversion Interne, RV : Relaxation vibrationnelle). Les fragmentations spécifiques UVPD induites, dans l'état excité, sont indiquées par une étoile bleue ; celles non-spécifiques UV, type CID, induites dans l'état fondamental, sont indiquées par une étoile jaune

Les photons UV à 266 nm (4.6 eV) n'excite que les électrons π des acides aminés aromatiques contenus dans un peptide ou une protéine. Gabryelski & Li [22] ont été parmi les premiers à mettre en évidence la présence de fragments spécifiques UV, induits avec un laser à 266 nm. Les groupes de Kim [23] et Dugourd [24, 25], pour des peptides contenant plus d'une dizaine d'acides aminés dont au moins un aromatique, ont montré que la perte de la chaîne latérale aromatique est une fragmentation spécifique UV. Ils ont également observé des fragments de type CID principalement localisées autour de l'acide aminé aromatique (fragmentation dans l'état fondamental avant redistribution complète de l'énergie vibrationnelle). Puisqu'on contrôle la localisation de l'énergie du photon UV, un des enjeux de la photofragmentation UV est d'essayer de contrôler également la localisation des fragmentations photo-induites. Grâce à des modifications chimiques effectuées sur certains acides aminés (iodination des Tyrosines [26, 27], phosphorylation des Sérines et Thréonines [28], modification des Cystéines par une quinone [29]), le groupe de R. Julian a montré que la photodissociation UV (266 nm) possède un intérêt en

chimie analytique notamment en ce qui concerne la localisation de modifications post-traductionnelles.

Le travail de thèse présenté ici a pour but d'apporter de nouvelles informations sur les mécanismes de photofragmentation UV afin d'améliorer leur compréhension. Une des difficultés dans l'étude des mécanismes de photodissociation UV est liée à la compétition qui existe entre les processus induits dans l'état fondamental et ceux induits dans l'état excité (figure 3). Ces deux types de processus peuvent présenter les mêmes canaux de fragmentation et ne sont pas différenciables avec les appareils de spectrométrie de masse « traditionnels ». Une façon de discriminer ces deux processus est de considérer la dynamique qui les gouverne. Les fragmentations spécifiques UV qui mettent en jeu le passage par un ou des états excités, sont des fragmentations ultra-rapides. Des expériences de spectroscopie UV effectuées à très basse température (quelques dizaines de K), par le groupe de T. Rizzo [30, 31], ont montré qu'il existe un lien entre la conformation des molécules, les canaux de fragmentation UV observés et les rapports de branchement qui en découlent. Ces observations confirment l'implication dans les transitions UV de processus de fragmentation ultra-rapides induits avant redistribution vibrationnelle.

Le travail présenté dans cette thèse est basé sur l'analyse de la dynamique de photofragmentation UV. Contrairement aux expériences impliquant des collisions et où une absorption multiphotonique, l'absorption d'un photon UV unique correspond à l'apport d'une quantité définie d'énergie au système, à un instant précis, qui permet des mesures de dynamique de fragmentation. La différenciation des mécanismes photo-induits grâce aux informations dynamiques est basée sur le fait que :

- chaque été excité possède sa dynamique propre alors que tous les canaux produits dans l'état fondamental sont liés à une même dynamique induite par la conversion interne vers l'état fondamental
- les temps de fragmentation liés aux dissociations induites dans l'état excité sont ultra-rapides alors que ceux liés aux dissociations induites dans l'état fondamental se comportent de façon statistique et évoluent avec la taille du système.

Le dispositif expérimental utilisé au cours de cette thèse est issu d'une collaboration entre le groupe de J. Fayeton (LCAM) et celui de C. Jouvet (LPPM). Cette collaboration, commencée en 2001, avait pour but d'étudier la femtochimie d'agrégats d'Hélium. C'est pourquoi le dispositif a été initialement implanté dans le bâtiment Elyse du LCP, qui mettait à disposition partielle un

laser femtoseconde. Les systèmes d'étude ont ensuite évolué ainsi que le dispositif expérimental initial qui s'est scindé en deux dispositifs différents. L'apport d'une source électrospray par le LPL (Paris 13), également impliqué dans cette collaboration, a permis de s'orienter vers l'étude de petits systèmes biologiques protonés, dans la continuité des expériences précédemment réalisées par le groupe de C. Jouvet [32-40]. A partir de 2003, C. Jouvet et G. Grégoire ont développé un dispositif pompe-sonde (laser pompe : 266 nm, nanoseconde / laser sonde : IR, femtoseconde), couplant la source électrospray à une extraction par temps de vol. Ils ont montré que l'ajout du photon sonde modifie la durée de vie des états excités d'acides aminés aromatiques protonés [41-43] et de petits peptides contenant un chromophore [44, 45]. Ces expériences ont mis en évidence la présence d'états excités dissociatifs qui induisent des fragmentations spécifiques UV. Cependant mais la compréhension complète des résultats obtenus a été difficile [41-46].

Un deuxième dispositif, appelé « ARC EN CIEL » (AEC), a été développé parallèlement par l'équipe de J. Fayeton. Ce dispositif a été construit et testé au cours de la thèse de Valéria Lepère (2003/2006). Ces tests ont été effectués sur la photofragmentation UV (266 nm) d'agrégats d'Argon (Ar_2^+ et Ar_3^+) produits par une source à impact électronique. Le dispositif AEC, utilisé pour réaliser les expériences présentées dans cette thèse, est basé sur la détection en coïncidence des photofragments neutres et ioniques pour des temps de fragmentation inférieurs à la microseconde. Ce dispositif comprend également un piège à ion électrostatique de type Zajfmann qui permet l'étude de temps de fragmentation allant de la dizaine de microseconde à la seconde.

En 2006, la source électrospray jusqu'alors utilisée pour les expériences pompe-sonde a été adaptée au dispositif AEC. Ce couplage d'une source électrospray et d'un laser UV avec la détection en coïncidence des fragments ioniques et neutres, est unique en son genre. Actuellement aucun autre dispositif ne permet ainsi d'aborder réellement la dynamique de photofragmentation UV de biomolécules sur une aussi large échelle de temps (de la dizaine de nanoseconde jusqu'à la milliseconde). Les premiers résultats obtenus avec cette expérience sur la photofragmentation UV du Tryptophane protoné ont donné un éclairage nouveau aux expériences pompe-sonde réalisées précédemment [47-49]. Au cours de l'année 2007, le dispositif AEC a été amélioré afin de permettre des mesures précises de cinétiques sur des temps de quelques dizaines de nanosecondes.

Les expériences de spectrométrie de masse tandem (MS^n) réalisées avec des appareils commerciaux ne permettent pas d'observer et de sélectionner les fragments ioniques qui ont une durée de vie *inférieure* à la microseconde. Tous les phénomènes non-statistiques, très rapides,

issus des états excités ne sont alors pas observés. Le dispositif AEC met en jeu deux détecteurs qui vont permettre de détecter en coïncidence le ou les fragments neutres associés à chaque fragment ionique. Les techniques de coïncidence ion-neutres ont été développées depuis les années 70 au LCAM. Ces techniques ont été utilisées dans l'équipe de J.C. Brenot et J. Fayeton pour l'étude de collisions réactives [50], des mécanismes de fragmentation d'agrégats métalliques [51-54] et de gaz rare [55, 56].

Le dispositif AEC fait appel à un système de détection ultra-rapide (temps mort de 40 ns pour le détecteur de neutre), spécifiquement dédié à l'étude des mécanismes de multifragmentaton. La technique des coïncidences permet de s'assurer qu'on considère une « bonne association » ion-neutre(s) (particules issues d'un même évènement de fragmentation). La connaissance du nombre de fragments neutres associés à chaque fragment ionique permet de remonter au nombre d'étapes de fragmentation. La détection en coïncidence et l'identification des fragments neutres détectés est permise grâce à l'utilisation de détecteurs sensibles en temps et en position. Notons que les expériences réalisées avec le dispositif AEC ont jusqu'ici été limités à la détection d'un seul ion et donc principalement à l'étude de systèmes simplement chargés (positivement ou négativement). L'expérience pourrait toutefois être aisément étendue à l'étude de la fragmentation d'ions multichargés.

Le dispositif expérimental utilisé est relativement complexe. Une description très détaillée de ce dispositif est donnée dans le chapitre I de ce mémoire afin de permettre une meilleure compréhension des expériences réalisées et des résultats obtenus au cours de cette thèse. Ce chapitre présente entre autre la source « électrospray », le piège électrostatique et le système complexe de détection des fragments ioniques et neutres en « multi-coïncidence ».

La détection en multi-coïncidence entraîne la génération de nombreuses données complexes à analyser. Avant de présenter les résultats obtenus, le chapitre II décrit de façon générale les techniques d'analyse et de traitement utilisées. On y présente les corrélations entre observables les plus judicieuses, qui permettront de remonter à la dynamique de fragmentation du système étudié. Le traitement des mécanismes de fragmentation en plusieurs étapes (détection de plus de deux particules en coïncidence) est longuement détaillé. Nous nous sommes également aidés d'un code de simulation de l'expérience, présenté dans ce chapitre.

Une étude complète de la photodissociation du Tryptophane protoné a été effectuée avant mon arrivée au laboratoire [47]. D'autres résultats, concernant la perte de la chaîne latérale

aromatique, étaient en cours de discussion quand j'ai commencé ma thèse [57]. Ces résultats préliminaires sont exposés dans le chapitre III. Après avoir étudié les mécanismes de photofragmentation du Tryptophane protoné isolé, nous nous sommes intéressés au cours de ma thèse à l'influence de la solvatation par un éther-couronne sur la dynamique de photofragmentation du Tryptophane protoné [58]. Ces résultats constituent la deuxième partie du chapitre III. L'étude des complexes Tryptophane-(éther-couronne), menée en collaboration avec l'équipe danoise d'Aarhus, a permis de comparer les temps de fragmentation statistiques mesurés avec nos deux dispositifs et de donner une estimation de l'énergie interne des molécules étudiées avec notre dispositif.

Le chapitre IV présente la majeure partie des résultats obtenus au cours de cette thèse. Nous avons étudié la dynamique de photofragmentation de petits peptides protonés contenant le Tryptophane et mis en évidence l'influence de la position du Tryptophane sur les mécanismes de fragmentation [59]. Les résultats obtenus sur six dipeptides et un tripeptide sont présentés, comparés entre eux et comparés aux mécanismes précédemment établis pour le Tryptophane protoné. Des mécanismes de photofragmentation différents, liés à l'ordre des acides aminés dans la chaîne peptidique, ont été mis en évidence par cette étude.

Nous nous sommes également intéressés à l'étude de nucléotides (ADN). En effet, des mesures de temps de vie ont montré que, pour des nucléotides négativement et positivement chargés, la photodissociation UV entraîne une compétition entre fragmentations statistiques et non-statistiques pour ces biomolécules aromatiques [60]. L'étude de la dynamique de photofragmentation UV de l'adénine protonée avec notre dispositif expérimental a conduit à la rédaction d'un article [61], en collaboration avec l'équipe coréenne de Park, qui constitue le chapitre V de cette thèse.

Bibliographie

1. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml, page web.
2. http://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_d%C3%A9soxyribonucl%C3%A9ique, page web.
3. M. Yamashita, J.B. Fenn, *Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme.* Journal of Physical Chemistry, 1984. 88(20): p. 4451-4459.
4. M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds.* International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1987. 78: p. 53-68.
5. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988. 2(8): p. 151-153.
6. R.G. Cooks, *Collision-Induced Dissociation - Readings and Commentary.* Journal of Mass Spectrometry, 1995. 30(9): p. 1215-1221.
7. A.K. Shukla, J.H. Futrell, *Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation.* Journal of Mass Spectrometry, 2000. 35(9): p. 1069-1090.
8. J.M. Wells, S.A. McLuckey, *Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins*, in *Biological Mass Spectrometry*. 2005, Elsevier Academic Press Inc: San Diego. p. 148-185.
9. B. Paizs, S. Suhai, *Fragmentation pathways of protonated peptides.* Mass Spectrometry Reviews, 2005. 24(4): p. 508-548.
10. K.F. Medzihradszky, J.M. Campbell, M.A. Baldwin, A.M. Falick, P. Juhasz, M.L. Vestal, A.L. Burlingame, *The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer.* Analytical Chemistry, 2000. 72(3): p. 552-558.
11. J.S. Brodbelt, J.J. Wilson, *Infrared Multiphoton Dissociation in Quadrupole Ion Traps.* Mass Spectrometry Reviews, 2009. 28(3): p. 390-424.
12. D.P. Little, J.P. Speir, M.W. Senko, P.B. Oconnor, F.W. McLafferty, *Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply-Charged Ions for Biomolecule Sequencing.* Analytical Chemistry, 1994. 66(18): p. 2809-2815.
13. J.A. Madsen, J.S. Brodbelt, *Comparison of Infrared Multiphoton Dissociation and Collision-Induced Dissociation of Supercharged Peptides in Ion Traps.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. 20(3): p. 349-358.
14. R.A. Zubarev, N.L. Kelleher, F.W. McLafferty, *Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process.* Journal of the American Chemical Society, 1998. 120(13): p. 3265-3266.
15. H.L. Han, Y. Xia, S.A. McLuckey, *Ion trap collisional activation of c and z(center dot) ions formed via gas-phase ion/ion electron-transfer dissociation.* Journal of Proteome Research, 2007. 6(8): p. 3062-3069.
16. J.E.P. Syka, J.J. Coon, M.J. Schroeder, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry.* Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. 101(26): p. 9528-9533.

17. R.A. Zubarev, D.M. Horn, E.K. Fridriksson, N.L. Kelleher, N.A. Kruger, M.A. Lewis, B.K. Carpenter, F.W. McLafferty, *Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations.* Analytical Chemistry, 2000. 72(3): p. 563-573.

18. W.D. Bowers, S.S. Delbert, R.L. Hunter, R.T. McIver, *Fragmentation of Oligopeptide Ions Using Ultraviolet-Laser Radiation and Fourier-Transform Mass-Spectrometry.* Journal of the American Chemical Society, 1984. 106(23): p. 7288-7289.

19. E.R. Williams, F.W. McLafferty, *193-Nm Laser Photoionization and Photodissociation for Isomer Differentiation in Fourier-Transform Mass-Spectrometry.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1990. 1(5): p. 361-365.

20. J.P. Reilly, *Ultraviolet Photofragmentation of Biomolecular Ions.* Mass Spectrometry Reviews, 2009. 28(3): p. 425-447.

21. M.S. Thompson, W.D. Cui, J.P. Reilly, *Factors that impact the nacuum ultraviolet photofragmentation of peptide ions.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. 18(8): p. 1439-1452.

22. W. Gabryelski, L. Li, *Photo-induced dissociation of electrospray generated ions in an ion trap/time-of-flight mass spectrometer.* Review of Scientific Instruments, 1999. 70(11): p. 4192-4199.

23. J.Y. Oh, J.H. Moon, M.S. Kim, *Sequence- and site-specific photodissocniation at 266nm of protonated synthetic polypeptides containing a tryptophanyl residue.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. 18(22): p. 2706-2712.

24. L. Joly, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, J. Lemoine, *Specific UV photodissociation of tyrosyl-containing peptides in multistage mass spectrometry.* Journal of Mass Spectrometry, 2007. 42(6): p. 818-824.

25. T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, *Specific photodissociation of peptides with multi-stage mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. 19(20): p. 2883-2892.

26. T. Ly, R.R. Julian, *Elucidating the Tertiary Structure of Protein Ions in Vacuo with Site Specific Photoinitiated Radical Reactions.* Journal of the American Chemical Society, 2010. 132(25): p. 8602-8609.

27. Q. Sun, S. Yin, J.A. Loo, R.R. Julian, *Radical Directed Dissociation for Facile Identification of Iodotyrosine Residues Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry.* Analytical Chemistry, 2010. 82(9): p. 3826-3833.

28. J.K. Diedrich, R.R. Julian, *Facile Identification of Phosphorylation Sites in Peptides by Radical Directed Dissociation.* Analytical Chemistry, 2011. 83(17): p. 6818-6826.

29. J.K. Diedrich, R.R. Julian, *Site-Selective Fragmentation of Peptides and Proteins at Quinone-Modified Cysteine Residues Investigated by ESI-MS.* Analytical Chemistry, 2010. 82(10): p. 4006-4014.

30. J.A. Stearns, S.b. Mercier, C. Seaiby, M. Guidi, O.V. Boyarkin, T.R. Rizzo, *Conformation-Specific Spectroscopy and Photodissociation of Cold, Protonated Tyrosine and Phenylalanine.* Journal of the American Chemical Society, 2007. 129(38): p. 11814-11820.

31. J.A. Stearns, M. Guidi, O.V. Boyarkin, T.R. Rizzo, *Conformation-specific infrared and ultraviolet spectroscopy of tyrosine-based protonated dipeptides.* Journal of Chemical Physics, 2007. 127(15): p. 7.

32. S. Martrenchard-Barra, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, D. Solgadi, M. Vervloet, G. Gregoire, I. Dimicoli, *Proton-transfer reaction in the ground state of phenol-ammonia clusters: an experimental study.* Chemical Physics Letters, 1999. 310(1-2): p. 173-179.

33. G.A. Pino, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, C. Jouvet, S. Martrenchard, D. Solgadi, *Intracluster hydrogen transfer followed by dissociation in the phenol-(NH3)(3) excited state: PhOH(S-1)-(NH3)(3)-> PhO center dot+(NH4)(NH3)(2).* Journal of Chemical Physics, 1999. 111(24): p. 10747-10749.

34. G. Gregoire, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, A. Peremans, D. Solgadi, *Picosecond hydrogen transfer in the phenol-(NH3)(n=1-3) excited state.* Journal of Physical Chemistry A, 2000. 104(40): p. 9087-9090.

35. G. Pino, G. Gregoire, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, D. Solgadi, *A forgotten channel in the excited state dynamics of phenol-(ammonia)(n) clusters: hydrogen transfer.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2000. 2(4): p. 893-900.

36. G. Gregoire, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, D. Solgadi, *Has the excited state proton transfer ever been observed in phenol-(NH3)(n) molecular clusters?* Journal of Physical Chemistry A, 2001. 105(25): p. 5971-5976.

37. C. Dedonder-Lardeux, D. Grosswasser, C. Jouvet, S. Martrenchard, *Dissociative hydrogen transfer in indole-(NH3)(n) clusters.* Physchemcomm, 2001(4): p. art. no.-4.

38. O. David, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, *Is there an excited state proton transfer in phenol (or 1-naphthol)-ammonia clusters? Hydrogen detachment and transfer to solvent: a key for non-radiative processes in clusters.* International Reviews in Physical Chemistry, 2002. 21(3): p. 499-523.

39. A.L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, *Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive (1)pi sigma* states: A new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2002. 4(7): p. 1093-1100.

40. C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Perun, A.L. Sobolewski, *External electric field effect on the lowest excited states of indole: ab initio and molecular dynamics study.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2003. 5(22): p. 5118-5126.

41. H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Control of bond-cleaving reactions of free protonated tryptophan ion by femtosecond laser pulses.* Journal of Physical Chemistry A, 2005. 109(11): p. 2417-2420.

42. H. Kang, C. Jouvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, C. Charriere, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Photoinduced processes in protonated tryptamine.* Journal of Chemical Physics, 2005. 122(8): p. 7.

43. H. Kang, C. Jouvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Ultrafast deactivation mechanisms of protonated aromatic amino acids following UV excitation.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2005. 7(2): p. 394-398.

44. G. Gregoire, H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, C. Desfrancois, D. Onidas, V. Lepere, J.A. Fayeton, *Statistical vs. non-statistical deactivation pathways in the UV photo-*

fragmentation of protonated tryptophan-leucine dipeptide. Physical Chemistry Chemical Physics, 2006. 8(1): p. 122-128.

45. G. Gregoire, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, C. Desfrancois, J.A. Fayeton, *Ultrafast excited state dynamics in protonated GWG and GYG tripeptides.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2007. 9(1): p. 78-82.

46. H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Photo-induced dissociation of protonated tryptophan TrpH(+): A direct dissociation channel in the excited states controls the hydrogen atom loss.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2004. 6(10): p. 2628-2632.

47. V. Lepere, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, V.J. Picard, C. Jouvet, P. Carcabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, A. Fujii, *Comprehensive characterization of the photodissociation pathways of protonated tryptophan.* J Chem Phys, 2007. 127(13): p. 134313.

48. V. Lepere, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, Y.J. Picard, C. Jouvet, P. Carcabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, A. Fujii, *Characterization of neutral fragments issued from the photodissociation of protonated tryptophane.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2007. 9(39): p. 5330-5334.

49. B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, M. Perot, C. Jouvet, G. Gregoire, S. Brondsted Nielsen, *Mechanisms of photoinduced Calpha[Single Bond]Cbeta bond breakage in protonated aromatic amino acids.* J Chem Phys, 2008. 128(16): p. 164302.

50. J.A. Fayeton, J.C. Brenot, M. Durupferguson, M. Barat, *Reactive and Detachment Processes in Halide Ion-H-2 Collisions.* Chemical Physics, 1989. 133(2): p. 259-269.

51. M. Barat, J.C. Brenot, H. Dunet, J.A. Fayeton, Y.J. Picard, *Collision induced fragmentation of small ionic sodium clusters. II. Three-body fragmentation.* Journal of Chemical Physics, 2000. 113(3): p. 1061-1066.

52. M. Barat, J.C. Brenot, J.A. Fayeton, Y.J. Picard, *Absolute detection efficiency of a microchannel plate detector for neutral atoms.* Review of Scientific Instruments, 2000. 71(5): p. 2050-2052.

53. M. Barat, J.C. Brenot, J.A. Fayeton, Y.J. Picard, *Collision induced fragmentation of small ionic argon clusters.* Journal of Chemical Physics, 2002. 117(4): p. 1497-1506.

54. J.A. Fayeton, M. Barat, J.C. Brenot, H. Dunet, Y.J. Picard, U. Saalmann, R. Schmidt, *Detailed experimental and theoretical study of collision-induced dissociation of Na-2(+) ions on He and H-2 targets at keV energies.* Physical Review A, 1998. 57(2): p. 1058-1068.

55. V. Lepere, Y.J. Picard, M. Barat, J.A. Fayeton, B. Lucas, K. Beroff, *Photodissociation dynamics of Ar-2+ and Ar-3+ excited by 527 nm photons.* Journal of Chemical Physics, 2009. 130(19): p. 7.

56. I.M. Ismail, V. Lepere, M. Barat, J.A. Fayeton, Y.J. Picard, K. Wohrer, *Dissociative charge transfer and collision induced dissociation of Ar[sub 2][sup +] and Ar[sub 3][sup +] clusters in collisions with argon atoms at keV energies.* The Journal of Chemical Physics, 2006. 124(16): p. 164305-7.

57. B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, M. Perot, C. Jouvet, G. Gregoire, S.B. Nielsen, *Mechanisms of photoinduced C-alpha-C-beta bond breakage in protonated aromatic amino acids.* Journal of Chemical Physics, 2008. 128(16): p. 7.

58. U. Kadhane, M. Perot, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Jouvet, A. Ehlerding, M.B.S. Kirketerp, S.B. Nielsen, J.A. Wyer, H. Zettergren, *Photodissociation of protonated tryptamine and its supramolecular complex with 18-crown-6 ether: Dissociation times and channels, absorption spectra, and excited states calculations.* Chemical Physics Letters, 2009. 480(1-3): p. 57-61.

59. M. Perot, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Jouvet, *Mechanisms of UV Photodissociation of Small Protonated Peptides.* Journal of Physical Chemistry A, 2010. 114(9): p. 3147-3156.

60. S.B. Nielsen, J.U. Andersen, J.S. Forster, P. Hvelplund, B. Liu, U.V. Pedersen, S. Tomita, *Photodestruction adenosine 5 '-monophosphate (AMP) nucleotide ions in vacuo: Statistical versus nonstatistical processes.* Phys. Rev. Let., 2003. 91(4).

61. N.R. Cheong, S.H. Nam, H.S. Park, S. Ryu, J.K. Song, S.M. Park, M. Perot, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Jouvet, *Photofragmentation in selected tautomers of protonated adenine.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. 13(1): p. 291-295.

CHAPITRE I

Description du dispositif expérimental

CHAPITRE I. DESCRIPTION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL 21

I.1 Description générale 21

I.2 Source d'ions électrospray 24
I.2.1 Formation du cône de Taylor 24
I.2.2 Formation du jet vaporisé et désolvatation des gouttelettes 25
I.2.3 Formation des ions en phase gazeuse 26
I.2.4 Dispositif électrospray utilisé et optimisation des paramètres influençant le rendement d'ionisation de l'électrospray 28

I.3 Formation, accélération et sélection en masse des paquets d'ions 29
I.3.1 Hexapole, zone de confinement avant extraction 30
I.3.2 Formation de paquets d'ions 31
I.3.3 Contrôle du signal d'ions 32
I.3.4 Tube de Gauss et déflecteur électrostatique 32

I.4 Laser 33

I.5 Piège ionique électrostatique 34
I.5.1 Description du piège 35
I.5.2 Synchronisation 38
I.5.3 Piégeage des ions fragments 39
I.5.4 Résultats expérimentaux obtenus avec le piège électrostatique 41

I.6 Expériences en coïncidence 48
I.6.1 Post-accélération et zone d'interaction polarisée 48
I.6.2 Analyseur électrostatique 50
I.6.3 Observations expérimentales 52

I.7 Limitation angulaire du système de détection 56
I.7.1 Condition de détection des espèces neutres 57
I.7.2 Condition de détection des espèces chargées 58

I.8 Détecteurs à localisation et acquisition de données 60
I.8.1 Détection et localisation des particules neutres par la méthode des lignes à retard 60
I.8.2 Codage des données issues du détecteur de neutres 61
I.8.3 Détection et localisation des ions par la méthode de division de charge 63
I.8.4 Codage des données issues du détecteur d'ions 64

I.9 Synchronisation temporelle de l'expérience 65

I.10 Conclusion 68

Bibliographie 70

Annexe 1 : CTNM3 72

Annexe 2 : programme d'acquisition 74

CHAPITRE I. DESCRIPTION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL

I.1 Description générale

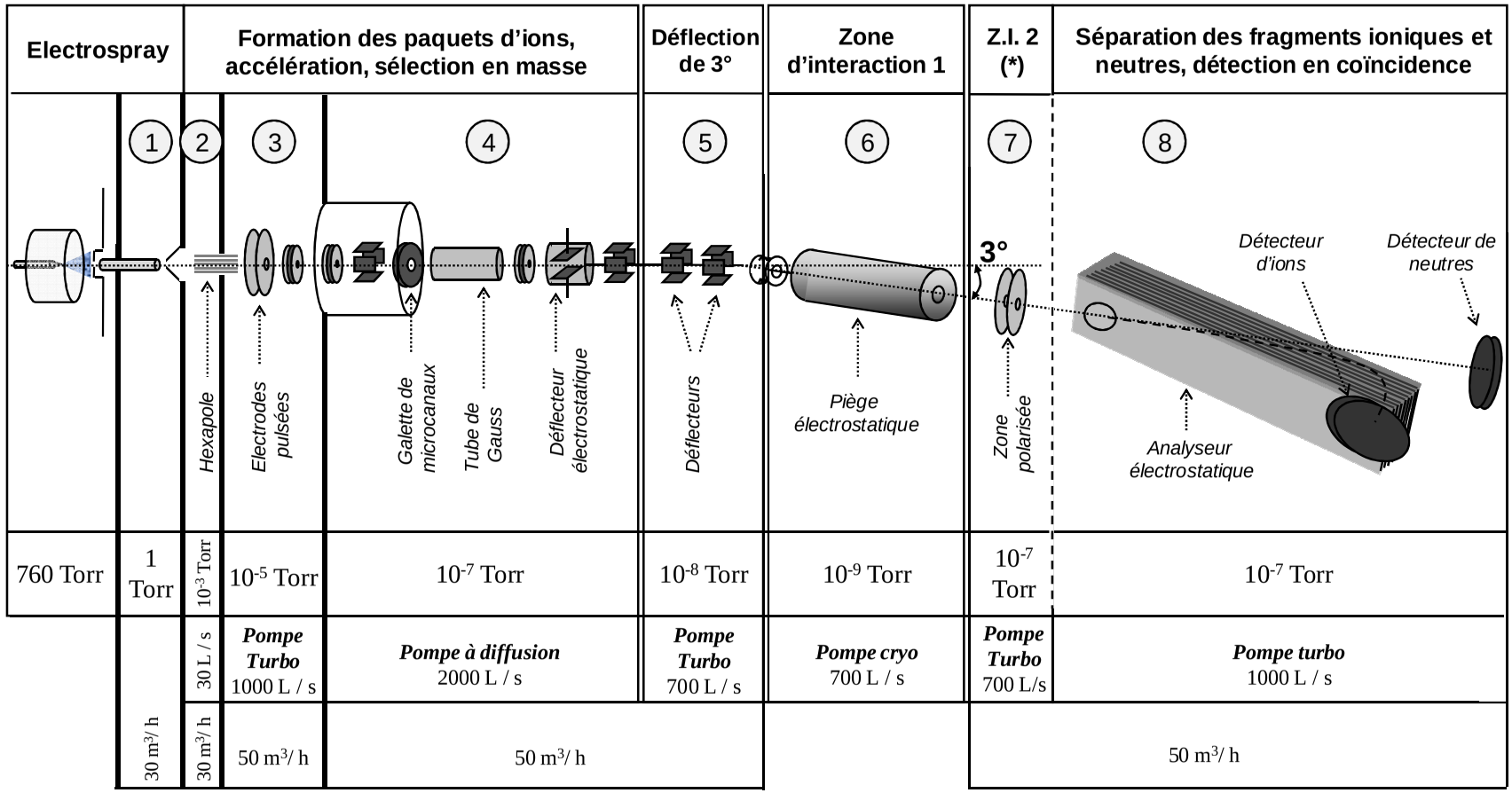
Un schéma simplifié de l'expérience ARC-EN-CIEL est présenté sur la figure I.1. Notre dispositif comprend huit enceintes de vide différentiel. Ces enceintes sont numérotées de 1 à 8 sur la figure I.1. La description du dispositif, présentée ci-dessous, s'appuie sur cette numérotation des enceintes et fait référence aux paragraphes de ce chapitre où sont donnés plus de détails.

Nous étudions des molécules d'intérêt biologique protonées. Ces ions sont produits à pression atmosphérique par une source de type électrospray [1, 2] décrite au § I.2.

Le § I.3 regroupe une description détaillée du contenu des enceintes n°2 à 5.

A la sortie de l'électrospray, les ions formés sont confinés dans un hexapole grâce à un potentiel répulsif (enceinte n°2). Ces ions ont une énergie de quelques eV. Ils sont extraits de l'hexapole pendant un temps très bref. Cette extraction permet de produire un paquet d'ions d'intensité suffisante, avec une faible largeur temporelle (centaine de nanosecondes) (enceinte n°3). La fréquence de production des paquets d'ions (1 kHz) est dictée par la fréquence du laser de photofragmentation pour que chaque paquet d'ions puisse interagir avec une impulsion laser. Un laser à haute cadence est utilisé pour minimiser le temps d'accumulation des expériences en coïncidences.

Les paquets d'ions sont accélérés à 2,4 keV et défléchis sur le bord d'un 1er détecteur à galettes microcanaux, percé en son centre (enceinte n°4). Ce détecteur permet d'effectuer une mesure du temps de vol des ions produits par la source électrospray. On optimise les masses et intensités des ions produits en ajustant les paramètres de la source. Une fois ce réglage effectué, les déflecteurs situés devant le détecteur sont ajustés afin de laisser passer le faisceau d'ions au centre du détecteur percé.



(*) Z.I.: zone d'interaction

Figure I.1 : vue générale du dispositif et du système de pompage

Les ions pénètrent dans un tube métallique (tube dit « de Gauss »), initialement porté à une tension de -2,5 kV (enceinte n°4). Une fois le paquet d'ions à l'intérieur de ce tube, le potentiel du tube est amené à 0 V. A la sortie du tube, les ions ont toujours la même énergie cinétique de 2.5 keV mais qui est référencée par rapport au potentiel de la masse. Une sélection en masse des ions est ensuite effectuée par un déflecteur électrostatique constitué de deux plaques parallèles auxquelles on applique une rampe de tension (enceinte n°4). La synchronisation du passage à 0 V de la rampe de tension permet de sélectionner en fonction de leur temps de vol les ions qui passent à travers le déflecteur.

Durant cette première partie du trajet, les ions traversent des enceintes où la pression résiduelle varie de 10^{-1} à 10^{-7} Torr. Le faisceau d'ions est pollué par des particules neutres produites par collision avec le gaz résiduel auxquelles s'ajoutent des molécules neutres issues de l'électrospray. Pour s'affranchir de ces neutres parasites, on défléchit le faisceau d'ions incidents d'un angle de 3° (enceinte n°5).

Notre dispositif présente deux zones possibles d'interaction entre les ions et le laser UV : le piège électrostatique (enceinte n°6, décrit au § I.5) et la zone polarisée (enceinte n°7, décrite au § I.6). Le laser UV utilisé pour la fragmentation est envoyé dans l'une des deux zones d'interaction suivant le type d'expérience que l'on souhaite réaliser.

Tous les produits de fragmentation pénètrent avec un angle de 45° dans un analyseur électrostatique dans lequel règne un champ électrique uniforme (enceinte n°8, cf § I.6.2). Les produits de fragmentation sont des fragments ioniques et des fragments neutres. Les fragments neutres produits continuent leur trajectoire en ligne droite et sont reçus sur un 1er détecteur sensible en temps et en position. Les fragments ioniques sont défléchis par le champ électrique de l'analyseur. Seuls les fragments ioniques dans une certaine gamme de *m/z* arrivent sur le détecteur d'ions qui est sensible en temps et en position. La technologie des détecteurs est décrite dans le § I.8. On ajuste la valeur du champ électrique pour faire glisser la fenêtre des ions *m/z* détectés.

Les fragments ioniques et neutres sont détectés dans un système dit de « multicoïncidence » dans lequel leurs temps et positions d'arrivée (t_i, y_i, z_i, t_n, y_n, z_n), avec les indices « i » et « n » pour les ions et les neutres respectivement, permettent d'obtenir des informations sur les processus de fragmentation.

I.2 Source d'ions électrospray

L'électrospray consiste à produire une vaporisation de fines gouttelettes auxquelles on applique un champ électrique intense [3-5]. Le but est de mettre en phase gazeuse, en les ionisant, des molécules non-volatiles [6], complexes et fragiles telles les molécules d'intérêt biologique, qui ont tendance à fragmenter et à se décomposer quand on les chauffe [7].

L'électrospray est une technique d'ionisation douce. Les molécules d'intérêt sont solvatées avant d'être mises en phase gazeuse. Les liaisons hydrogènes inter- et intramoléculaires présentes en phase aqueuse sont en partie conservée en phase gazeuse. Des expériences ont montré que la conformation d'une molécule formée par électrospray varie suivant la distribution de charges observées [8-10].

Dans une source électrospray, l'ionisation des molécules se produit à pression atmosphérique. Le composé à analyser est dissout dans un solvant (typiquement à une concentration comprise entre 50 et 250 µL.mol^{-1}). Une seringue fait passer la solution à vitesse volumique constante (quelques µL/min) à travers une aiguille. La solution est nébulisée dans la source par l'intermédiaire de cette aiguille. Le principe et le fonctionnement d'une source électrospray peut être décomposé en 3 étapes que nous allons détailler :

1. *la formation du cône de Taylor*
2. *la formation d'un jet vaporisé et la désolvatation des gouttelettes*
3. *la formation des ions en phase gazeuse*

Puis nous terminerons cette partie en décrivant plus précisément l'électrospray utilisé dans notre dispositif expérimental.

I.2.1 Formation du cône de Taylor

L'application d'une différence de potentiel (positive ou négative) de quelques kV entre l'aiguille et une contre-électrode (nommée « end-plate » dans notre dispositif) crée une accumulation de charges à la pointe de l'aiguille [3-5]. L'interface air/liquide se polarise et différents processus électrochimiques ont lieu, favorisant l'échange de charge et la création d'ions [11]. Les ions créés sont soit des cations, si on est en mode positif, soit des anions, si on est en mode négatif.

Une compétition entre la tension de surface et les forces électrostatiques exercées par le champ sur les ions accumulés à l'extrémité de l'aiguille, déforme le liquide qui prend alors la forme d'un cône (cône de Taylor) [12].

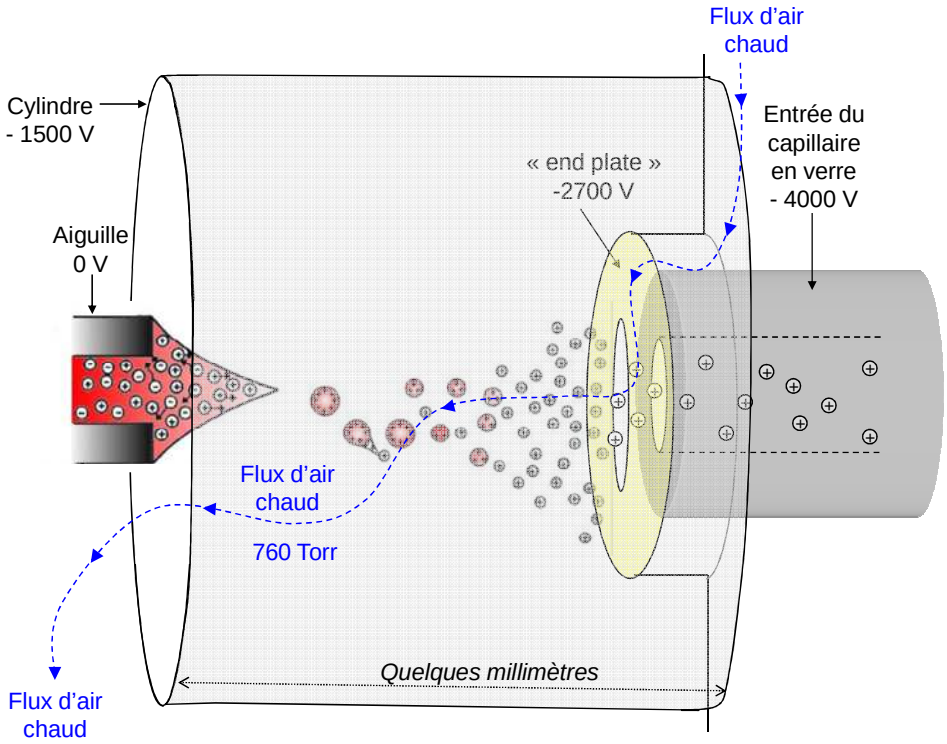


figure I.2 : Schéma de la source électrospray.

I.2.2 Formation du jet vaporisé et désolvatation des gouttelettes

La densité de charge augmente au niveau du cône de Taylor jusqu'à ce que la tension de surface soit trop faible pour maintenir la stabilité du cône (limite de Rayleigh) [13] et un petit jet fin se forme à l'extrémité du cône [14, 15].

(a) et (b) : images extraites de l'article de P. Nemes et al., Anal. Chem, 2007. **79**(8): p. 3105-3116

(c) : image provenant de la page web http://www.newobjective.com/electrospray/index.html

figure I.3 : Photos d'électrospray : (a) Cône de Taylor [15] ; (b) « ondes variqueuses » à l'origine de la formation des goutelettes [15] ; (c) jet vaporisé de molécules chargées [16].

L'interaction entre la viscosité et la tension de surface produit des « ondes variqueuses » à la surface du jet de liquide. Ces ondes augmentent en amplitude jusqu'à ce que le jet se décompose en une série de fines gouttelettes uniformes [14, 15]. Un flux de gaz chaud aide à évaporer les molécules de solvant. Ainsi la taille des gouttes formées diminue et la densité de charge augmente à leur surface. Quand la répulsion coulombienne est supérieure à la tension de surface, chaque goutte explose et se sépare en une multitude de gouttelettes chargées [13]. Ces gouttelettes qui contiennent un excès d'ions à leur surface se repoussent entre elles. Leurs trajectoires vont diverger et former un jet vaporisé. Ces processus d'évaporation et d'explosion se répètent plusieurs fois. Il y a ainsi une réduction massive et rapide de la taille des gouttelettes [17, 18].

I.2.3 Formation des ions en phase gazeuse

Une série d'évaporations, suivies d'explosions coulombiennes, conduit à la formation de gouttelettes de plus en plus petites. Des ions isolés sont générés et guidés au travers de la contre-électrode par le champ électrique. Deux mécanismes tentent d'expliquer la formation d'ions en phase gazeuse : le modèle de l'évaporation ionique [19] et le modèle de la charge résiduelle [6] illustrés à la figure I.4. Bien qu'il y ait un très grand nombre de publications à ce sujet, le mécanisme de production d'ions en phase gazeuse est encore aujourd'hui sujet à polémique [11].

Image extraite de l'article de T.C. Rohner et al, Phys. Chem. Chem. Phys, 2004. ***6****(12): p. 3056-3068*

figure I.4 : Mécanismes de formation des ions en phase gazeuse par électrospray [2]

Dans le modèle de la charge résiduelle [6], la série d'évaporation-fission de la gouttelette continue jusqu'à ce que la gouttelette ne puisse plus compenser l'instabilité de Rayleigh et se dissocier. Si la solution initiale est suffisamment diluée, cela conduit à la production d'une ultime gouttelette ne contenant plus qu'une seule molécule. Si au cours de l'évaporation la molécule a pu retenir une partie de la charge, elle devient alors un ion en phase gazeuse.

Dans le modèle de l'évaporation ionique [19], avant que la gouttelette soit assez petite pour contenir seulement une seule molécule, le champ exercé à la surface de la gouttelette devient suffisamment intense pour surmonter les forces de solvatation et éjecter un ion de la surface de la gouttelette vers la phase gazeuse. Ce mécanisme est supposé avoir lieu quand les gouttelettes ont un rayon inférieur à 10 nm [20].

Il semblerait que ce soit le modèle de l'évaporation ionique qui soit plus en accord avec les observations expérimentales [1, 11]. En effet, pour les très petites gouttelettes de quelques nm de rayon, la théorie de Rayleigh n'est plus applicable [20] et les processus qui se produisent sont plutot du type évaporation ionique que du type charge résiduelle. Cependant, le modèle de la charge résiduelle semble mieux s'appliquer dans le cas de molécules d'intérêt biologique de masse supérieure à 6500 Da [21]. Par contre il semble très difficile de savoir par quel mécanisme sont formées les protéines multichargées [10, 22].

Le mécanisme de formation d'ions en phase gazeuse est donc un sujet très controversé d'autant plus que les études qui permettent d'étudier ce genre de mécanisme sont très difficiles à réaliser (mesure de la taille et de la charge de la gouttelette, du coefficient d'évaporation ionique).

I.2.4 Dispositif électrospray utilisé et optimisation des paramètres influençant le rendement d'ionisation de l'électrospray

De nombreux paramètres influencent le nombre d'ions formés par électrospray [23]. Parmi ces facteurs ont trouve, entre autre :

- la nature des molécules étudiées
- le choix du solvant
- le pH de la solution
- la concentration de la solution
- le débit du liquide formant le jet vaporisé
- la température et la pression du gaz séchant
- la position de l'aiguille par rapport à l'entrée du capillaire
- la valeur des tensions appliquées à l'aiguille, à la contre-électrode (« end-plate ») et au capillaire

Tous les travaux présentés dans cette thèse sont effectués sur des ions positifs. Les solutions couramment utilisées ont une concentration 1.10^{-4} ou 2.10^{-4} mol/L dans une solution méthanol : eau (1 :1) pour les peptides ou parfois dans un mélange acétonitrile : eau pour les molécules moins solubles dans l'eau (calixarene, adénine). Le solvant utilisé doit avoir une affinité protonique plus faible que l'analyte pour lui permettre de se protoner facilement et une constante diélectrique proche de celle de l'analyte pour pouvoir le solvater correctement [24]. On utilise des mélanges de solvant afin d'optimiser leurs caractéristiques (affinité protonique et constante diélectrique). A cette solution, sont ajoutés quelques µL d'acide acétique concentré à 1% en volume. L'ajout d'acide permet d'aider à la protonation des molécules en solution selon la réaction acido-basique suivante :

$$M + H_3O^+ \rightarrow M\text{-}H^+ + H_2O$$

On fait passer à travers le jet vaporisé un flux d'air chaud dont on contrôle la température et la pression : la température est choisie entre 200 et 250°C et la pression entre 10 à 60 psi (0,5 à 3 bar) afin d'optimiser l'intensité du signal d'ions.

L'aiguille (ø = 100 µm), par laquelle la solution est éjectée, est portée à la masse et la contre-électrode « end-plate » à une tension d'environ -2700 V. Une partie des gouttelettes

chargées passent à travers l'électrode « end plate », tandis qu'une autre partie se dépose à la surface de cette électrode. On peut ainsi mesurer le courant créé par les ions dont l'intensité est proportionnelle au nombre d'ions formés en phase gazeuse. Les ions isolés pénètrent ensuite dans un capillaire en verre (300 µm de diamètre intérieur / 20 cm de long), recouvert d'une couche métallique à chacune de ses extrémités. L'entrée du capillaire est portée à -4000 V. La sortie du capillaire est portée à – 60 V sous une pression de 1 Torr. Les ions sont entraînés au travers du capillaire par des forces visqueuses dues à la différence de pression entre les deux extrémités du capillaire.

A la sortie du capillaire, les ions sont sous forme d'une détente de gaz en jet libre, ce qui permet d'obtenir des molécules refroidies [24]. Un écorceur situé en aval du capillaire permet de sélectionner la partie centrale, partie la plus froide du jet. Dans certains électrosprays, la sortie du capillaire est désaxée par rapport à l'entrée de l'écorceur pour diminuer la quantité de molécules neutres injectées dans la source et améliorer le vide en aval.

I.3 Formation, accélération et sélection en masse des paquets d'ions

A la sortie de l'écorceur, les ions sont d'abord confinés pendant une milliseconde dans un hexapole puis mis sous forme de paquets d'ions et accélérés à 2,4 keV. Une mesure de temps de vol permet de contrôler et d'optimiser l'intensité et la composition de ces paquets d'ions. Grâce au tube de Gauss, les ions conservent une énergie cinétique de 2,5 keV par rapport au potentiel de masse. Ils sont ensuite sélectionnés en masse par le déflecteur électrostatique. Avant d'atteindre les deux zones d'interaction, le faisceau d'ions est défléchi d'un angle de 3° afin d'éliminer les espèces neutres parasites produites par collision avec le gaz résiduel.

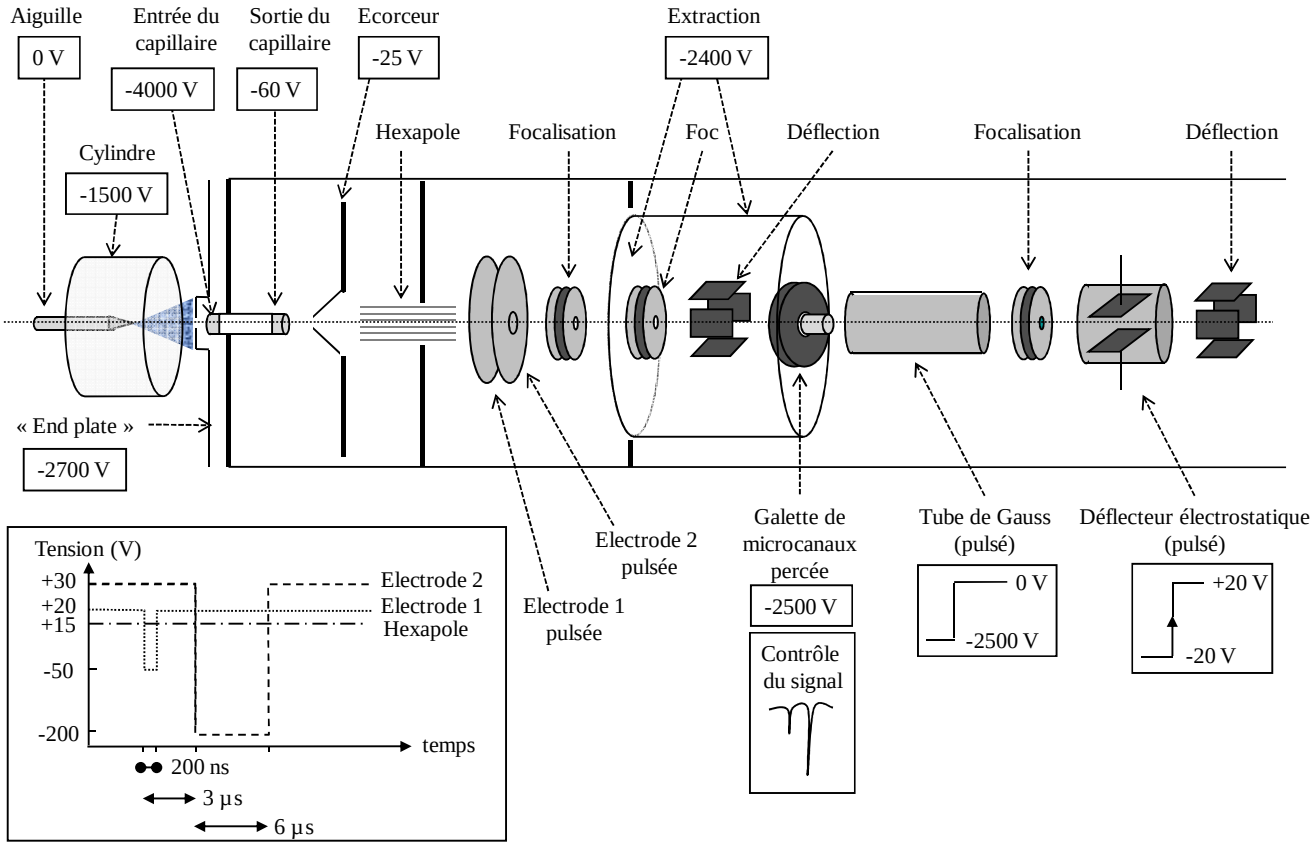


figure I.5 : Tensions et chronogramme de la source

I.3.1 Hexapole, zone de confinement avant extraction

L'écorceur (1 mm de diamètre d'ouverture) sépare le 1er du 2ème étage de pompage et permet de passer d'une pression de 1 à 10^{-3} Torr. Après l'écorceur se trouve un hexapole (diamètre intérieur 3 mm, 8 mm de long formé par 6 tiges de 1 mm de diamètre) qui fonctionne en mode RF (5 MHz, 400 V crête-à-crête). L'ensemble de l'hexapole est porté à une tension continue de +15 V qui détermine l'énergie cinétique des ions. Une tension de +20 V, appliquée à la 1ère électrode pulsée et située à la sortie de l'hexapole crée une barrière de potentiel répulsive permettant de stocker les ions dans l'hexapole avant de les extraire. L'ajustement de la tension continue de l'hexapole et de la tension de confinement permet de sélectionner la masse des ions extraits de la source et d'optimiser leur intensité.

Une séparation d'étages de pompage différentiel est effectuée au niveau de l'hexapole, entre le 2ème et le 3ème étage de pompage différentiel. L'entrée de l'hexapole est portée à une pression de 10^{-3} Torr et la sortie de l'hexapole à une pression de 10^{-5} Torr.

I.3.2 Formation de paquets d'ions

La source électrospray est une source continue. Le flux continu de molécules issues de l'électrospray est d'environ 10^6 ions par seconde [25]. Le recouvrement entre ce flux continu et des impulsions laser de 300 ns de largeur temporelle, est de 0,3 ions en moyenne par coup laser. Pour améliorer ce recouvrement on augmente la densité du faisceau d'ions en le comprimant temporellement sous forme de paquets. Ces paquets contiennent les ions émis en continu par l'électrospray pendant une durée de 1 ms, soit environ 1000 ions concentrés sur une largeur temporelle d'environ 200 ns (au niveau de la zone d'interaction) qui peuvent interagir avec chaque impulsion laser.

A la sortie de l'hexapole, la formation des paquets d'ions se fait par le jeu de deux électrodes pulsées produisant deux extractions successives. A chaque extraction, on abaisse le potentiel répulsif créé par les électrodes pulsées (cf chronogramme en encart de la figure I.5). L'ajustement des tensions appliquées sur les électrodes pulsées et leurs synchronisations temporelles permettent de contrôler finement la largeur temporelle des paquets d'ions[1] (cf figure I.6).

Il est a priori possible d'obtenir des ions solvatés à la sortie de l'hexapole. Dans notre dispositif, la pression est de 10^{-3} Torr au niveau de l'hexapole. Les nombreuses collisions, même à basse énergie, avec le gaz résiduel induisent une augmentation de l'énergie interne des ions et par la suite une désolvatation complète des molécules issues de l'électrospray.

A la suite de l'extraction, une lentille de type Einzel et un ensemble de déflecteurs verticaux permettent de refocaliser le faisceau.

---

[1] Remarque : par la suite, par abus de langage, nous continuerons à parler de « faisceau d'ions » plutôt que de « paquets d'ions » (sous-entendu « faisceau d'ions discontinu ») pour évoquer la trajectoire suivi par les paquets d'ions qui traversent le dispositif expérimental

I.3.3 Contrôle du signal d'ions

Après la production des paquets d'ions, le faisceau est accéléré à 2,4 kV. On contrôle le signal d'ions sur une galette de microcanaux, percée en son centre, après déviation des ions sur un des bords de la galette. Une mesure du temps de vol des ions, pour une distance de vol libre de 30 cm permet une estimation de la masse des ions, à Δm/z = +/- 5 u.m.a.

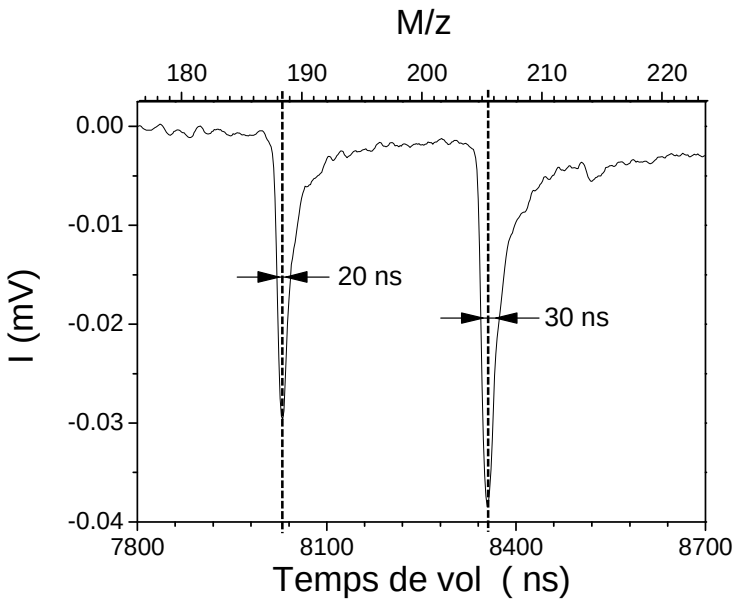


figure I.6 : Spectre de masse enregistré pour la molécule de Tryptophane-H^+ (m/z 205). Sur ce spectre on observe également le fragment m/z 188 du Tryptophane-H^+ (perte de NH_3)

I.3.4 Tube de Gauss et déflecteur électrostatique

Après passage à travers la galette de microcanaux, les ions ont une énergie cinétique de 2400 eV, leur potentiel étant référencé par rapport au blindage porté à une tension de -2400 V. On utilise un tube dit de Gauss qui permet de référencer leur potentiel par rapport à la masse tout en conservant leur énergie cinétique. Le tube de Gauss est un cylindre creux de 20 cm de long avec des ouvertures de 5 mm de diamètre à chaque extrémité. A l'intérieur du tube les ions sont dans une zone équipotentielle qui peut être modifiée sans affecter l'énergie cinétique des ions. Lorsque les ions pénètrent dans le tube, celui-ci est initialement porté à -2500 V. Cette tension est subitement mise à 0 V lorsque les ions sont dans le tube. Ainsi ils conservent une énergie cinétique de 2,5 keV référencée par rapport au potentiel de masse, en sortie du tube de Gauss.

Le faisceau d'ions est ensuite sélectionné en masse à l'aide d'un déflecteur électrostatique constitué de deux plaques parallèles auxquelles on applique une rampe de tension qui passe de -20 à +20 V en 20 ns. On synchronise le passage à 0 V de la rampe de tension sur le passage, à travers le déflecteur, des ions que l'on veut sélectionner. Ce déflecteur électrostatique nous permet d'atteindre une sélection en masse de $\Delta m/m \approx 1/200$.

Avant les zones d'interaction entre les ions et le laser, une série de 3 déflecteurs horizontaux et verticaux dévie le faisceau d'ions d'un angle de 3° par rapport à l'axe du faisceau d'ions issus de la source. Cet angle permet de s'affranchir des fragments neutres formés par collision entre les ions étudiés et le gaz résiduel. Tous les fragments neutres formés par collision depuis la source, arrivant sur le détecteur de neutres, rendraient les expériences en coïncidence difficilement exploitables.

I.4 Laser

Le laser utilisé pour la photodissociation UV est un laser nanoseconde « JADE » commercialisé par la société Thalès Laser. C'est un laser de type Nd :YLF, pompé par diodes, pulsé au kHz, doublé intra-cavité. Il permet d'obtenir des impulsions d'environ 300 ns à une longueur d'onde de 527 nm avec une puissance moyenne pouvant aller jusqu'à 19 W. Nous nous limitons à une puissance de 14 W, suffisante pour effectuer la plupart des expériences présentées dans cette thèse.

Le faisceau vert à 527 nm est focalisé dans un cristal doubleur LBO générant un rayonnement UV à 263 nm. En sortie du cristal, un miroir dichroïque réfléchit l'UV vers la zone d'interaction polarisée ou vers le piège électrostatique et laisse passer le faisceau vert résiduel.

Lorsque le laser est déclenché par un signal externe, on observe, entre le signal externe et l'impulsion laser, une fluctuation temporelle supérieure à la durée du paquet d'ions. Le laser ne peut donc pas être déclenché par un signal externe. Les impulsions laser sont donc utilisées comme horloge externe pour déclencher l'ensemble du dispositif expérimental. Une photodiode, située derrière un miroir de renvoi, capte les fuites du faisceau vert à travers ce miroir et génère un signal utilisé comme horloge de l'ensemble de l'expérience (signal de déclenchement).

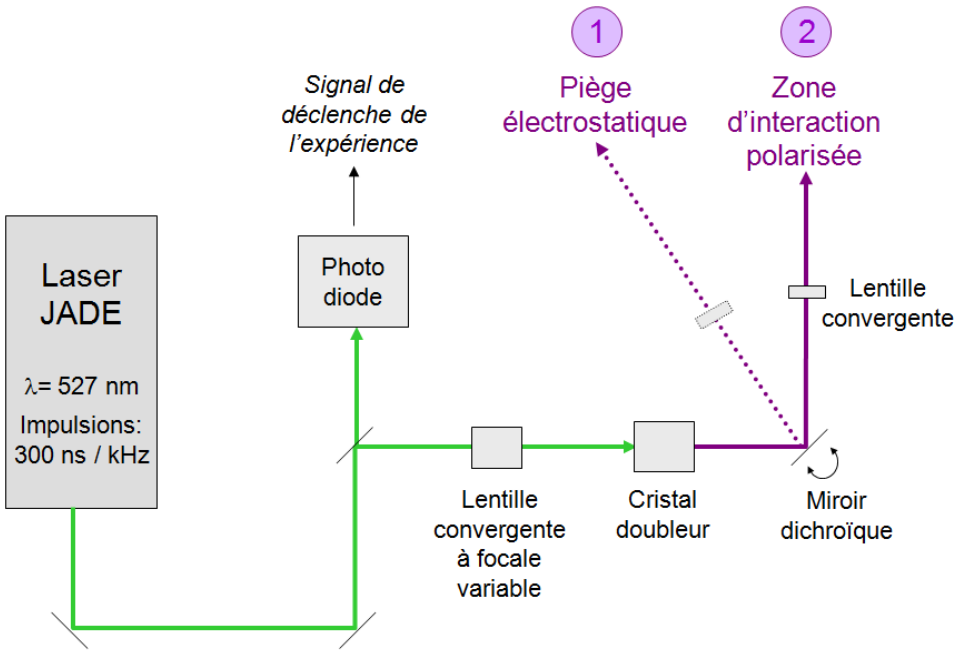


figure I.7 : Laser et dispositif optique

Le laser UV est focalisé sur le faisceau d'ions, en une tache de 1 mm de diamètre. Suivant le type d'expérience que l'on veut effectuer, le laser est soit focalisé au centre du piège électrostatique, soit focalisé à l'entrée de la zone d'interaction polarisée.

I.5 Piège ionique électrostatique

Le piège électrostatique est similaire à une cavité optique et permet de stocker efficacement des ions de quelques keV d'énergie sans limitation sur la gamme de masses piégées [26]. Il a pour rôle de préciser la masse de l'ion piégé et de mesurer son temps de vie après photoexcitation.

Après avoir décrit le piège, nous expliquons son fonctionnement, en particulier le phénomène dit de synchronisation des ions durant le piégeage, puis nous montrons comment il est utilisé pour mesurer le temps de vie d'ions métastables sur des échelles de temps allant de la dizaine de microseconde jusqu'à la milliseconde.

I.5.1 Description du piège

Le piège à ions électrostatique linéaire, représenté à la figure I.8, a été construit au *Weizmann Institute of Science*, en Israël. C'est une réplique de celui développé par Zajfman *et al* [26]. Il a une longueur totale de 407 mm et est constitué de deux miroirs électrostatiques identiques [26, 27] avec une zone centrale sans champ de 226 mm. Il permet de piéger des paquets d'ions dans la direction longitudinale. Les deux miroirs sont composés de 2 jeux de 8 électrodes dont l'une des 8 électrodes (V_z) fait office de lentille focalisatrice. Ces électrodes sont portées à différentes tensions positives dont les valeurs, pour des ions d'énergie 2500 eV, sont indiquées sur la figure I.8.

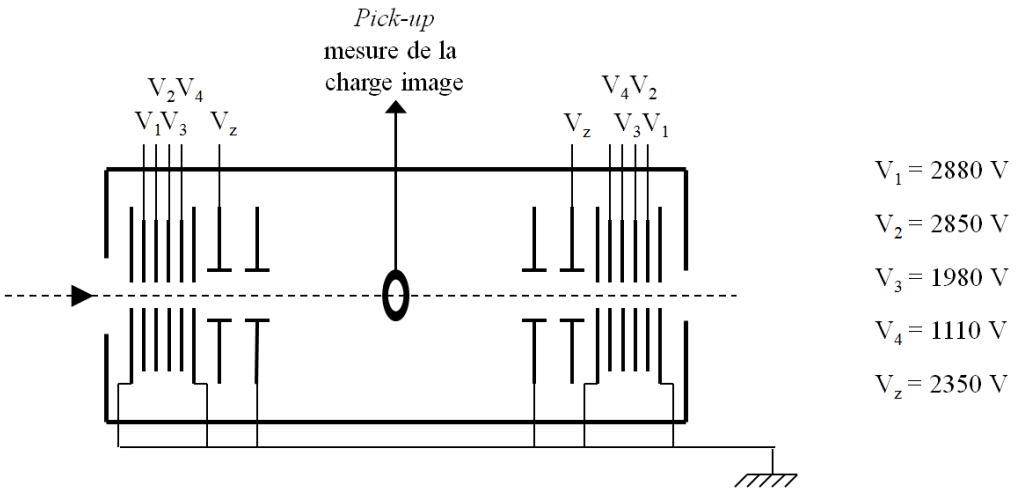


figure I.8 : Piège électrostatique

Pour injecter des ions dans le piège, on abaisse les tensions des électrodes d'entrée ce qui permet à un paquet d'ions de pénétrer dans le piège. On maintient les tensions sur les électrodes de sortie afin que le paquet d'ions soit réfléchi dans la direction de la source. On commute ensuite rapidement les tensions des électrodes d'entrée, dans un laps de temps plus rapide que la demi-période d'oscillation des ions dans le piège.

Une électrode cylindrique, nommée *pick-up*, située au centre de la zone sans champ, mesure la charge induite par les paquets d'ions lorsqu'ils la traversent. Ce dispositif permet de contrôler la période d'oscillation des paquets d'ions et leur intensité.

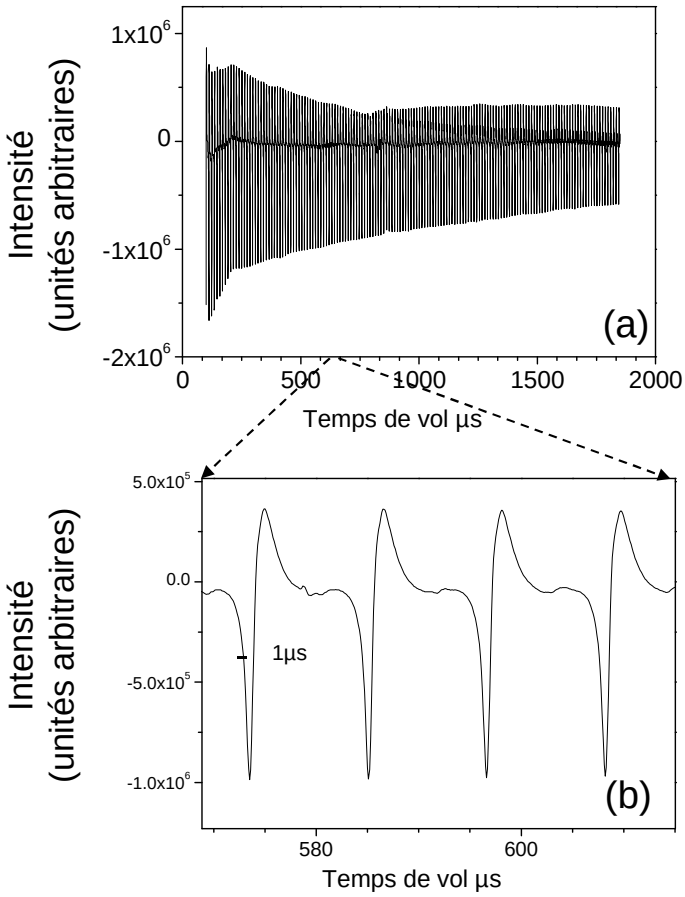


figure I.9 : Spectre de temps vol des ions dans le piège électrostatique qui correspond à un enregistrement de la charge induite au niveau de l'électrode centrale. Ce spectre a été enregistré pour la molécule de Tryptophane-Leucine-H^+ (m/z 318) caractérisée par une période d'oscillation T_0 = 20.08 µs

La figure I.9.b. montre un exemple du signal amplifié enregistré lors du passage d'un paquet d'ions, de 1 µs de largeur temporelle, à travers l'électrode *pick-up*. On distingue deux pics correspondant à la charge induite par le paquet d'ions traversant l'anneau : les parties négatives et positives du pic correspondent respectivement aux charges induites lors de l'entrée et de la sortie du paquet d'ions à travers l'électrode. La surface de ces deux pics est identique et proportionnelle au nombre d'ions présents dans le paquet. La figure I.9.a. montre un spectre de temps de vol en fonction du temps de piégeage des ions. On distingue une forte diminution de l'intensité des pics aux temps courts. Il s'agit d'un processus « d'épluchage » du faisceau. Les ions qui ont une trop grande dispersion en énergie et/ou qui ont une ouverture angulaire importante sortent de la zone de piégeage stable et sont éliminés après quelques oscillations dans le piège, d'où la diminution d'intensité observée. Après un temps de piègeage (supérieur à 100 µs) le signal est constant,

indiquant que le paquet d'ions est correctement synchronisé. Le phénomène de synchronisation est décrit plus en détail dans le paragraphe suivant.

La transformée de Fourier du signal de la figure I.9.a. fournit un spectre de fréquence qui nous permet d'identifier les masses des ions confinés. La période d'oscillation est proportionnelle à $\sqrt{m_0/z}$, où m_0 est la masse et z la charge des ions piégés. Cette relation est démontrée dans le paragraphe qui suit.

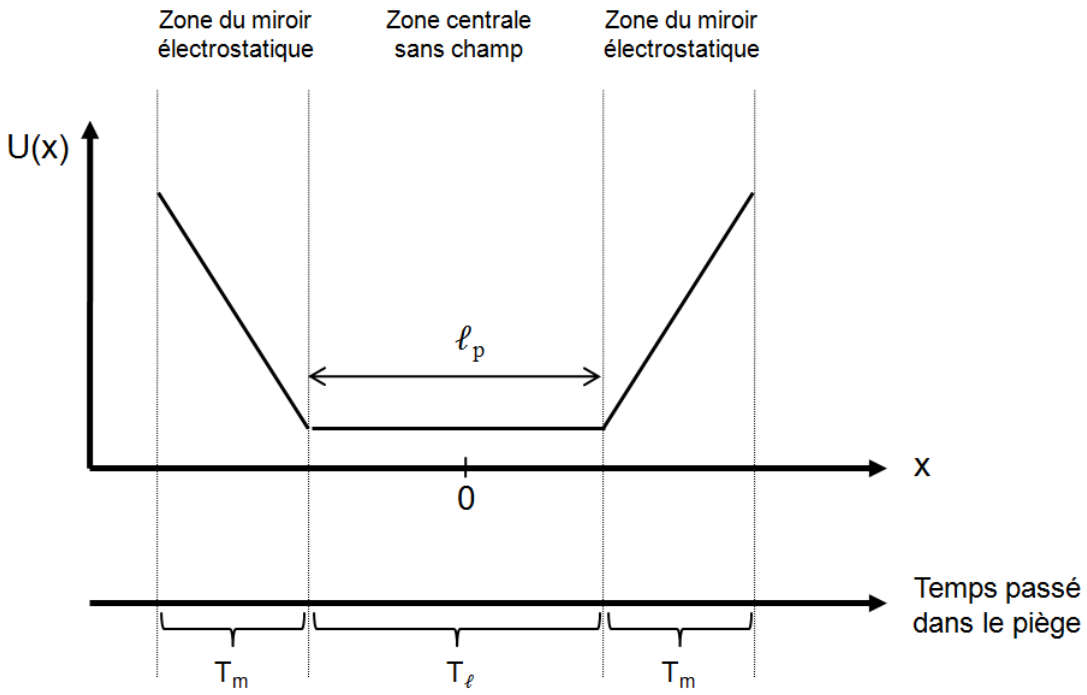


figure I.10 : Représentation schématique du potentiel du piège et du temps passé dans le piège

Le piège peut être modélisé par une barrière de potentiel comme celle schématisée sur la figure I.10, telle que :

$$U(x) = \begin{cases} 0 & pour\ |x| \leq \ell_p/2 \\ Fx\ + constante & pour\ |x| > \ell_p/2 \end{cases} \qquad \text{(I.1)}$$

où ℓ_p = 226 mm est la longueur de la zone de vol libre centrale et $F = \frac{dU}{dx}$ le gradient de potentiel présent dans les miroirs, produit par la polarisation des électrodes. La période d'oscillation d'un ion correspond au temps qu'il met pour faire un aller-retour dans la partie sans champ du piège (2 T_L) et un aller-retour au niveau de chacun des miroirs (4 T_m), les temps T_ℓ et T_m étant définis sur la figure I.10. Les ions de masse m_0 se déplacent avec une vitesse constante v_0 dans la partie centrale du piège. Dans les miroirs, ils sont décélérés, font demi-tour puis sont réaccélérés. Leur vitesse dans cette zone, notée v_m, est de la forme :

$$v_m = -\frac{F}{m_0}t + v_0 \qquad \text{(I.2)}$$

On calcule le temps T_m passé dans les miroirs à partir de l'équation (I.2), sachant que la vitesse v_m s'annule au niveau du point de rebroussement. La période totale d'oscillation T_0 s'écrit donc :

$$T_0 = 2T_\ell + 4T_m = 2\frac{L}{v_0} + 4\frac{v_0 m_0}{F} = \sqrt{\frac{2m_0}{z}}\left(\frac{\ell_p}{\sqrt{E_0}} + \frac{4\sqrt{E_0}}{F}\right) \qquad \text{(I.3)}$$

avec E_0, l'énergie des ions piégés, donnée par $E_0 = \frac{1}{2}m_0 v_0^2$.

L'équation (I.3) nous donne la relation de proportionnalité qui relie T_0 à $\sqrt{m_0/z}$

I.5.2 Synchronisation

Habituellement, dans un piège ionique, les ions oscillants remplissent tout le volume accessible [28]. Le piège électrostatique utilisé a la particularité, sous certaines conditions de réglage des miroirs, de réduire la largeur temporelle des paquets d'ions injectés tout en conservant leur intensité et ce, pendant des temps supérieurs à la seconde [29]. C'est ce qu'on appelle la synchronisation.

A partir de leurs observations expérimentales, modélisées avec le logiciel SIMION, Pedersen et al. [30, 31] ont expliqué ce phénomène de synchronisation en établissant deux principaux critères empiriques, qui ont ensuite été vérifiés de façon théorique par Greyer et Tannor [32].

Le 1er critère est un critère cinématique (effet réflectron) [30]. Les ions les plus rapides qui sont aussi les plus énergétiques, remontent plus haut dans la barrière de potentiel et passent plus de temps dans les miroirs que les ions plus lents. Les ions les plus énergétiques ont donc une période d'oscillation plus longue exprimée par la relation suivante, établie à partir de l'équation (I.3) :

$$\frac{\partial T_0}{\partial E_0} > 0 \qquad \text{(I.4)}$$

On en déduit une condition de réglage de la barrière de potentiel telle que :

$$F < \frac{4E_0}{\ell_p} \qquad \text{(I.5)}$$

Un 2ème critère intervient pour expliquer les conditions de synchronisation observées expérimentalement [30]. Il s'agit d'un critère dynamique : l'interaction coulombienne entre les ions d'énergies différentes produit une dispersion opposée à celle créée par l'effet réflectron. La répulsion mutuelle des ions au niveau de la zone de rebroussement (charge d'espace) conduit à une augmentation de la période d'oscillation des ions les moins énergétiques, exprimée par la relation :

$$\frac{\partial T}{\partial E_0} < 0 \qquad \text{(I.6)}$$

La densité des paquets d'ions doit être suffisante pour permettre des collisions entre les ions au niveau des miroirs mais pas excessive pour éviter une charge d'espace trop importante [30]. Une densité et une focalisation non-appropriée du paquet d'ions dans le miroir conduit à une désynchronisation (dégroupage) du paquet d'ions au cours du temps.

Il faut donc tenir compte des critères cinématiques et dynamiques évoqués ci-dessus pour synchroniser les ions dans le piège. Pour chaque expérience effectuée avec le piège, les tensions de chaque électrode des miroirs sont ajustées à l'aide du signal enregistré par le *pick-up* afin d'être dans les meilleures conditions de piégeage. Le temps de piégeage des paquets d'ions est limité par le nombre de collisions entre les ions et les atomes du gaz résiduel [33]. L'enceinte du piège électrostatique est pompée en ultra-vide à 10^{-9} Torr, avec une pompe cryogénique, pour minimiser ces collisions. Suivant la pression de cette enceinte, la section efficace de collision et la métastabilité du système étudié, les ions peuvent être confinés pendant des temps allant de la milliseconde à la seconde.

I.5.3 Piégeage des ions fragments

Le piège synchronise des ions pour une énergie donnée. Pourtant, des ions peuvent quand même rester piéger pendant un certain temps même bien qu'ils n'aient pas l'énergie qui leur permette d'être parfaitement synchronisés. C'est le cas des photofragments ioniques formés dans nos expériences. L'identification de ces fragments à longue durée de vie nous apporte d'importantes informations sur les mécanismes de désexcitation. Notons cependant que plus la différence de masse Δm entre les ions parents et fragments augmente ($\Delta m = m_0 - m_i$), plus les ions fragments produits sont rapidement désynchronisés et éjectés de la zone de piégeage stable. Seuls des ions fragments qui ont une masse proche de celle des ions parents peuvent rester piégés suffisamment longtemps pour pouvoir être détectés. Dans ce paragraphe, nous allons voir

comment la masse d'un fragment ionique piégé est déduite à partir de la mesure de sa période d'oscillation.

Dans notre dispositif, les ions sont synchronisés pour une énergie de 2500 eV (= E_0). On définit l'énergie cinétique libérée lors de la fragmentation (KER) par l'expression suivante :

$$KER = \frac{1}{2} m_i v_i^2 + \frac{1}{2} m_n v_n^2 \qquad \text{(I.7)}$$

où v_i et v_n sont les vitesses des fragments ioniques et neutres, exprimées dans le référentiel moléculaire. La valeur du KER est d'environ 100 mV pour la majorité des canaux de fragmentation étudiés. A partir de la conservation de l'impulsion dans le centre de masse de la molécule (équation (I.8)), on exprime la vitesse v_i en fonction du KER :

$$m_i v_i = m_n v_n \qquad \text{(I.8)}$$

$$v_i = \sqrt{\frac{2\, KER\, m_n}{m_0\, m_i}} \qquad \text{(I.9)}$$

La vitesse $\vec{V_i}$ de l'ion fragment dans le référentiel du laboratoire est définie par $\vec{V_0}$, la vitesse de l'ion incident dans le référentiel du laboratoire, et $\vec{v_i}$, la vitesse du fragment ionique dans le référentiel moléculaire :

$$\vec{V_i} = \vec{V_0} + \vec{v_i} \qquad \text{(I.10)}$$

La vitesse $\vec{v_i}$, liée au phénomène de fragmentation, entraîne une déviation par rapport au centre du faisceau incident, de la trajectoire du fragment ionique. L'équation (I.9) montre que cette déviation est d'autant plus importante que la différence de masse Δm entre les ions parents et fragments est grande. On exprime la période d'oscillation T_i des ions fragments de la même façon que celle T_0 des ions parents dans l'équation (I.3) :

$$T_i = 2\frac{\ell_p}{V_i} + 4\frac{V_i m_i}{F} \qquad \text{(I.11)}$$

avec

$$V_i = \sqrt{\left(\vec{V_0} + \vec{v_i}\right)^2} = \sqrt{\vec{V_0}^2 + \vec{v_i}^2 + 2\vec{V_0}\vec{v_i}} \approx \sqrt{\vec{V_0}\left(\vec{V_0} + 2\vec{v_i}\right)} \qquad \text{(I.12)}$$

Dans l'expression de V_i, le terme en v_i^2 lié au KER (KER = 100 mV) est négligeable devant les deux autres qui dépendent de V_0 (V_0 = 2,5 kV).

Il n'est pas possible de déduire de façon analytique la masse m_i à partir de la période d'oscillation T_i si on ne connaît pas le terme $F = \frac{dU}{dx}$, gradient de potentiel au niveau des miroirs. Dans une première approximation, on utilise l'équation (I.11) en négligeant l'effet du KER, c'est-

à-dire le terme en $\overrightarrow{V_0}\vec{v}_i$ dans l'expression de V_i. On considère alors que les ions fragments ont la même vitesse V_0 que les ions parents mais une énergie E_i différente de E_0 donnée par $E_i = E_0 * m_i/m_0$. Dans cette approximation, la période d'oscillation T_i des ions fragments est de la forme :

$$(I.13) \qquad T_i = 2\frac{\ell_p}{V_0} + 4\frac{V_0 m_i}{F} \qquad \text{avec} \quad V_0 = \sqrt{\frac{2E_0}{m_0}}$$

A partir des expressions de T_0 et T_i données dans les équations (I.3) et (I.13), on exprime le décalage $\Delta T = (T_0 - T_i)$ entre ces périodes d'oscillation en fonction de différence de masse $\Delta m = (m_0 - m_i)$:

$$(I.14) \qquad \Delta T = \frac{4v_0}{F}\Delta m = \left(T_0 - 2\frac{\ell_p}{V_0}\right)\frac{\Delta m}{m_0}$$

Les résultats expérimentaux nous donnent accès aux valeurs de T_i et T_0. On calcule alors m_i à l'aide de l'expression ci-dessus. Cependant lorsque la différence de masse Δm augmente, le KER n'est plus négligeable, on doit tenir compte du terme en $V_0 v_i$ dans l'expression (I.13) et l'équation (I.14) n'est plus valable. Ne pouvant établir d'expression littérale plus précise pour calculer m_i en fonction de T_i, nous avons utilisé le logiciel SIMION pour simuler la trajectoire des ions dans le piège. Les périodes d'oscillation données par le logiciel ont été exprimées à l'ordre 2, en fonction de la masse m_i, pour une masse m_0 fixée :

$$(I.15) \qquad T_{m0}(m_i) = a_{m0} + b_{m0}*(m_i) + c_{m0}*(m_i)^2$$

avec a_{m0}, b_{m0} et c_{m0} paramètres déterminés par la simulation.

Les résultats obtenus avec l'approximation analytique et le programme de simulation SIMION sont comparés sur un exemple précis dans le paragraphe suivant.

I.5.4 Résultats expérimentaux obtenus avec le piège électrostatique

Le piège électrostatique permet de mesurer des temps de vie supérieurs à la dizaine de microsecondes. Dans ce paragraphe, nous montrons comment ces temps sont mesurés pour des ions incidents métastables mais aussi pour certains ions fragments dont on détermine également la masse.

I.5.4.1 Mesure du temps de vie d'un ion parent

Dans les expériences effectuées avec le piège électrostatique, on commence par stocker les ions parents pendant plusieurs centaines de microsecondes avant de les photoexciter. Ce temps de stockage permet d'éliminer les particules qui ont des trajectoires divergentes et laisse au paquet d'ions incidents le temps de se synchroniser. On détecte les espèces neutres émises dans la direction du détecteur de neutres, après chaque oscillation des ions dans le piège. Il s'agit des photofragments neutres et de fragments neutres produits par collisions entre les ions parents et le gaz résiduel. On enregistre leur temps d'arrivée t_n (cf figure I.11). A chaque période d'oscillation, les neutres ont la même vitesse que les ions parents, donc tous les fragments neutres ont le même temps d'arrivée. On observe ainsi une superposition des signaux résultant de la photofragmentation et des collisions, respectivement représentés en rouge et en bleu sur la figure I.11.

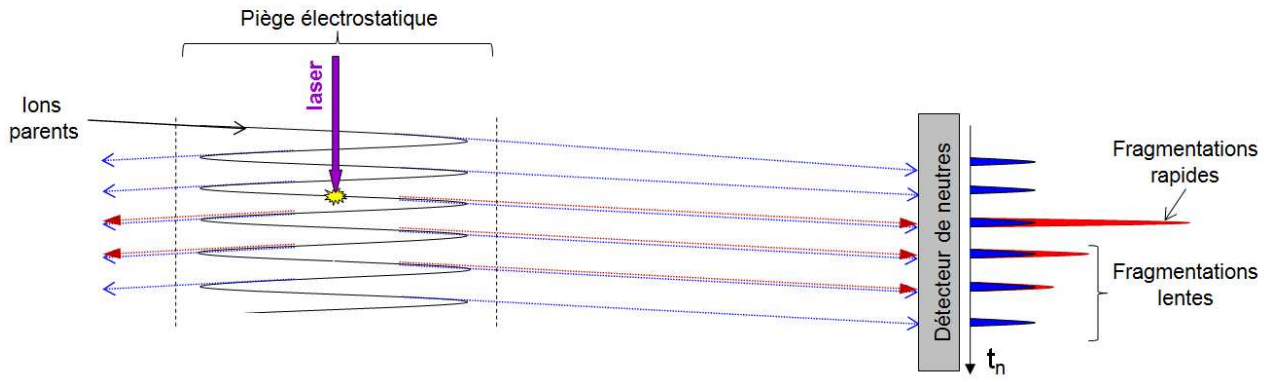


figure I.11 : Principe des expériences avec le piège électrostatique ; signal rouge : photofragments neutres ; signal bleu : fragments neutres formés par collisions.

Remarque : les ions oscillent uniquement suivant la direction longitudinale et non la direction transversale du piège. Cette figure ainsi que la figure I.13 représente l'évolution temporelle des ions dans le piège, menant à la construction progressive d'un spectre de temps de vol à partir des fragments neutres émis.

La figure I.12 montre deux spectres de temps de vol des neutres enregistrés pour le complexe moléculaire Tryptamine-(CE) protoné (*m/z* 425). Le spectre bleu enregistré sans laser (figure I.12.a.) correspond à des fragments neutres produits uniquement par collisions avec le gaz résiduel. Sur le spectre rouge (figure I.12.b.), enregistré avec laser, on identifie parfaitement à partir de $t_n \approx 800$ µs la contribution due à la fragmentation laser qui se superpose à la fragmentation induite par collision. Les fragments neutres qui ont un temps d'arrivée inférieur à

800 µs sont uniquement induits par collisions. On normalise ces deux spectres sur la partie du signal enregistré avant interaction laser. La soustraction des spectres normalisés, permet d'éliminer du spectre enregistré avec laser, la composante due au signal des neutres induits par collisions. On obtient ainsi le spectre le temps de vol des photofragments neutres (figure I.12.c.). L'intégrale de ce spectre (figure I.12.d) présente un premier point de forte intensité correspondant à des fragmentations rapides de constantes de temps $\tau < 4$ µs. Les autres points donnés par l'intégrale du spectre de temps de vol des photofragments neutres correspondent à des fragmentations plus lentes, de constante de temps $\tau > 5$ µs. Ces points forment une courbe lentement décroissante. Ce deuxième comportement peut être modélisé par une exponentielle décroissante $Ae^{-t/\tau}$ dont on déduit le temps τ de métastabilité de l'espèce photoexcitée.

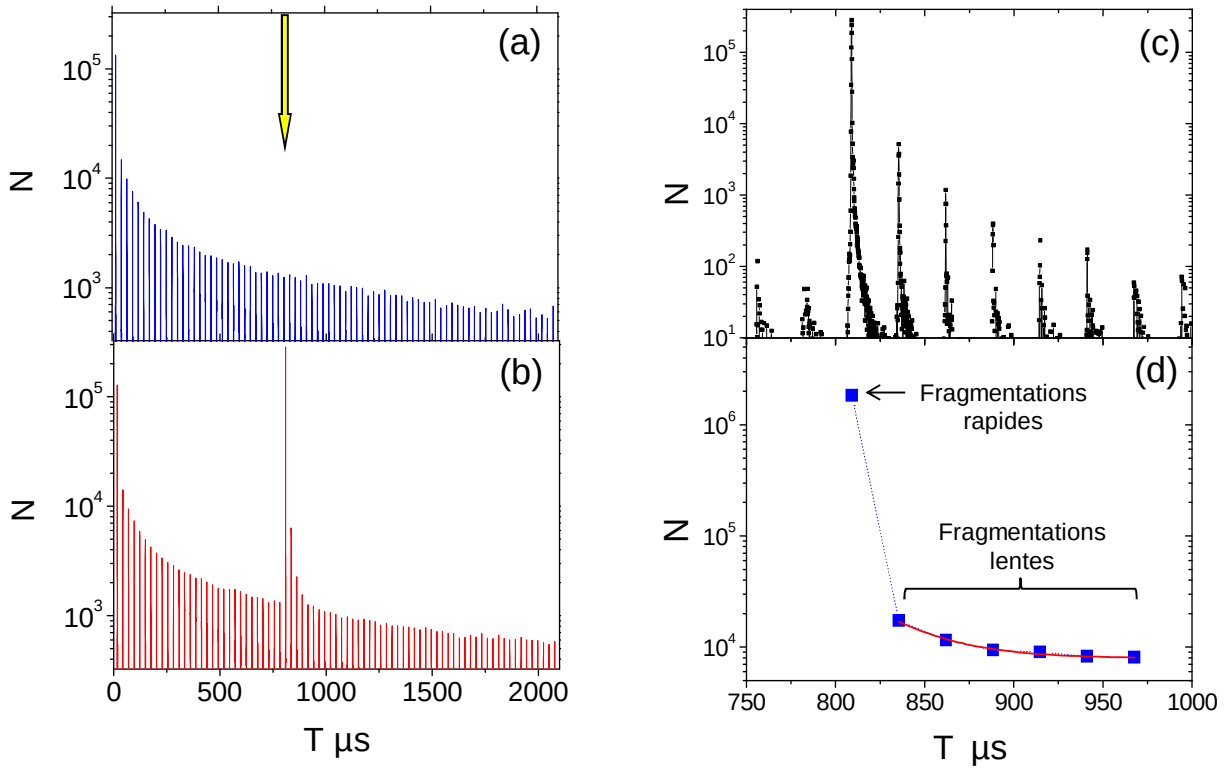


figure I.12 : Spectre de temps de vol des fragments neutres enregistré pour le complexe moléculaire Tryptamine-(CE) protonée (m/z 425) : (a) sans laser, (b) avec laser. Le spectre (c) correspond à la soustraction des spectres (a) et (b). Les points du graphique (d) ont été calculés en effectuant l'intégrale des pics du spectre (c) de soustraction.obtenus après soustraction. Les points du graphique (d) sont modélisés par une courbe de type $Ae^{-t/\tau}$, avec τ = 27 +/- 2 µs

I.5.4.2 Détermination de la masse et mesure du temps de vie d'un fragment ionique piégé

Ainsi que nous l'avons montré dans le § I.5.3, seuls les fragments ioniques dont la masse est proche de celle des ions parents peuvent être efficacement piégés avec les ions parents. Lorsqu'un fragment ionique est piégé, les espèces neutres détectées proviennent non seulement de la neutralisation de cet ion sur le gaz résiduel du piège mais aussi de la métastabilité propre de ce fragment ionique.

Si un fragment ionique est piégé, on observe à chaque oscillation, en plus du pic principal de neutres induit par les ions parents, un autre pic de faible intensité sur le spectre de temps de vol des neutres. Ce pic secondaire se décale progressivement du pic principal après chaque oscillation (cf figure I.13).

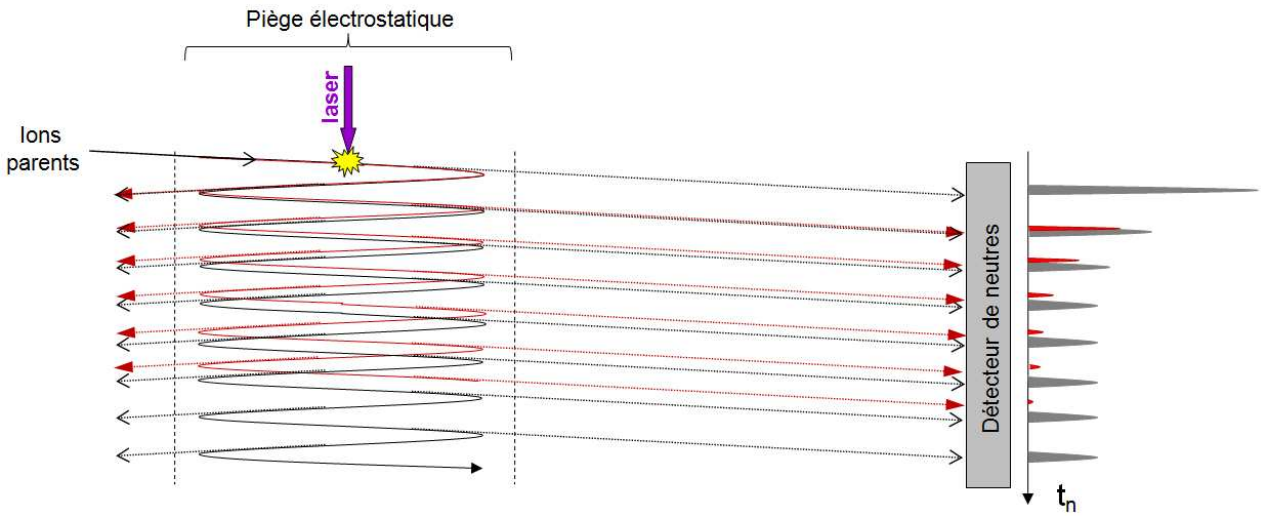


figure I.13 : Représentation schématique de l'évolution temporelle d'un photofragment ionique dans le piège (trajectoire rouge) dont la période d'oscillation est plus courte que celle de l'ion parent (trajectoire grise) initialement piégé.

Au § I.5.3 (page 41), nous avons montré la relation suivante, donnée pour une approximation du 1er ordre :

$$T_i - T_0 = \frac{4V_0}{F}(m_i - m_0) \qquad \text{avec} \qquad F = 4\frac{V_0 m_0}{T_0 - 2\frac{\ell_p}{V_0}} \tag{I.16}$$

où V_0 est la vitesse de la molécule incidente m_0 dans le référentiel du laboratoire ($V_0 = \sqrt{\frac{2E_0}{m_0}}$ et E_0 = 2.5 keV), F est le gradient de potentiel présent au niveau des miroirs électrostatiques et ℓ_p est la longueur de la zone de vol libre du piège (= 226 mm).

D'après l'équation (I.16), la période d'oscillation T_i des ions fragments est inférieure à celle T_0 des ions parents, d'où le décalage progressif observé sur le spectre de temps de vol entre le pic principal issu des ions parents (signal gris de la figure I.13) et le pic secondaire issu des ions fragments (signal rouge de la figure I.13)

Expérimentalement, on détermine T_0 avec précision en traçant le temps t_n du pic principal en fonction du nombre de périodes d'oscillation. La valeur de T_i est obtenue à partir du décalage temporel entre le pic principal et celui associé aux ions fragments. Ce décalage temporel est un multiple du nombre de périodes d'oscillations effectuées après l'interaction laser. En traçant ce décalage temporel en fonction du nombre de période d'oscillations après l'interaction laser, on détermine expérimentalement $\Delta T = (T_0 - T_i)$

On connaît la masse m_0 des ions incidents. La mesure expérimentale de T_0 et de $\Delta T = (T_0 - T_i)$ permet de déduire $\Delta m = (m_0 - m_i)$ à partir de la relation (I.16) :

$$\Delta m = \frac{\Delta T \times m_0}{T_0 - \ell_p \sqrt{\frac{2m_0}{E_0}}} \qquad \text{(I.17)}$$

D'après l'équation (I.17), la différence de masse $\Delta m = (m_0 - m_i)$ augmente linéairement avec la différence de période d'oscillation $\Delta T = (T_0 - T_i)$. Nous allons voir à partir des deux exemples de la figure I.14 dans quelle limite est applicable cette approximation d'ordre 1.

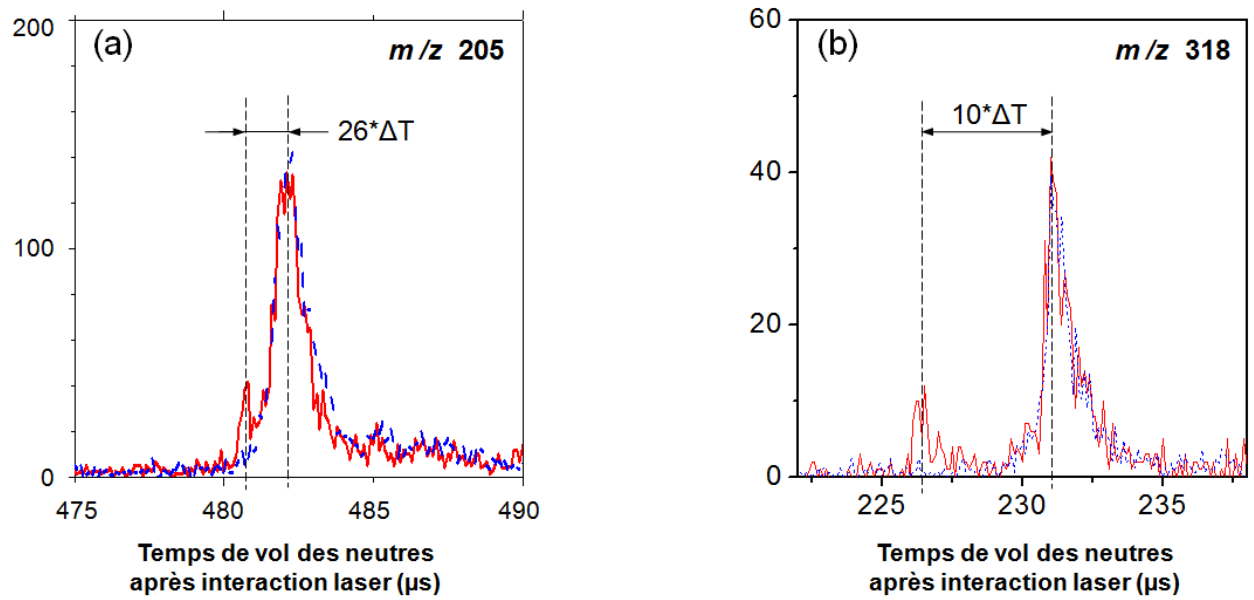


figure I.14 : exemples d'ions fragments piégés. Trait plein rouge : enregistrement avec laser. Pointillé bleu : enregistrement sans laser. a) molécule deTrp-H$^+$ (m/z 205), 26ème période

d'oscillation après interaction laser. b) molécule de Trp-Leu-H+ (m/z 318), 10ème période d'oscillation après interaction laser.

Le spectre de la figure I.14.a. montre le temps de vol des fragments neutres, enregistré avec et sans laser pour la molécule incidente *m/z* 205 (Tryptophane protoné). Le signal induit par le laser (signal rouge) indique la présence d'un fragment ionique métastable, piégé avec l'ion parent. On mesure une période d'oscillation T_0 = 18.539 µs pour les ions parents et un décalage de période ΔT = 52 ns entre les ions parents et fragments piégés, soit une période d'oscillation T_i = 18.487 µs pour les ions fragments. A partir de ces données, on calcule la différence de masse Δm à l'aide de l'équation (I.17). On en déduit Δm = 1.16 uma (calculé avec m_0 = 205 uma ; ΔT = 52 ns ; T_0 = 18.539 µs ; ℓ_p = 226 mm ; E_0 = 2.5 keV). Le fragment ionique piégé est donc issu de la perte d'un atome d'hydrogène. Il s'agit de l'ion m/z = 204.

De même, la figure I.14.b. indique la présence d'un fragment ionique piégé avec l'ion parent *m/z* 318 (Tryptophane-Leucine protonée). L'approximation d'ordre 1 donne Δm = 12.6 uma (avec ΔT = 455 ns, T_0 = 23.105 µs et T_i = 22.650 µs).

La masse Δm calculée correspond au fragment neutre complémentaire du fragment ionique piégé. Cependant, la masse Δm calculée ci-dessus ne correspond à aucune molécule neutre physiquement acceptable. C'est pourquoi nous avons utilisé le programme de simulation SIMION pour simuler la trajectoire des ions dans le piège électrostatique et obtenir une expression plus précise de T_i en fonction de m_i (cf expression (I.15)). Le graphique de la figure I.15 compare les résultats obtenus avec SIMION et ceux donnés par le calcul analytique.

La modélisation obtenue avec le logiciel SIMION donne une différence de masse Δm = 20 uma pour un ΔT de 455 ns. Les masses les plus proches pouvant correspondre à la molécule neutre éjectée sont Δm = 17 ou 18 uma ce qui correspond à un fragment ionique *m/z* 300 ou 301 piégé, issu de la perte de NH_3, H_2O ou de $H+NH_3$. Pour obtenir plus d'informations sur la masse du fragment ionique piégé, on peut utiliser l'analyseur électrostatique (cf I.6.2).

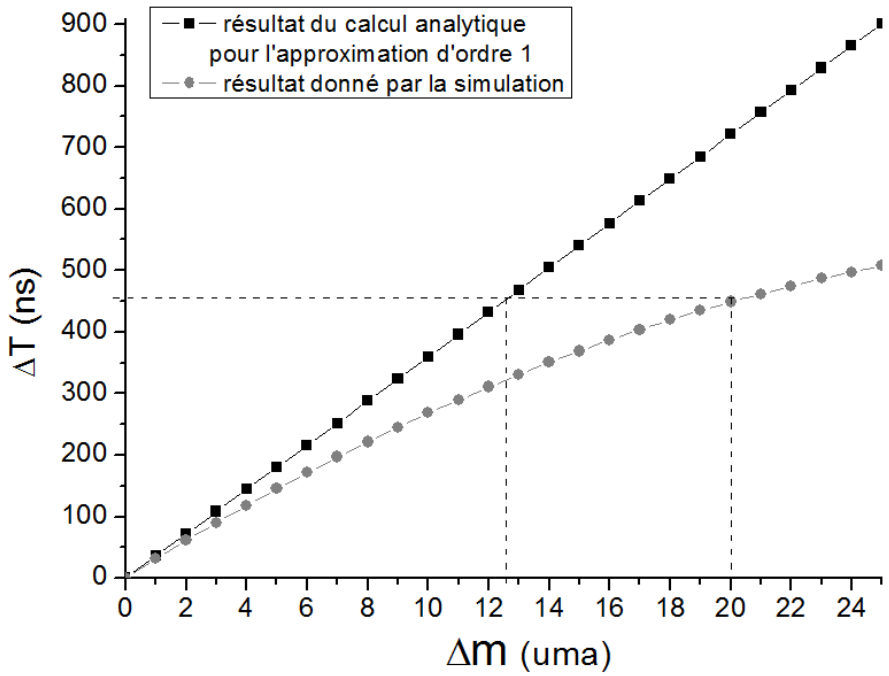


figure I.15 : Comparaison de la valeur de ΔT obtenue en fonction de Δm, en utilisant l'expression analytique et la simulation SIMION pour une molécule incidente de masse m_0 = 318 uma. Pour ces deux méthodes, la valeur de Δm correspondant à ΔT = 455 ns est indiquée par des trait pointillés.

Le temps de métastabilité d'un fragment ionique piégé est mesuré de la même façon que pour les ions incidents. Après normalisation et soustraction des signaux de temps de vol des neutres enregistrés avec et sans laser, on effectue l'intégrale de chaque composante du spectre obtenu. La modélisation par une exponentielle décroissante de tous les points obtenus donne un ordre de grandeur du temps de vie de l'ion fragment métastable. Quand la différence de masse Δm entre l'ion parent et le fragment ionique piégé augmente, les ions fragments sont moins bien piégés et moins bien synchronisés. La valeur du temps de métastabilité mesuré en est fait inférieure à sa valeur réelle.

Le piège électrostatique permet de mesurer des constantes de temps supérieures à 10 µs. C'est un outil complémentaire à la zone polarisée (présentée dans le paragraphe suivant) avec laquelle on mesure des constantes de temps plus petites (τ < 500 ns). Le piège électrostatique présente cependant certaines limitations. En effet, la masse des fragments produits est difficile à déterminer, de plus l'étude du temps de vie des ions fragments métastables est limitée à ceux dont la masse est proche de celle du parent.

I.6 Expériences en coïncidence

Les expériences en coïncidence se font dans la zone d'interaction polarisée (cf figure I.1). Cette zone polarisée nous permet d'étudier la dynamique de fragmentation pour des temps allant jusqu'à quelques microsecondes, d'identifier les canaux de fragmentations et les mécanismes associés.

Pour ces expériences, les ions traversent le piège électrostatique, les électrodes du piège étant portées à 0 V. Même si le piège n'est pas utilisé, une charge image est induite au niveau du *pick-up* ce qui permet de contrôler la stabilité du faisceau d'ions au cours des expériences.

Les ions sont « post-accélérés » jusqu'à une énergie de 5 keV juste avant la zone d'interaction laser. L'analyseur électrostatique à 45° permet ensuite de séparer les espèces chargés des espèces neutres produites. A la fin de cette partie nous montrerons quelles informations sont déduites des positions et temps d'arrivée des fragments ioniques et neutres obtenus avec la zone d'interaction polarisée.

I.6.1 Post-accélération et zone d'interaction polarisée

Les ions d'énergie cinétique 2,5 keV sont accélérés à 5 keV juste avant la zone d'interaction polarisée par une série de 6 électrodes planes qui constituent la « post-accélération ». Le potentiel appliqué à chaque électrode est indiqué sur la figure I.16. Le potentiel de chaque électrode de la post-accélération peut être ajusté séparément pour limiter la dispersion angulaire et la dispersion en énergie du faisceau d'ions incidents. La post-accélération permet non seulement d'améliorer l'efficacité de détection des fragments neutres, mais aussi de réduire l'ouverture angulaire du cône de fragmentation et de séparer temporellement les neutres parasites induits par collision avec le gaz résiduel en amont de la zone d'interaction, des espèces neutres produites par photoexcitation.

Un diaphragme de 0,5 ou 0,8 mm de diamètre, placé en aval de la post-accélération, permet de limiter la taille du faisceau avant l'interaction. Pour conserver l'énergie du faisceau en aval de la post-accélération, l'ensemble de la zone d'interaction, d'analyse et de détection des ions est portée au potentiel de référence V_0 = -2,5 kV.

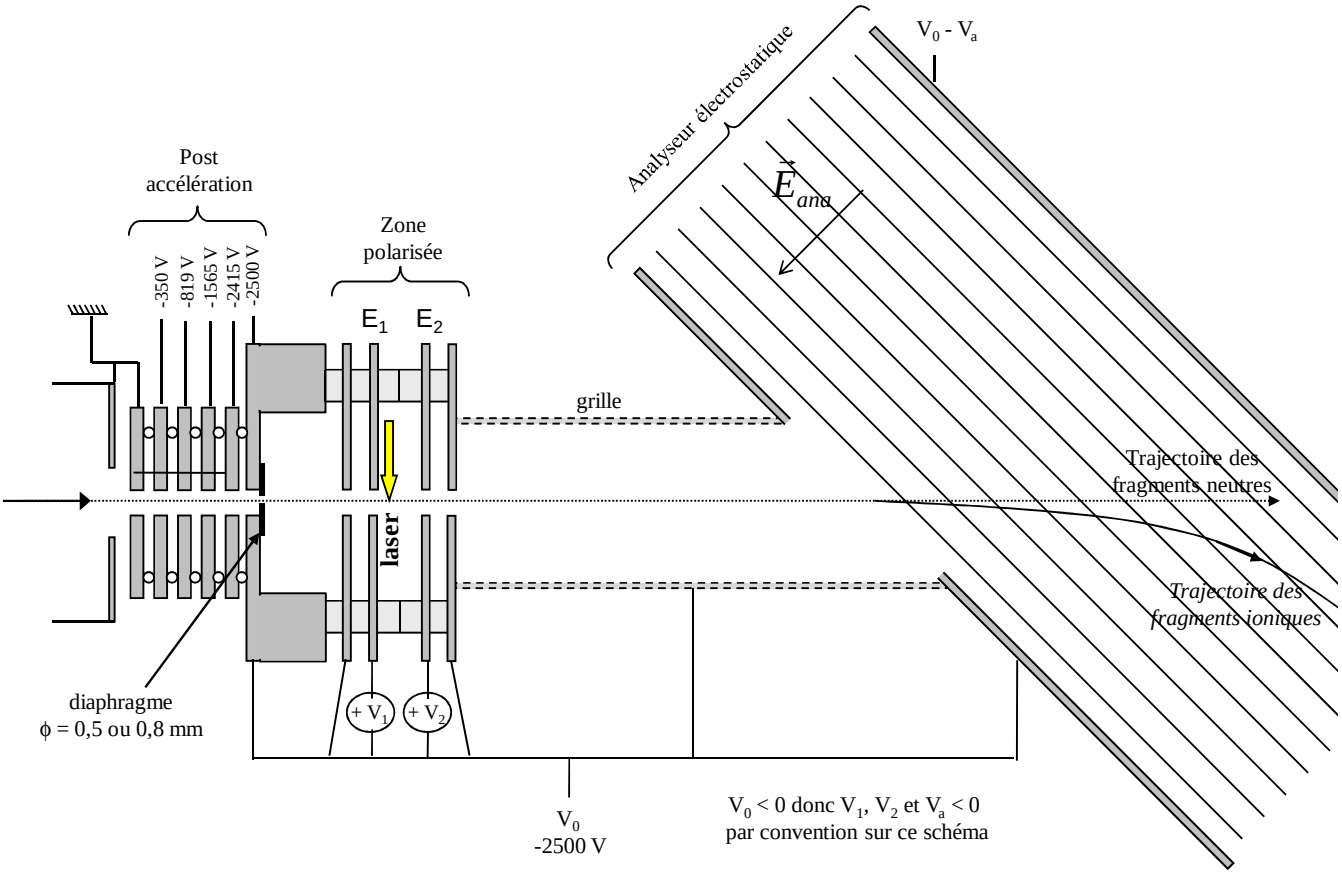


figure I.16 : Post-accélération et boîte d'interaction

La zone d'interaction polarisée est composée des deux électrodes E_1 et E_2 (cf figure I.16) séparées de 13 mm. La dernière électrode de post-accélération est située 6 mm en amont de E_1 et le laser est focalisé 1 mm en aval de l'électrode E_1. Les électrodes E_1 et E_2 sont portées respectivement aux potentiels (V_0 + V_1) et (V_0 + V_2), V_1 et V_2 étant des potentiels négatifs de quelques centaines de volts que l'on peut ajuster indépendamment l'un de l'autre. Située à 6 mm en aval de la zone polarisée se trouve une électrode portée au potentiel de référence V_0 = -2,5 kV.

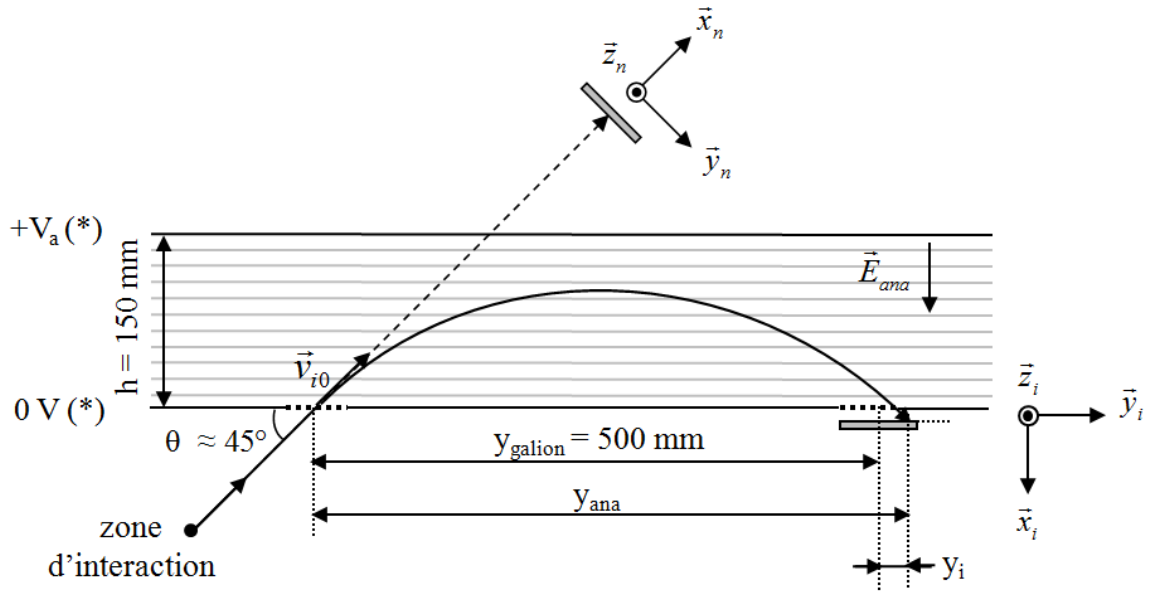
La polarisation appliquée entre les électrodes E_1 et E_2 permet de discriminer les fragmentations qui se produisent dans la zone polarisée de celles produites en aval de la zone polarisée. Dans la zone polarisée, le temps de transit des molécules est inférieur à 200 ns. En aval, leur temps de transit jusqu'à l'analyseur est de l'ordre de 5 µs. Les résultats expérimentaux observés présentent deux « contributions » distinctes : une contribution due aux fragments formés

dans la zone de polarisation (« contribution interieure ») et une autre due aux fragments formés en aval de cette zone (« contribution extérieure »).

On effectue deux types d'expérience : des expériences dans un potentiel constant (champ électrique nul), pour laquelle E_1 et E_2 sont portées au même potentiel ($V_1 = V_2 = V$) et des expériences dans un champ électrique constant qui décélère les ions, avec $V_1 = V$ et $V_2 = 0$ Volt. La valeur exacte de V dépend du canal de fragmentation (fragment ionique) que l'on veut étudier.

I.6.2 Analyseur électrostatique

L'analyseur électrostatique permet de séparer les espèces neutres et chargées produites par photofragmentation mais aussi de déterminer l'énergie des fragments ioniques produits et d'identifier leur masse. Une fois formés, les fragments neutres continuent leur trajectoire et atteignent le détecteur de neutres situé dans l'axe du faisceau incident. Les fragments ioniques sont défléchis dans l'analyseur électrostatique à plaques parallèles positionné à 45° par rapport au faisceau incident avant d'atteindre un autre détecteur situé sur la plaque d'entrée de l'analyseur (cf figure I.17).



(*) tensions exprimées par rapport au potentiel de référence: V_0 = -2,5 kV. Remarque: $V_a > 0$

figure I.17 : Analyseur électrostatique

Les deux détecteurs utilisés sont sensibles en temps et en position. Expérimentalement on mesure, pour des particules ioniques et neutres, les temps de vol jusqu'aux détecteurs à partir de l'instant où une impulsion laser croise le faisceau d'ions incidents et les positions d'arrivées suivant les axes $\vec{y}$ et $\vec{z}$ des détecteurs.

L'analyseur électrostatique modifie la trajectoire des ions dans le plan $(\vec{x}_i, \vec{y}_i)$, colinéaire au champ électrique $\vec{E}_{ana}$, alors que la composante de la vitesse suivant l'axe $\vec{z}_i$, normal au champ électrique n'est pas modifiée. L'analyseur électrostatique affecte donc uniquement le temps et la position d'arrivée des ions par rapport à l'axe $\vec{y}_i$.

Les mesures de y_i et t_i permettent de connaître l'énergie cinétique des fragments ioniques et ainsi d'en déduire leurs masses. On peut comparer ces données à un calcul analytique fruste ou à la simulation de type Monte-Carlo qui reproduit l'expérience. Le calcul analytique est détaillé dans le paragraphe qui suit et le programme de simulation Monte-Carlo est décrit dans le chapitre suivant. Ces deux méthodes ont nécessité une calibration préalable pour différentes masses, des paramètres de l'analyseur, θ, h, y_{galion} et V_a définis sur la figure I.17.

Le calcul analytique fruste néglige la déviation dθ, induite par le KER, du fragment ionique par rapport à la direction initiale du parent. On décompose selon les deux axes $\vec{x}_i$ et $\vec{y}_i$, le mouvement des ions traversant l'analyseur électrostatique. Pour un fragment ionique de masse m_i et de vitesse initiale $\vec{v}_{i0}$ faisant un angle θ avec l'axe $\vec{y_i}$ (figure I.17), on obtient les expressions :

$$\text{(I.18)} \quad x_i = -\frac{qV_a}{2m_i h} t^2 + v_{i0} \sin(\theta) t \qquad \text{et} \qquad \text{(I.19)} \quad y_i = v_{i0} \cos(\theta) t$$

On en déduit t_a, le temps mis par le fragment ionique pour effectuer une trajectoire parabolique dans l'analyseur :

$$\text{(I.20)} \qquad t_a = \frac{m_i v_{i0} \sin(\theta) h}{qV_a}$$

A partir de t_a, on obtient l'expression de y_{ana}, projection selon l'axe $\vec{y}_i$ de la trajectoire de l'ion dans l'analyseur:

$$\text{(I.21)} \quad y_{ana} = \frac{m_i v_{i0}^2 \sin(2\theta) h}{qV_a} = \frac{2E_{i0} \sin(2\theta) h}{qV_a} \qquad \text{avec} \quad \text{(I.22)} \quad E_{i0} = \frac{1}{2} m_i v_{i0}^2$$

La position d'arrivée y_i de l'ion sur l'axe horizontal du détecteur est définie par la relation :

$$\text{(I.23)} \qquad y_i = y_{ana} - y_{galion} = \frac{2E_{i0} h}{qV_a} - y_{galion}$$

avec y_{galion}, distance définie sur la figure I.17

De l'équation (I.21), on déduit également la constante d'analyseur K :

$$K = \frac{E_{i0}}{qV_a} = \frac{y_{galion}}{2h\sin(2\theta)} = 1{,}666 \qquad \text{(I.24)}$$

Le champ V_a/h appliqué à l'analyseur électrostatique permet de sélectionner la masse de l'ion fragment. Inversement, pour un champ V_a/h fixé, la position y_i des ions détectés augmente linéairement en fonction de leur masse et de leur énergie cinétique à l'entrée de l'analyseur électrostatique.

I.6.3 Observations expérimentales

Dans les paragraphes qui suivent nous allons voir comment la zone polarisée en potentiel ($V_1 = V_2 = V$) affecte les observables y_i et t_n utilisées pour mesurer les constantes de temps associées à chaque canal de fragmentation.

I.6.3.1 Influence de la zone polarisée sur y_i, la position d'impact des fragments ioniques sur le détecteur

La figure I.18 indique les énergies cinétiques, $E_{i(int)}$ et $E_{i(ext)}$, des fragments ioniques formés à l'intérieur et à l'extérieur de la zone d'interaction polarisée en potentiel. Soit qV_0 l'énergie cinétique de l'ion incident de masse m_0. Dans la zone d'interaction polarisée par un potentiel V, l'énergie de l'ion incident est $[q(V_0 + V)]$ et celle d'un fragment ionique produit à l'intérieur de la zone polarisée, $[q(V_0 + V)*m_i/m_0]$. Les ions sont décélérés à la sortie de la zone polarisée. A l'entrée de l'analyseur électrostatique, l'énergie $E_{i(int)}$ d'un fragment ionique produit dans la zone polarisée est égale à $[q(V_0 + V)*m_i/m_0 - qV]$. L'énergie des ions parents est égale à qV_0 et celle $E_{i(ext)}$ d'un fragment ionique produit à l'extérieur de la zone polarisée, à $[qV_0*m_i/m_0]$, comme illustré sur la figure I.18.

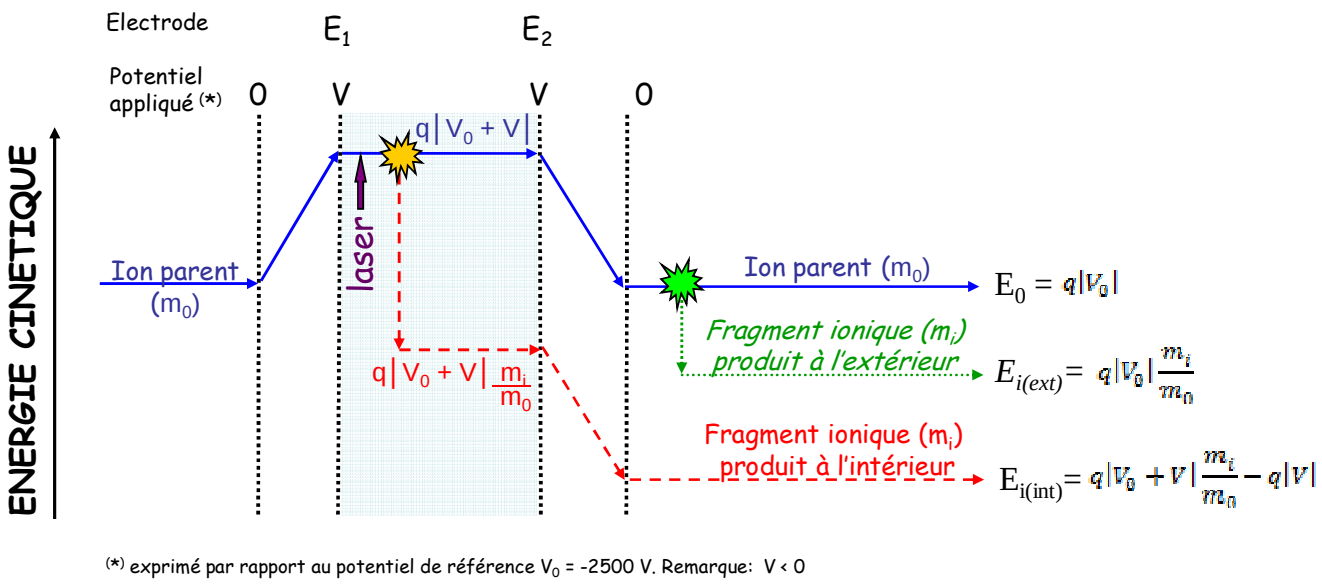


figure I.18: Energie cinétique des fragments ioniques formés à l'intérieur et à l'extérieur de la zone polarisée en potentiel

On déduit des expressions de $E_{i(int)}$ et $E_{i(ext)}$ la relation suivante :

$$E_{i(int)} = E_{i(ext)} - qV\frac{m_n}{m_0} \qquad \text{(I.25)}$$

Un fragment ionique formé dans la zone polarisée a donc moins d'énergie cinétique à l'entrée dans l'analyseur électrostatique qu'un fragment formé à l'extérieur de la zone polarisée. Soit $y_{i(int)}$, la position d'impact sur le détecteur, des ions qui ont fragmenté à l'intérieur de la zone polarisée et $y_{i(ext)}$ celle des ions qui ont fragmenté à l'extérieur. On a donc, d'après la relation (I.23) :

$$y_{i(int)} < y_{i(ext)} \qquad \text{(I.26)}$$

La position d'arrivée y_i d'un fragment ionique permet donc de séparer les ions fragments suivant leur énergie cinétique à l'entrée de l'analyseur électrostatique, comme illustré à la figure I.19.a. En comparant le rapport entre les contributions intérieur et extérieur en y_i, on peut estimer, avec l'aide du programme de simulation, la constante de temps du canal de fragmentation étudié[2].

[2] A condition que les fragments formés par collision avec le gaz résiduel, sur ce canal de dissociation, soient négligeables (cf chapitre II).

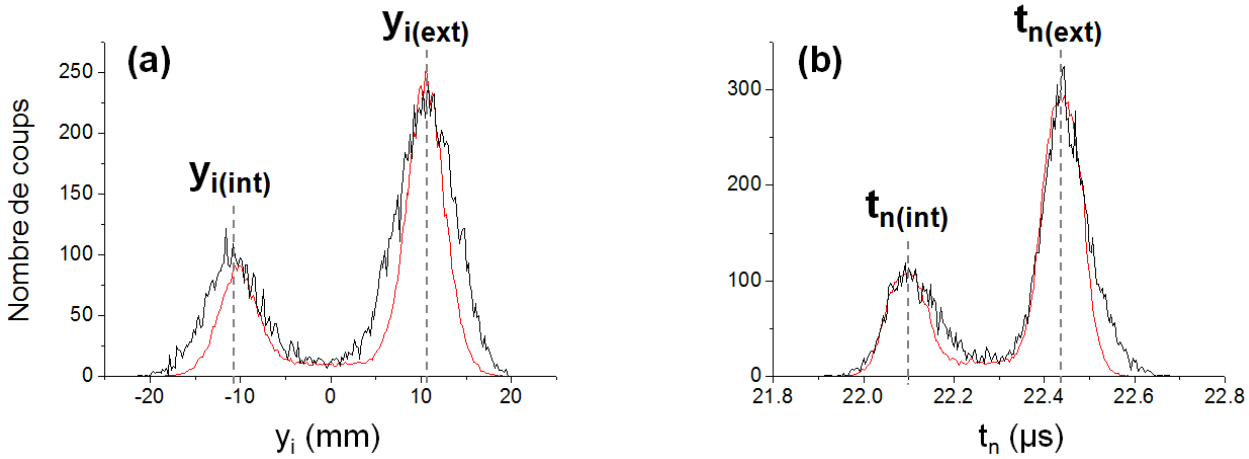


figure I.19: Illustration de la séparation des contributions intérieures et extérieures en y_i et en t_n. Enregistrement effectué en potentiel pour le canal m/z = 205 du complexe [Trp(CE) + H]$^+$ (m/z = 469). En noir : points expérimentaux ; en rouge : simulation pour une constante de temps τ = 900 ns.

I.6.3.2 Influence de la zone polarisée sur t_n, le temps d'arrivée des fragments neutres sur le détecteur

La figure I.20 représente les vitesses des fragments ioniques et neutres formés à l'intérieur et à l'extérieur de la zone d'interaction polarisée avec un potentiel constant V. Les fragments formés à l'intérieur de la zone polarisée sont émis avec la vitesse de l'ion parent dans la zone polarisée. Les fragments neutres formés à l'intérieur de la zone polarisée conservent cette vitesse $v_{n(int)} = \sqrt{\frac{2q(V_0+V)}{m_0}}$ jusqu'à leur arrivée au détecteur. Les ions parents et les ions fragments formés dans la zone polarisée sont décélérés à la sortie de la zone polarisée. Après cette décélération, les fragments ioniques formés à l'intérieur de la zone polarisée ont une vitesse $v_{i(int)} = \sqrt{2q\left(\frac{V_0+V}{m_0}+\frac{V}{m_i}\right)}$ qu'ils conservent jusqu'à l'entrée de l'analyseur électrostatique. Les fragments neutres et ioniques formés à l'extérieur de la zone polarisée sont émis avec la vitesse de l'ion parent, $v_{n(ext)} = v_{i(ext)} = \sqrt{\frac{2qV_0}{m_0}}$.

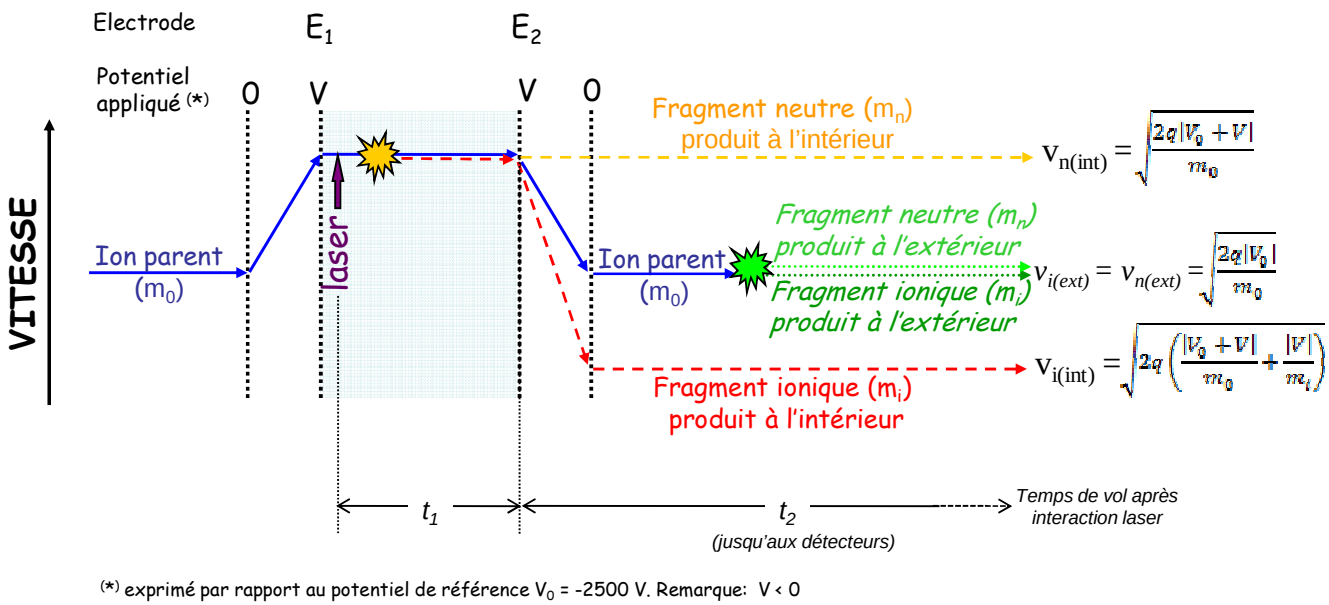


figure I.20: Vitesse des fragments pour la zone polarisée en potentiel

Les fragments neutres formés à l'extérieur de la zone polarisée ont donc une vitesse $v_{n(ext)}$ plus petite que la vitesse $v_{n(int)}$ de ceux formés à l'intérieur de la zone polarisée. Dans la suite de ce paragraphe nous ne discuterons que les vitesses et temps d'arrivée des fragments neutres.

Comme montré sur la figure I.20, le temps de vol t_n mesuré peut se décomposer, en $t_n = t_1 + t_2$, avec t_1 le temps de vol entre les électrodes E_1 et E_2 et t_2 le temps de vol entre l'électrode E_2 et l'arrivée au détecteur. Le temps t_1 est le même pour toutes les particules neutres quel que soit l'endroit de fragmentation (intérieur ou extérieur de la zone polarisée). Comme $v_{n(int)} < v_{n(ext)}$, le temps t_2 est plus grand si l'ion incident fragmente à l'extérieur de la zone polarisée. Le temps t_n mesuré ($t_n = t_1 + t_2$) évolue donc comme t_2 et permet de séparer les contributions intérieures $t_{n(int)}$, des contributions extérieures $t_{n(ext)}$, comme illustré à la figure I.19.b, qui sont telles que :

$$t_{n(int)} < t_{n(ext)} \qquad \text{(I.27)}$$

En effectuant le rapport entre les contributions intérieur et extérieur obtenues en fonction de t_n, on peut, comme avec l'observable y_i, estimer la constante de temps de fragmentation du canal étudié. Cependant, contrairement à la position y_i, le temps t_n ne nous permet pas de discriminer les différentes voies de fragmentation. En effet, pour une même molécule incidente, toutes les espèces neutres produites à l'intérieur de la zone polarisée, ont le même temps d'arrivée, quel que soit le canal de fragmentation. Il en est de même pour les espèces neutres issues de différents canaux, produites à l'extérieur pour une même molécule incidente.

La zone d'interaction peut aussi être polarisée par un champ électrique qui décélère les ions (V_1 = V et V_2 = 0 Volt). Cette configuration permet de mesurer avec précision les constantes de temps de fragmentation inférieures à 250 ns. Ce type d'expérience et l'analyse des résultats associés sont décrits dans le chapitre II.

I.7 Limitation angulaire du système de détection

Lors d'une fragmentation, l'énergie relative des fragments (KER) se traduit dans le système du laboratoire par une ouverture de l'angle de diffusion. Considérons le cas le plus simple d'une fragmentation binaire en un fragment ionique et un fragment neutre à partir de l'ion parent monochargé. Dans notre configuration expérimentale, est-il possible de détecter tous les fragments ioniques et neutres formés ? Quelle est la limite angulaire de notre système de détection ?

Soit V_0 la vitesse dans le référentiel du laboratoire des ions incidents de masse m_0 et d'énergie initiale E_0, soient v_i et v_n les vitesses dans le référentiel moléculaire des fragments ioniques et neutres de masses m_i et m_n. Les expressions de V_0, v_i et v_n données ci-dessous seront utilisées par la suite :

$$V_0 = \sqrt{\frac{2\,E_0}{m_0}} \qquad \text{(I.28)}$$

$$v_n = \sqrt{\frac{2\,KER\,m_i}{m_0\,m_n}} \quad \text{et} \quad v_i = \sqrt{\frac{2\,KER\,m_n}{m_0\,m_i}} \qquad \text{(I.29)} \quad \text{(I.30)}$$

Les expressions de v_i et v_n sont déduites de l'expression du KER et de la conservation de la quantité de mouvement dans le référentiel moléculaire (cf page 40)

I.7.1 Condition de détection des espèces neutres

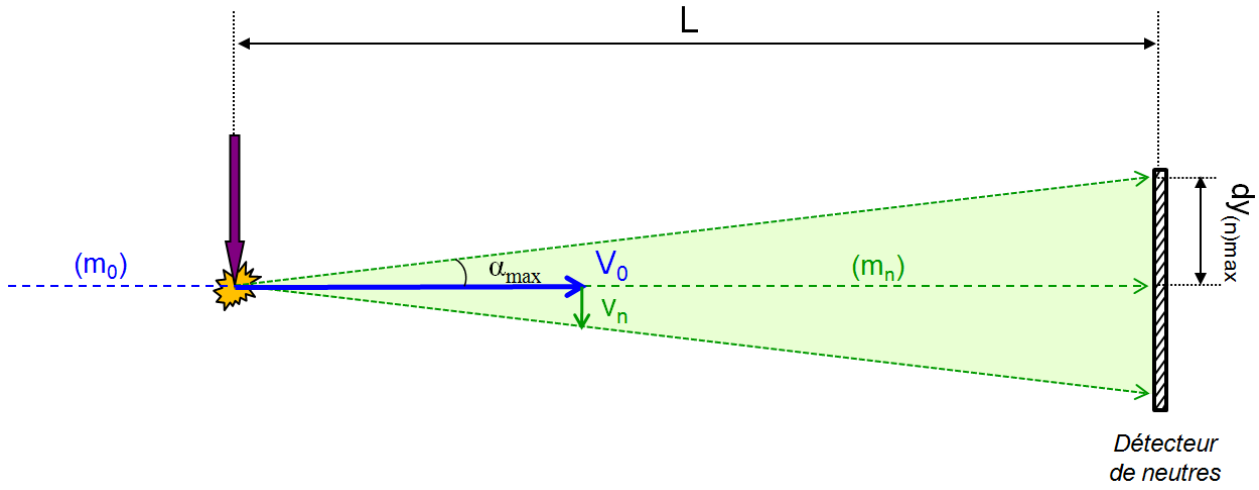


figure I.21 : Représentation schématique du cône de fragmentation des espèces neutres

Les fragments neutres ont une trajectoire de vol libre sur la distance L (= 1.025 m) qui sépare l'interaction laser du détecteur de neutres. L'acceptance angulaire de ce détecteur est telle que :

$$\text{(I.31)} \qquad \tan(\alpha_{max}) = \frac{dy_{n(max)}}{L}$$

α, L et dy_n sont définis sur la figure I.21. Le rayon de détection maximum $dy_{n\,(max)}$ = 20 mm. Le détecteur de neutre a donc une acceptance angulaire maximale α_{max} = 1.1°. Ce détecteur collecte entièrement tous les fragments neutres tels que :

$$\text{(I.32)} \quad \frac{v_n}{V_0} = \sqrt{\frac{KER\, m_i}{E_0\, m_n}} \leq \tan(\alpha_{max})$$

On en déduit la relation :

$$\text{(I.33)} \quad m_n \geq m_0 \times \frac{KER}{KER + E_0 \tan^2(\alpha_{max})}$$

Pour E_0 = 5 keV, on collecte entièrement tous les fragments neutres de masse $m_n \geq m_0$*5/100 émis avec un KER de 100 mV. Notons que pour détecter l'ensemble des fragments neutres produits, il est nécessaire que l'énergie incidente E_0 soit grande. Cela permet de diminuer l'angle α en minimisant l'effet dispersif dû au KER.

I.7.2 Condition de détection des espèces chargées

Les ions ont une trajectoire de vol libre suivant l'axe $\vec{z}_i$. Comme les espèces neutres, tous les ions de masse $m_i \geq m_0$*5/100 sont entièrement collectés sur cette coordonnée.

Dans l'analyseur électrostatique, suivant l'axe $\vec{y}_i$, la détection des fragments ioniques est limitée par la dispersion spatiale et la dispersion en énergie cinétique des ions à l'entrée de l'analyseur électrostatique. Dans ce paragraphe nous ne nous intéressons qu'à l'effet de la dispersion en énergie cinétique sur le cône de fragmentation des espèces chargées, en considérant qu'il n'y a pas de dispersion spatiale à l'entrée de l'analyseur électrostatique.

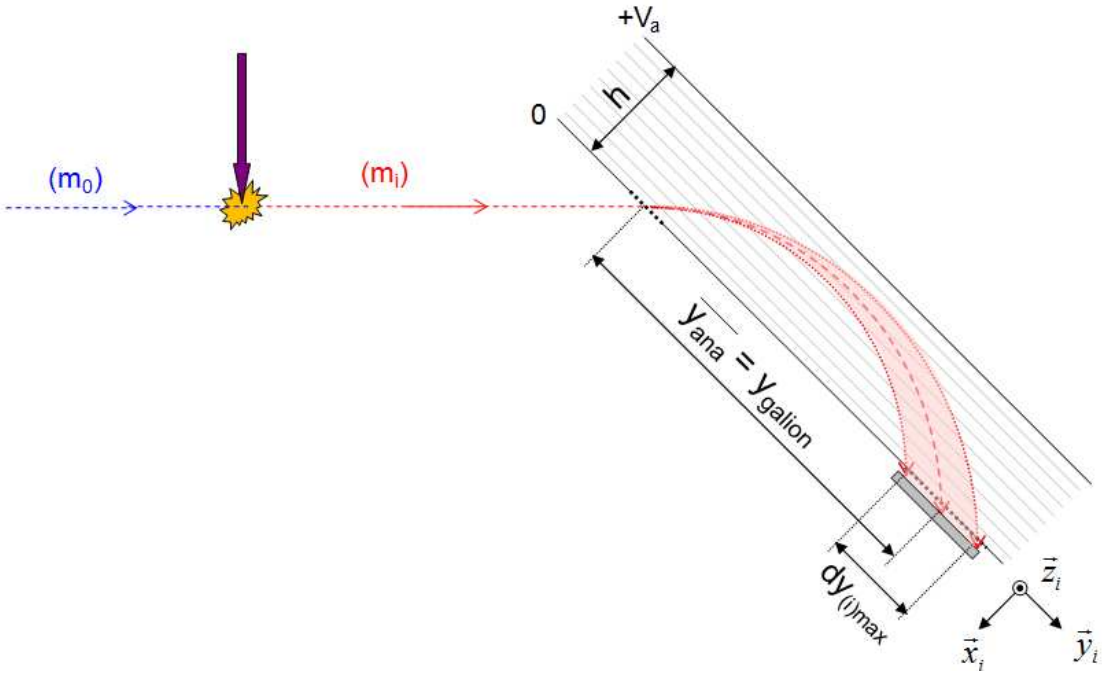


figure I.22 : Représentation du cône de fragmentation des ions induit par leur dispersion en énergie cinétique à l'entrée de l'analyseur électrostatique

On note $\bar{E}_i$ l'énergie moyenne des fragments ioniques à l'entrée de l'analyseur électrostatique :

$$\bar{E}_i = \frac{m_i}{m_0} E_0 \qquad \text{(I.34)}$$

On définit $\overline{y_{ana}}$ la distance parcourue suivant l'axe $\vec{y}_i$ par les ions d'énergie $\bar{E}_i$. D'après la relation (I.21) établie page 51 :

$$\overline{y_{ana}} = \frac{2\mathrm{h}}{\mathrm{q}V_\mathrm{a}} \bar{E}_i \qquad \text{(I.35)}$$

h et V_a sont la hauteur et la tension de l'analyseur électrostatique. La tension V_a est choisie pour que le cône de fragmentation des ions soit centré sur le détecteur (cf figure I.22). On a donc $\overline{y_{ana}}$ = y_{galion} = 500 mm.

La dispersion en énergie cinétique des ions à l'entrée de l'analyseur électrostatique est due au KER. Les valeurs extrêmes d'énergie cinétique s'expriment donc suivant l'expression :

$$E_i = \frac{1}{2} m_i (V_0 \pm v_i)^2 = \frac{m_i}{m_0} E_0 + \frac{1}{2} m_i v_i^2 \pm 2 \frac{m_i}{m_0} \sqrt{KER\ E_0 \frac{m_n}{m_i}} \quad \text{(I.36)}$$

La dispersion en énergie cinétique ΔE_i des fragments ioniques à l'entrée de l'analyseur électrostatique est donc telle que :

$$\Delta E_i = 4 \frac{m_i}{m_0} \sqrt{KER\ E_0 \frac{m_n}{m_i}} \quad \text{(I.37)}$$

Cette dispersion en énergie provoque un élargissement de la distance parcourue sur l'axe $\vec{y}_i$ de l'analyseur, noté Δy_{ana} :

$$\Delta y_{ana} = \frac{2\mathrm{h}}{\mathrm{q} V_\mathrm{a}} \Delta E_i \quad \text{(I.38)}$$

Le détecteur d'ions collecte entièrement tous les fragments ioniques tels que :

$$\Delta y_{ana} \leq dy_{(i)max} \quad \text{(I.39)}$$

avec $dy_{(i)max}$ = 40 mm, le diamètre de détection maximum du détecteur d'ions, défini sur la figure I.22. En utilisant les équations (I.35) et (I.38) dans l'équation (I.39), on obtient :

$$\frac{\Delta E_i}{\overline{E_i}} \leq \frac{dy_{(i)max}}{\overline{y_{ana}}} \quad \text{(I.40)}$$

Soit

$$4 \sqrt{\frac{KER\ m_n}{E_0 m_i}} \leq \frac{dy_{(i)max}}{\overline{y_{ana}}} \quad \text{(I.41)}$$

$$m_i \geq m_0 \times \frac{1}{1 + \frac{E_0}{KER} \left(\frac{dy_{(i)max}}{4 \times \overline{y_{ana}}} \right)^2} \quad \text{(I.42)}$$

Si on ne tient pas compte de la dispersion spatiale à l'entrée de l'analyseur électrostatique, pour E_0 = 5 keV on collecte entièrement sur l'axe $\vec{y}_i$ tous les ions de masse $m_i \geq m_0$*5/100 émis avec un KER de 100 mV (avec $dy_{(i)max}$ = 40 mm et y_{ana} = 500 mm).

En conclusion, pour des molécules de masse allant de 100 à 350 u.m.a, on ne peut détecter que très partiellement les fragments qui correspondent au proton ou l'atome d'hydrogène. Pour la

même gamme de masses incidentes, on détecte et on collecte entièrement de petites molécules neutres ou chargées comme NH_3, H_2O, NH_4^+, ou H_3O^+.

I.8 Détecteurs à localisation et acquisition de données

Les deux types d'expériences réalisées avec notre dispositif utilisent le même système de détection. Pour les expériences avec le piège électrostatique, on ne mesure que le temps de vol des espèces neutres produites. Par contre les expériences en coïncidences nécessitent une détection de tous les fragments produits, ioniques et neutres et la mesure de leur position et temps d'arrivée.

Les détecteurs de l'expérience sont sensibles en temps et en position. Ces détecteurs font appel à deux technologies qui se différencient par la durée de leur « temps-mort ». Le temps-mort d'un détecteur est l'intervalle de temps minimum nécessaire au détecteur pour traiter correctement deux signaux qui correspondent à des temps d'arrivée différents.

Un détecteur rapide est utilisé pour les neutres. Il effectue une localisation par des lignes à retard et permet la détection de plusieurs fragments avec un temps mort de 40 ns. Un détecteur « lent » avec une anode résistive est utilisé pour détecter et localiser le seul fragment ionique produit par évènement physique. Il a un temps mort de quelques microsecondes.

Dans cette partie, on décrit le fonctionnement des détecteurs de neutres et d'ions ainsi que le codage des données issues de ces détecteurs. Un convertisseur temps numérique multivoies (CTNM3, IPN Orsay) est utilisé pour coder les temps d'arrivées des signaux électriques issus des deux détecteurs. Le fonctionnement du CTNM3 est précisé dans l'annexe 1.

I.8.1 Détection et localisation des particules neutres par la méthode des lignes à retard

Le détecteur de neutres est composé d'un empilement de 3 galettes de microcanaux suivies d'un système de localisation à lignes à retard, constitué d'une ligne de transmission verticale (notée « 1 » sur la figure I.23) et d'une ligne de transmission horizontale (notée « 2 » sur la figure I.23). Ces deux lignes de transmission, de plus de 13 m de long, croisées perpendiculairement, sont chacune formées de deux fils conducteurs métalliques, distants de 0.5 mm, bobinés autour d'un cadre de 60 mm sur 60 mm. La résolution spatiale du détecteur de neutres est de 0.5 mm.

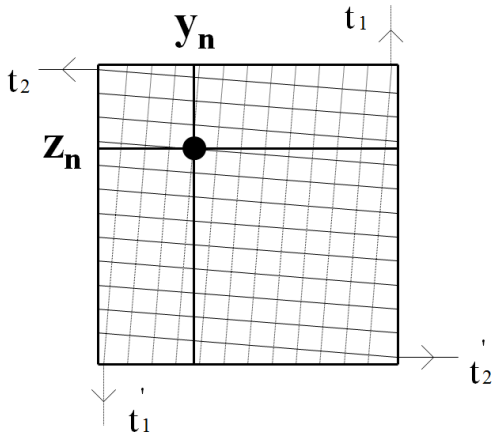


figure I.23 : Lignes à retard

Le passage de la gerbe d'électrons issue des galettes de microcanaux induit un signal électrique dans les deux lignes. Ce signal se propage vers les extrémités de chacune des lignes. Etant donné que la vitesse de propagation des signaux dans une ligne est constante (3 ns.m^{-1}), le temps mis par le signal pour arriver à une extrémité de la ligne est proportionnel à la distance parcourue par le signal depuis le point où il est créé. Les coordonnées y_n et z_n de la position d'impact d'une particule neutre sont proportionnelles à la différence de temps d'arrivée (t et t') des signaux aux extrémités de chaque ligne.

$$y_n \propto t'_1 - t_1 \quad \text{(I.43)}$$

$$z_n \propto t'_2 - t_2 \quad \text{(I.44)}$$

Par la suite, on appellera signal « temps-position » un signal temporel qui permet de coder la position d'arrivée sur le détecteur neutre (t_1, t'_1, t_2 ou t'_2). A noter que le temps mort de 40 ns de ce détecteur n'est pas imposé par le système de détection à lignes à retard mais par le temps de codage.

I.8.2 Codage des données issues du détecteur de neutres

La gerbe d'électrons créée au niveau des galettes de microcanaux est vue comme un appel de courant au niveau de l'alimentation de polarisation des galettes, autrement dit comme un signal électrique positif émis. Ce signal (représenté en bleu sur la figure I.24) sert de prise de temps pour l'arrivée d'une espèce neutre sur le détecteur (signal « temps d'arrivée »). Il est inversé puis amplifié et traduit en signal logique par un discriminateur à fraction constante (CFD). Ce signal

est ensuite envoyé sur une des voies d'entrée (voie 3) du CTNM3 et sert à coder le temps d'arrivée de la particule neutre.

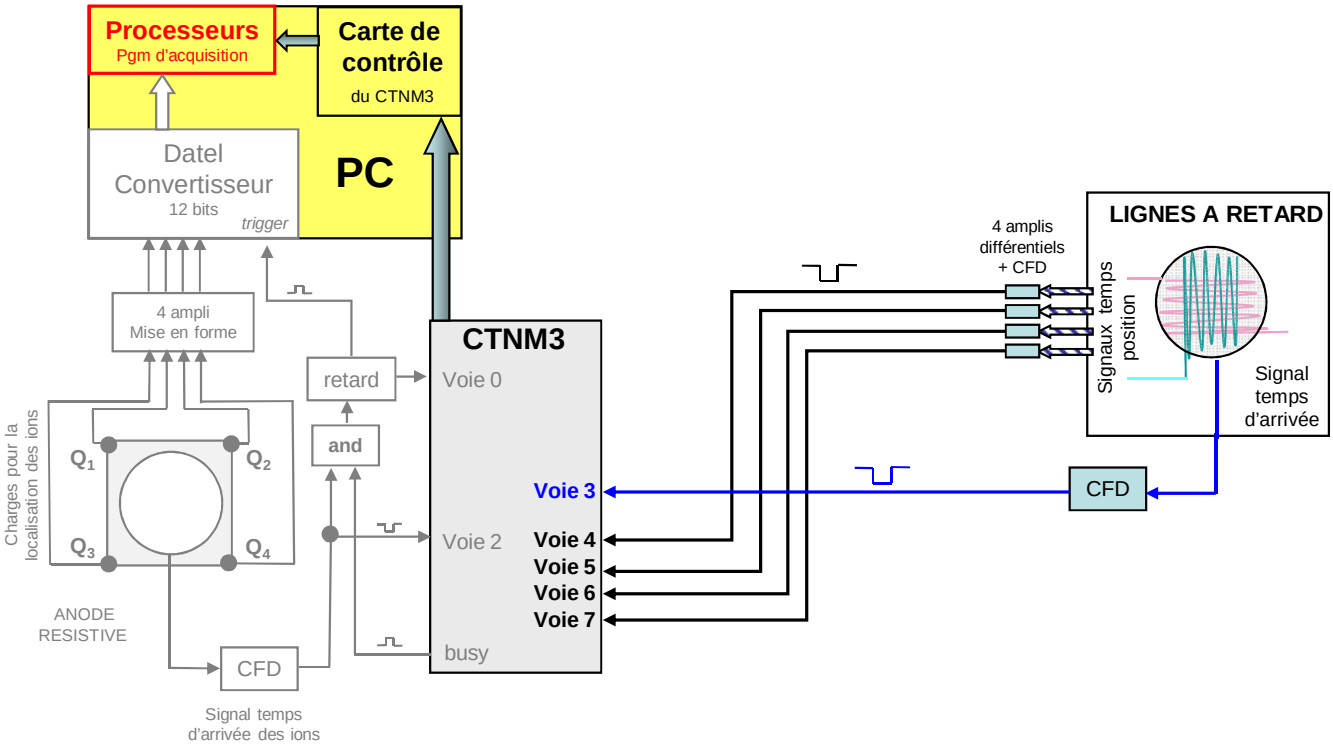


figure I.24 : Schéma électronique du système de détection avec mise en valeur de la partie concernant le codage des données issues du détecteur de neutres

Les 4 paires de signaux « temps-position » issues des lignes à retard sont amplifiées et mises en forme (signaux TTL). Chaque signal est envoyé vers un discriminateur à fraction constante (CFD) puis traduit en signal NIM avant d'être envoyé vers le CTNM3 (voies 4 à 7). Le temps mort du détecteur de neutre correspond au temps de codage par le CTNM3 qui est d'environ 40 ns. Après la détection d'une première particule, le CTNM3 ne code la position et le temps d'arrivée d'une deuxième particule que si celle-ci est détectée plus de 40 ns après la première.

Après codage en signal logique par le CTNM3, les 4 signaux « temps-position » et le signal « temps d'arrivée » des neutres sont transférés au PC (en jaune sur la figure I.24) via une carte de contrôle et traités par le programme d'acquisition décrit dans l'annexe 2. Ce programme effectue, d'une part, le stockage des données « brutes », et d'autre part, un « prétraitement » de ces données. La procédure de prétraitement consiste (en particulier) à vérifier que les 4 signaux « temps-positions » (t_1, t'_1, t_2 ou t'_2) et le signal « temps d'arrivée » t_n sont bien associés à la même particule :

$$\frac{t_1 - t_1'}{2} - t_n = constante \quad \text{(I.45)}$$

$$\frac{t_2 - t_2'}{2} - t_n = constante' \quad \text{(I.46)}$$

Si les conditions ci-dessus sont vérifiées, la position de la particule neutre est codée sur 4096*4096 pixels par le programme d'acquisition et mémorisée avec le temps d'arrivée qui lui est associé. La procédure de prétraitement permet d'effectuer une visualisation en direct des données enregistrées, tandis qu'une autre procédure gère le stockage sur le disque dur des « données brutes » (qui n'ont subi aucun traitement) (cf annexe 2).

I.8.3 Détection et localisation des ions par la méthode de division de charge

Le détecteur d'ions est situé sur la plaque d'entrée de l'analyseur électrostatique (cf figure I.17). Il est constitué d'un empilement de 3 galettes de microcanaux qui permettent d'amplifier le signal électrique provoqué par l'impact d'un ion sur la surface de la 1ère galette. La gerbe d'électrons formée en sortie des galettes de microcanaux est reçue sur une anode résistive (cf figure I.25). Les charges migrent progressivement vers les bords de l'anode et sont collectées en ses quatre coins. Le temps-mort du détecteur est inhérent au temps d'écoulement des charges sur l'anode résistive qui est ici de l'ordre de 2 µs.

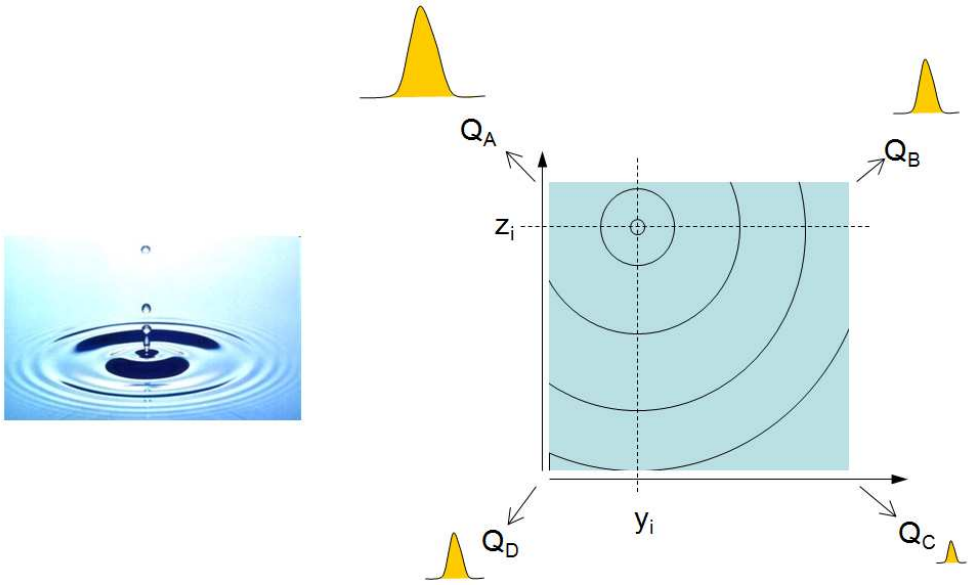


figure I.25 : Répartition des charges aux 4 coins de l'anode résistive

La position est déterminée à partir des quantités de charges Q_A, Q_B, Q_C et Q_D collectées à chaque angle de l'anode résistive (figure I.25). Les coordonnées y_i et z_i de l'impact de l'ion sur les galettes sont données par les relations :

$$y_i = \frac{Q_D}{Q_D + Q_C} = \frac{Q_A}{Q_A + Q_B} = \frac{Q_A + Q_D}{Q_A + Q_B + Q_C + Q_D} \qquad \text{(I.47)}$$

$$z_i = \frac{Q_D}{Q_D + Q_A} = \frac{Q_C}{Q_C + Q_B} = \frac{Q_D + Q_C}{Q_A + Q_B + Q_C + Q_D} \qquad \text{(I.48)}$$

La résolution spatiale du détecteur d'ions est de 0,1 mm.

I.8.4 Codage des données issues du détecteur d'ions

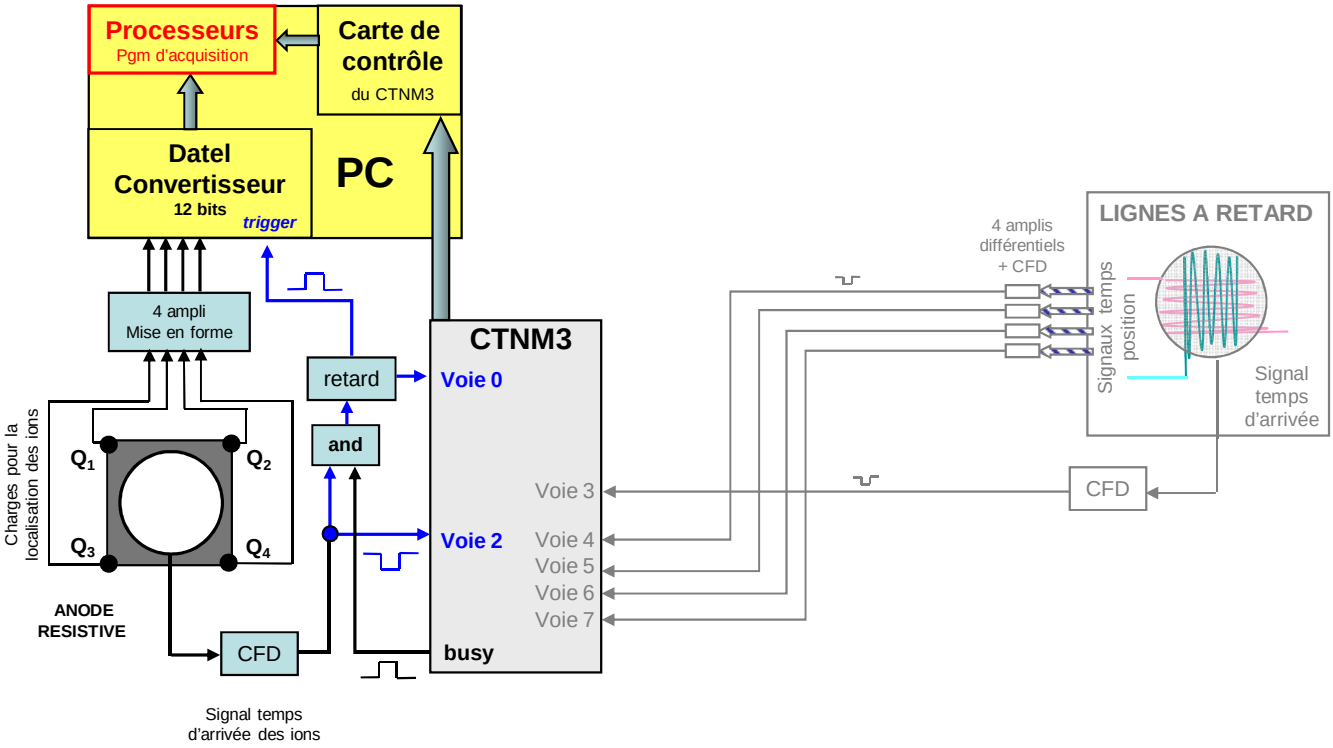


figure I.26 : Schéma électronique du système de détection avec mise en valeur de la partie concernant le codage des données issues du détecteur d'ions

De même que pour les neutres, le signal « temps d'arrivée » d'une espèce chargée (représenté en bleu sur la figure I.26), après passage par un CFD, est traduit en signal NIM et envoyé vers le CTNM3 (voie 2). Ce signal est aussi utilisé après un retard adapté pour déclencher

une carte de conversion analogique-numérique située dans le PC (Datel). La carte Datel n'est déclenchée (signal *trigger*) que si un signal est créé sur les MCP du détecteur pendant la fenêtre temporelle de l'évènement (émission d'un signal *busy*, cf annexe 1). Si ces deux conditions sont remplies (porte logique « and »), la carte Datel échantillonne simultanément les signaux issus des quatre charges (Q_A, Q_B, Q_C et Q_D) associées au signal temps d'arrivée des ions. Le signal « temps d'arrivée » des ions auquel on a appliqué un retard adapté (en bleu sur la figure I.26) est envoyé vers la voie 0 du CTNM3 pour être ensuite utilisé par le programme d'acquisition.

De même que pour les données issues du détecteur de neutres, le signal « temps d'arrivée » des ions, après avoir été codé par le CTNM3, transite vers le PC via la carte de contrôle.

Dans la procédure de prétraitement, le « signal retardé » du « temps d'arrivée » des ions est comparé au temps d'écoulement des charges sur l'anode résistive. Ceci permet de vérifier que le signal « temps d'arrivée » des ions et que les charges collectées aux quatre coins de l'anode correspondent bien au même évènement physique. Si cette condition est vérifiée, les positions d'arrivées y_i et z_i sont calculées à partir des charges collectées par l'anode puis codées en 4096*4096 pixels et associées au temps d'arrivée. Comme pour les neutres, une visualisation en temps réel des données issues du détecteur d'ions (temps et localisation) est possible (cf annexe 2).

I.9 Synchronisation temporelle de l'expérience

Notre dispositif fonctionne en mode pulsé, imposé par l'utilisation du laser. L'horloge de l'expérience correspond au signal délivré par une photodiode visualisant l'impulsion du laser dont la fréquence propre est de 1 kHz. La synchronisation temporelle de l'expérience est gérée par le GINI (générateur d'impulsions numérisées programmables). A partir du signal de la photodiode, le GINI génère un ensemble de signaux TTL, déclenchés avec une précision de 125 ps, de durée et de période ajustables par pas de 10 ns, émis suivant une séquence temporelle programmable. Un exemple de séquence temporelle créée par le GINI et utilisée pour nos expériences est présentée sur la figure I.27.

La figure I.27 présente le chronogramme de l'expérience, les retards et les durées de chaque signal étant gérés par le GINI. Les séquences temporelles du GINI présentes sur ce chronogramme

sont cadencées à la même fréquence que le laser (kHz). La photodiode du laser déclenche une porte temporelle qui démarre la séquence d'impulsion. Le signal de déclenchement de la source ESI est synchronisé sur l'impulsion laser qui précède. Ainsi le déclenchement de la source est retardé du temps nécessaire aux ions pour atteindre la zone d'interaction avec le laser (1 ms – t_{ESI}). Le signal de déclenchement de la source sert d'horloge aux signaux (cf figure I.27).

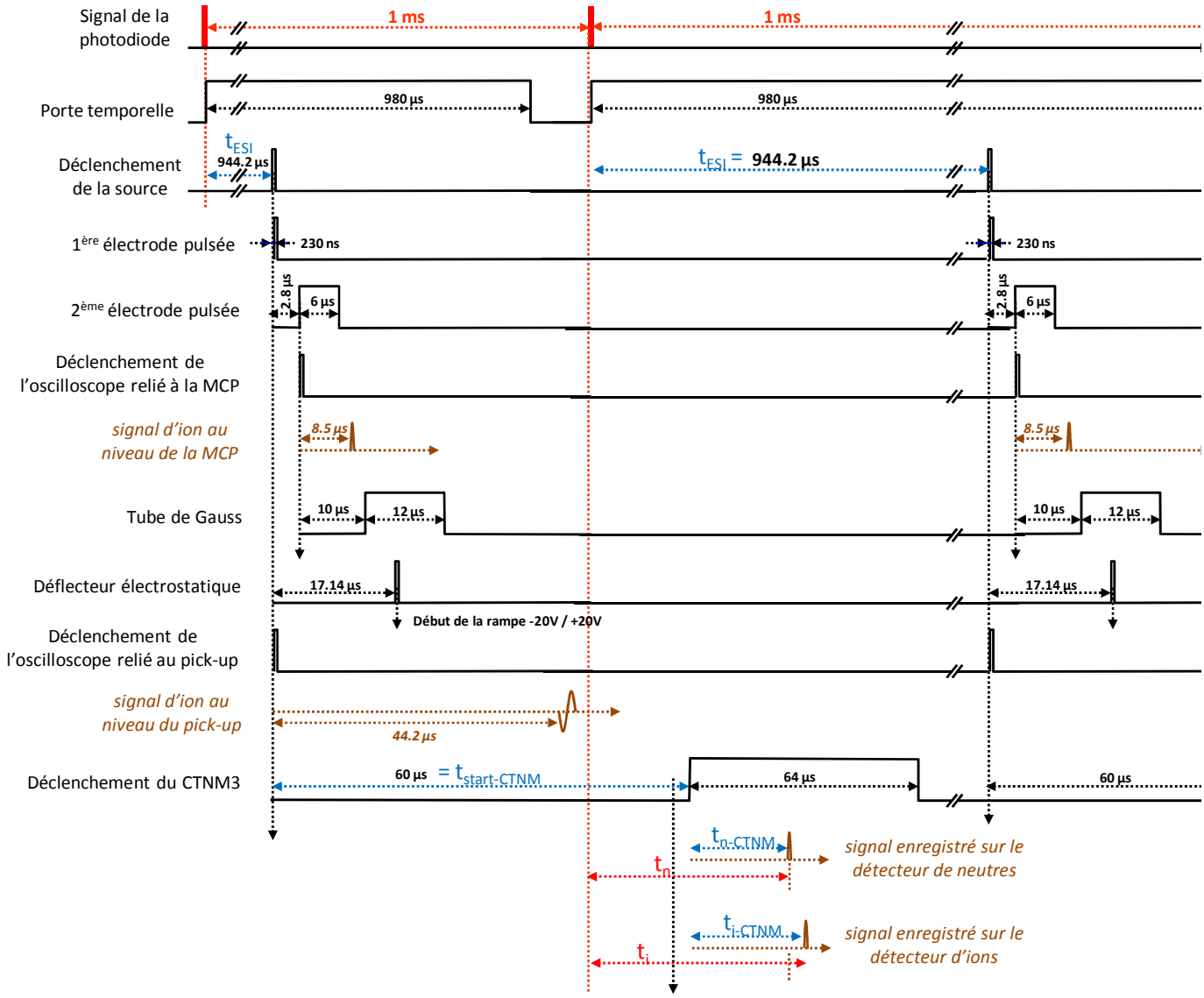


figure I.27: Chronogramme pour une expérience pulsée à 1 kHz, optimisée pour la molécule de Trp-H$^+$ (m/z 205$^+$)

Le temps t_i et t_n sont les temps de vol jusqu'aux détecteurs des fragments ioniques et neutres produits. Ils sont comptés à partir de l'instant où une impulsion laser arrive sur la photodiode, qui correspond à l'instant d'interaction entre l'impulsion laser et le paquet d'ions. Le temps t_n

s'exprime par la relation : $t_n = (t_{ESI} + t_{start\text{-}CTNM} + t_{n\text{-}CTNM} - 1\ ms)$, avec t_{ESI}, $t_{start\text{-}CTNM}$ et $t_{n\text{-}CTNM}$ définis sur la figure I.27. Les temps t_i et t_n sont calculés par le programme de traitement de données, présenté au chapitre suivant.

Le chronogramme de la figure I.27 est utilisé pour des expériences en coïncidences. Pour les expériences effectuées avec le piège électrostatique, on utilise le même type de chronogramme cadencé à plus basse fréquence (500 Hz maximum, pour laisser au paquet d'ions le temps de se synchroniser). Il faut en plus synchroniser l'ouverture et la fermeture du piège par rapport au temps de passage des ions. Le chronogramme correspondant à ce type de fonctionnement est montré figure I.28. Pour chaque cycle de piégeage, le miroir de sortie du piège est initialement actif alors que le miroir d'entrée est inactif pour laisser un paquet d'ions pénétrer dans le piège. Une fois les ions dans le piège, le miroir d'entrée est activé. L'interaction entre le laser et le paquet d'ions a lieu à un temps choisi. Après photoexcitation, les ions qui n'ont pas fragmenté continuent à osciller dans le piège jusqu'à ce qu'un des miroirs soit désactivé et leur permette de s'échapper.

La mise sous tension et hors tension des miroirs électrostatiques crée du bruit électrique qui perturbe l'acquisition du CTNM3. Lorsqu'on pulse les tensions du piège, on utilise donc la fonction *init* du CTNM3 qui inhibe l'acquisition (cf annexe 1). Pour cela on crée un signal « veto » qui active cette fonction *init* (cf figure I.28).

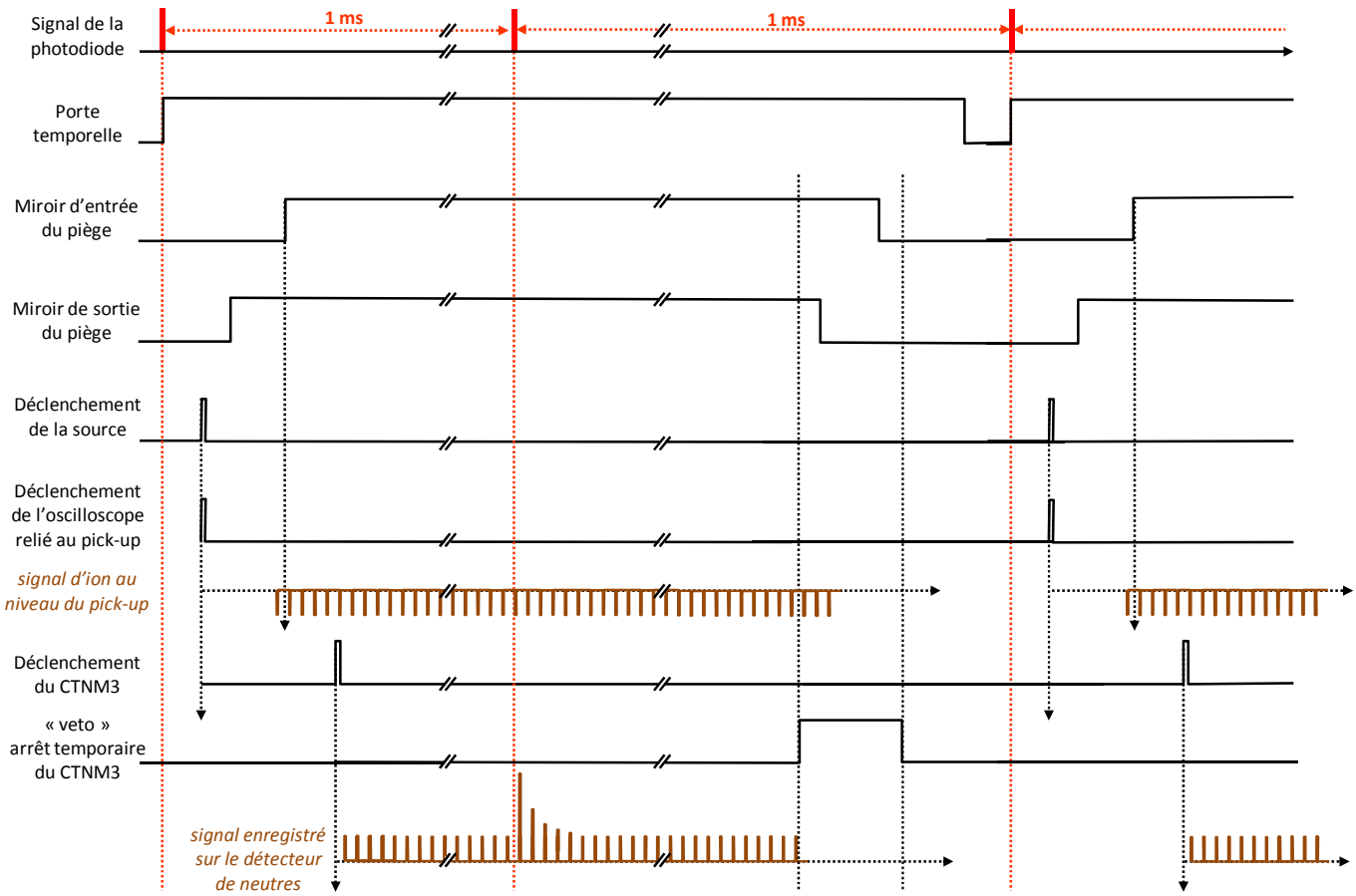


figure I.28: chronogramme d'une expérience avec le piège Zajfman pour la molécule de Trp-H$^+$

I.10 Conclusion

L'ensemble du dispositif expérimental est détaillé dans ce chapitre, de la source, qui permet de protoner des molécules d'intérêt biologique et de les mettre en phase gazeuse, jusqu'aux détecteurs, avec lesquels on enregistre les positions et les temps d'arrivée des fragments ioniques et neutres. Dans ce chapitre, nous avons présenté le principe des expériences de photofragmentation UV effectuées avec les deux zones d'interaction de notre dispositif : le piège électrostatique et la zone polarisée.

Le fonctionnement et l'analyse des résultats du piège électrostatique ont été présentés en détail. Les ions incidents (m_0) ainsi que les photofragments ioniques qui ont une masse proche de celle du parent ($m_i \geq 95/100*m_0$) peuvent être piégés. Le piège électrostatique permet de mesurer

leur temps de métastabilité sur une échelle de temps allant de la dizaine de microseconde à la seconde. Deux méthodes d'estimation de la masse du fragment ionique piégé ont été présentées dans ce chapitre.

Seuls quelques résultats obtenus avec la zone d'interaction polarisée ont été présentés. La longueur de la zone polarisée est ajustable mais mesure 13 mm pour presque toutes les expériences présentées dans cette thèse. L'interaction laser se fait à 1 mm en aval de la 1ère électrode de la zone polarisée. Un analyseur électrostatique situé en aval de la zone polarisée, à 45° par rapport au faisceau d'ions incident, permet de séparer les espèces chargées des espèces neutres. L'analyseur électrostatique discrimine les espèces chargées suivant leur énergie cinétique. Ces espèces ont des déviations différentes dans l'analyseur et donc des positions d'arrivée différentes suivant l'axe $\vec{y}_i$ de l'analyseur. Seuls les résultats obtenus sur le temps d'arrivée des fragments neutres (t_n) et la position d'arrivée des fragments ioniques (y_i) avec la zone polarisée par un **potentiel** ont été présentés dans ce premier chapitre.

Le chapitre suivant présente plus en détail le principe des expériences en coïncidences et l'analyse des résultats obtenus. Ces expériences, réalisées avec la zone polarisée, donnent accès à la dynamique de fragmentation associée à chaque canal. Les dynamiques mesurées avec la zone polarisée en **champ électrique** vont de la dizaine de nanoseconde à la microseconde.

Bibliographie

1. J.B. Fenn, *Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture).* Angewandte Chemie-International Edition, 2003. **42**(33): p. 3871-3894.
2. T.C. Rohner, N. Lion, H.H. Girault, *Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2004. **6**(12): p. 3056-3068.
3. G. Taylor, *Electrically Driven Jets.* Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences, 1969. **313**(1515): p. 453-475.
4. J. Zeleny, *The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces.* Physical Review, 1914. **3**(2): p. 69.
5. J. Zeleny, *Instability of Electrified Liquid Surfaces.* Physical Review, 1917. **10**(1): p. 1.
6. M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, *Molecular Beams of Macroions.* The Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
7. B.A. Thomson, J.V. Iribarne, P.J. Dziedzic, *Liquid ion evaporation/mass spectrometry/mass spectrometry for the detection of polar and labile molecules.* Analytical Chemistry, 1982. **54**(13): p. 2219-2224.
8. S.K. Chowdhury, V. Katta, B.T. Chait, *Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry.* Journal of the American Chemical Society, 1990. **112**(24): p. 9012-9013.
9. J.A. Loo, R.R.O. Loo, H.R. Udseth, C.G. Edmonds, R.D. Smith, *Solvent-induced conformational changes of polypeptides probed by electrospray-ionization mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1991. **5**(3): p. 101-105.
10. I.A. Kaltashov, R.R. Abzalimov, *Do Ionic Charges in ESI MS Provide Useful Information on Macromolecular Structure?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008. **19**(9): p. 1239-1246.
11. P. Kebarle, *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry.* Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(7): p. 804-817.
12. G. Taylor, *Disintegration of Water Drops in an Electric Field.* Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, 1964. **280**(1382): p. 383-397.
13. Rayleigh, *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity.* Philosophical Magazine Series 5, 1882. **14**(87): p. 184-186.
14. A. Gomez, K.Q. Tang, *Charge and Fission of Droplets in Electrostatic Sprays.* Physics of Fluids, 1994. **6**(1): p. 404-414.
15. P. Nemes, I. Marginean, A. Vertes, *Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays.* Analytical Chemistry, 2007. **79**(8): p. 3105-3116.
16. *http://www.newobjective.com/electrospray/index.html*. web page.
17. K.Q. Tang, R.D. Smith, *Theoretical prediction of charged droplet evaporation and fission in electrospray ionization.* International Journal of Mass Spectrometry, 1999. **187**: p. 97-105.

18. J.N. Smith, R.C. Flagan, J.L. Beauchamp, *Droplet evaporation and discharge dynamics in electrospray ionization.* Journal of Physical Chemistry A, 2002. **106**(42): p. 9957-9967.

19. J.V. Iribarne, B.A. Thomson, *On the evaporation of small ions from charged droplets.* The Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.

20. I.G. Loscertales, J.F. de la Mora, *Experiments on the kinetics of field evaporation of small ions from droplets.* The Journal of Chemical Physics, 1995. **103**(12): p. 5041-5060.

21. J.F. de la Mora, *Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism.* Analytica Chimica Acta, 2000. **406**(1): p. 93-104.

22. R. Grandori, *Origin of the conformation dependence of protein charge-state distributions in electrospray ionization mass spectrometry.* Journal of Mass Spectrometry, 2003. **38**(1): p. 11-15.

23. J.F. de la Mora, G.J. Van Berkel, C.G. Enke, R.B. Cole, M. Martinez-Sanchez, J.B. Fenn, *Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry - Discussion.* Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(8): p. 939-952.

24. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications,* ed. R.B. Cole. 1997, New York: John Wiley & Sons.

25. J.U. Andersen, L.H. Andersen, P. Hvelplund, A. Lapierre, S.P. Moller, S.B. Nielsen, U.V. Pedersen, S. Tomita, *Studies of clusters and biomolecules in ELISA.* Hyperfine Interactions, 2003. **146**(1-4): p. 283-291.

26. D. Zajfman, O. Heber, L. Vejby-Christensen, I. Ben-Itzhak, M. Rappaport, R. Fishman, M. Dahan, *Electrostatic bottle for long-time storage of fast ion beams.* Physical Review A, 1997. **55**(3): p. R1577.

27. M. Dahan, R. Fishman, O. Heber, M. Rappaport, N. Altstein, D. Zajfman, W.J. van der Zande, *A new type of electrostatic ion trap for storage of fast ion beams.* Review of Scientific Instruments, 1998. **69**(1): p. 76-83.

28. A. Luca, S. Schlemmer, I. Cermak, D. Gerlich, *On the combination of a linear field free trap with a time-of-flight mass spectrometer.* Review of Scientific Instruments, 2001. **72**(7): p. 2900-2908.

29. H.B. Pedersen, D. Strasser, S. Ring, O. Heber, M.L. Rappaport, Y. Rudich, I. Sagi, D. Zajfman, *Ion motion synchronization in an ion-trap resonator.* Physical Review Letters, 2001. **87**(5).

30. H.B. Pedersen, D. Strasser, B. Amarant, O. Heber, M.L. Rappaport, D. Zajfman, *Diffusion and synchronization in an ion-trap resonator.* Physical Review A, 2002. **65**(4).

31. H.B. Pedersen, D. Strasser, O. Heber, M.L. Rappaport, D. Zajfman, *Stability and loss in an ion-trap resonator.* Physical Review A, 2002. **65**(4).

32. T. Geyer, D.J. Tannor, *A mapping approach to synchronization in the 'Zajfman trap': II. The observed bunch.* Journal of Physics B-Atomic Molecular and Optical Physics, 2005. **38**(18): p. 3423-3446.

33. D. Attia, D. Strasser, O. Heber, M.L. Rappaport, D. Zajfman, *Transverse kinematics of ions stored in an electrostatic ion beam trap.* Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 2005. **547**(2-3): p. 279-286.

Annexe 1 : CTNM3

Présentation du CTNM3

Le CTNM3 est un convertisseur temps numérique multivoies développé à l'IPN d'Orsay. Il est utilisé pour coder les temps d'arrivée des signaux analogiques issus des détecteurs d'ions et de neutres, après remise en forme par des CFD. Il a une résolution temporelle équivalente à son pas de codage qui est de 250 ps. Les données codées sont envoyées vers le PC via une carte de contrôle « maison » située dans le PC. Les « contrôles » du CTNM3 sont notés en rouge sur la figure I.29.

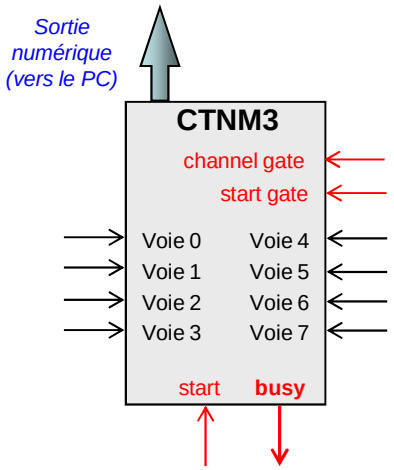


figure I.29 : Représentation schématique du CTNM3

Fonctionnement du CTNM3

On choisit manuellement (roue codeuse) une « fenêtre temporelle » (de 16 µs à 2 ms) pendant laquelle sont codés les temps des signaux reçus sur les différentes voies du CTNM3. Les 8 voies du CTNM3, numérotées de 0 à 7, sont représentées en noir sur la figure I.29. On utilise typiquement une « fenêtre temporelle » de 64 µs pour les expériences en coïncidence.

Le codage effectué par le CTNM3 est contrôlé par le PC (via la carte de contrôle) qui émet ou bloque le signal *start-gate* (signal (1) de la figure I.30). Le codage démarre lorsque le CTNM3 reçoit un signal *start* et si ce signal *start* est validé par le signal *start-gate*. Le signal *start* est généré par le GINI (signal (2) de la figure I.30). Ce signal est appelé « start CTNM3 » sur le chronogramme de la page 66.

Un signal *busy* (signal (3) de la figure I.30) est délivré par le CTNM3 pendant toute la durée du codage et ce jusqu'à ce que tous les résultats de codage aient été extraits. Ce signal est envoyé à la carte de contrôle qui bloque en retour le signal envoyé sur le *start-gate* du CTNM3 (signal (1) de la figure I.30). Cela empêche le redémarrage intempestif de toute nouvelle séquence de codage avant que les données soient envoyées au PC.

Il est possible de bloquer temporairement l'utilisation des voies du CTNM3 en bloquant le signal *channel-gate* (signal (4) de la figure I.30). Cela permet d'inhiber le CTNM3 lorsque des bruits parasites viennent fortement perturber les informations qui lui sont envoyées. Cette fonction est utilisée typiquement pour parer au bruit électrique créé par le déclenchement des commutateurs « Belke » qui activent et désactivent les miroirs du piège à ions. Le signal envoyé pour inhiber le *channel-gate* est créé par le GINI. Ce signal est appelé « veto » sur le chronogramme de la page 66.

Au fur et à mesure du codage des signaux entrant sur les voies, ces données sont envoyées à la carte de contrôle qui les transfère au PC où elles sont stockées et traitées par le programme d'acquisition (cf annexe 2).

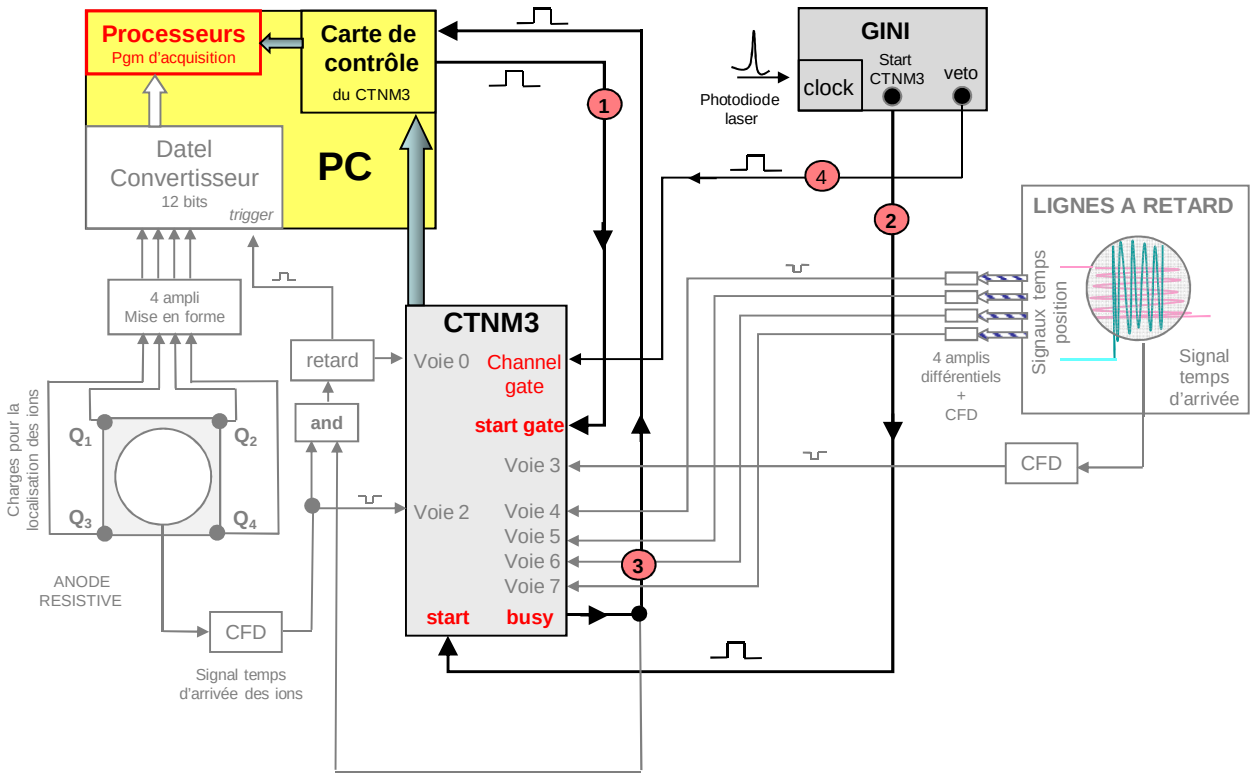


figure I.30 : Schéma électronique général du système de détection avec mise en valeur de la partie concernant les « contrôles » du CTNM3

Annexe 2 : programme d'acquisition

Les données de temps et de localisation des fragments ioniques et neutres issues des détecteurs sont transformées en signal numérique par le CTNM3 et la carte Datel puis sont prises en charge par un programme d'acquisition exécuté par le processeur du PC. Ce programme d'acquisition, écrit en C++, a été initialement développé par l'équipe pour effectuer des expériences en coïncidences de CID d'agrégats puis il a été adapté pour les expériences actuelles de photofragmentation effectuées avec un laser cadencé au kHz. Ce programme contrôle en ligne l'expérience, assure l'acquisition des données ainsi que leur stockage sur le disque dur du PC. Il intègre aussi une procédure de prétraitement des données permettant ainsi leur visualisation en temps réel.

L'affectation des ressources du PC n'est pas gérée de façon optimale par « Windows ». Un paramétrage manuel permet une meilleure affectation des ressources. Le logigramme du programme d'acquisition, représenté sur la figure I.31, est donc un cycle divisé en deux parties. Dans la première partie du cycle, on laisse « Windows » affecter lui même les ressources afin d'exécuter l'ensemble des tâches de fond de l'ordinateur. Dans la deuxième partie du cycle, les ressources sont affectées exclusivement à l'acquisition de données. A noter que lorsque l'affectation des ressources revient à « Windows », toutes les données expérimentales sortant du CTNM3 et de la carte Datel ne sont plus prises en compte par le programme d'acquisition et sont perdues. Le temps accordé à chaque partie du cycle a donc été optimisé afin de pouvoir utiliser l'ordinateur sans difficulté, en permettant à « Windows » d'exécuter les tâches de fond nécessaires, tout en perdant le moins de temps possible par rapport au temps d'acquisition.

Pour gérer les deux types d'affectation de ressources différents, on a créé un *timer* (minuteur) de période ajustable dans le programme d'acquisition. La période du *timer*, fixée ici à 20 ms, correspond au temps laissé à « Windows » pour affecter les ressources (rafraichir les fenêtres de visualisation et permettre à l'utilisateur de se servir du PC sans difficulté).

Une fois le temps du *timer* écoulé, celui-ci est arrêté et les ressources du PC sont exclusivement affectées à l'acquisition de données. L'acquisition de données fonctionne par « Pas ». Un pas d'acquisition correspond à une séquence temporelle générée par le GINI (cf § I.9). Pour les expériences en coïncidences, la durée d'un pas est de 1 ms (fréquence du laser). Un certain nombre de pas d'acquisition, noté « Pas_Max », est effectué et fixe la durée d'une « séquence d'acquisition ». Ici le nombre de pas d'acquisition est fixé à 500, ce qui correspond à une séquence d'acquisition de 500 ms. Lors de cette séquence d'acquisition, les données sont

mises dans un *buffer* (mémoire tampon ou mémoire vive) qui, lorsqu'il est rempli, les transfère sur le disque dur du PC. Une fois atteint le nombre « Pas_Max » de pas, la séquence d'acquisition est terminée. On redémarre alors le *timer* et un nouveau cycle commence.

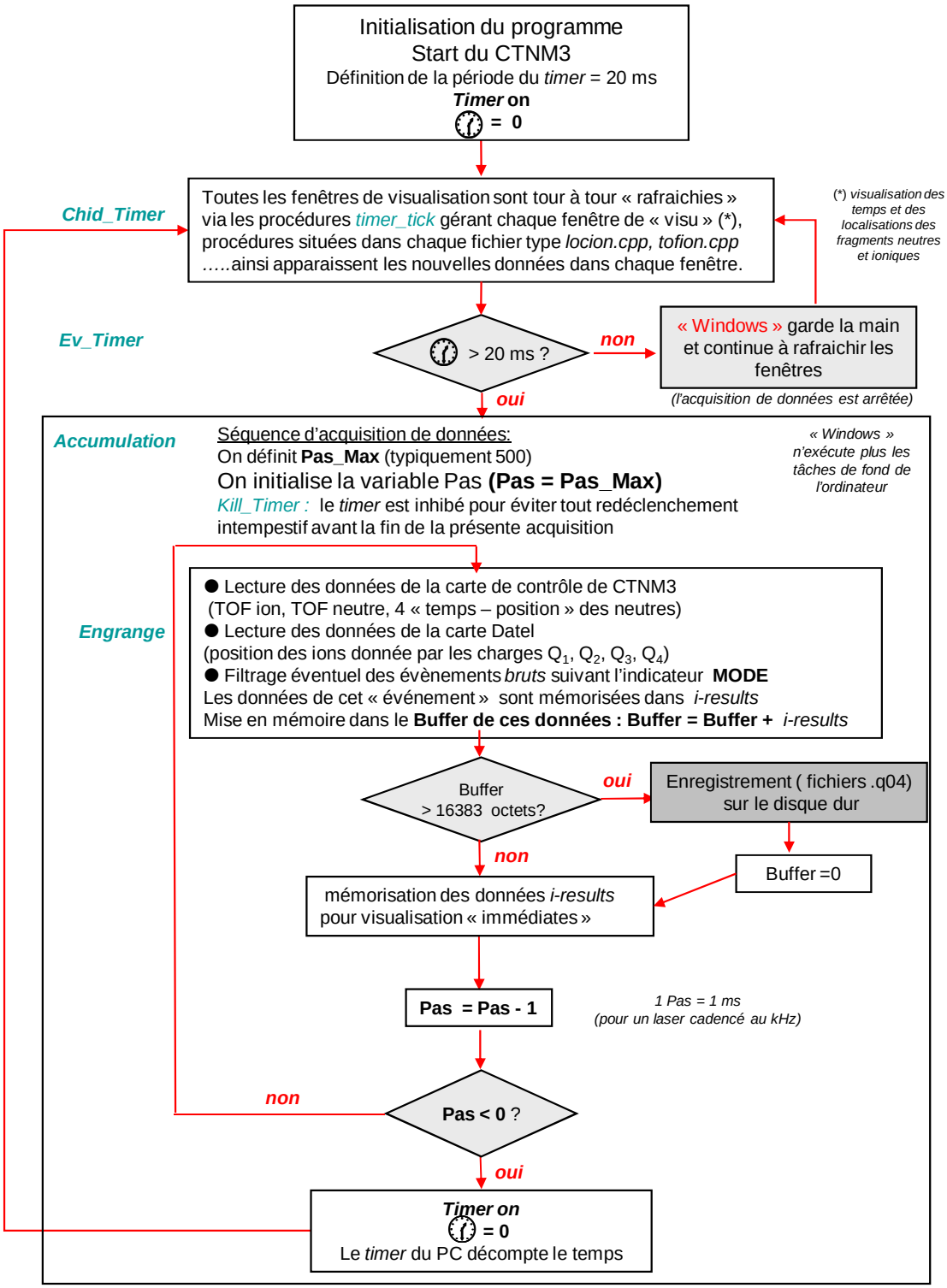


figure I.31 : Logigramme du programme d'acquisition. Les procédures utilisées sont notées en bleu sur la gauche du logigramme

CHAPITRE II

Analyse des données en coïncidence issues de la zone polarisée

CHAPITRE II. ANALYSE DES DONNÉES EN COÏNCIDENCE ISSUES DE LA ZONE POLARISÉE 79

II.1 Expériences en coïncidences 79
II.1.1 Principe des expériences réalisées 80
II.1.2 Problème des fausses coïncidences 80

II.2 Traitement : des données brutes aux observables 83

II.3 Diagrammes de corrélation 84
II.3.1 Généralités 85
II.3.2 Diagrammes $N(y_i, t_i\text{-}t_n)$ 86
II.3.3 Filtres des diagrammes bidimensionnels 89
II.3.4 Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ 89
II.3.5 Compétition entre photofragmentation et collision 92

II.4 Programme de simulation 94

II.5 Mesure des temps de fragmentation 95
II.5.1 Principe des expériences de fragmentation dans un champ électrique 96
II.5.2 Mesure des constantes de temps 99
II.5.3 Elargissement temporel des pics 100
II.5.4 Modélisation des données expérimentales 101

II.6 Traitement des mécanismes séquentiels 104
II.6.1 Généralités 104
II.6.2 Cas $\tau_1 \ll \tau_2$, séparation temporelle des fragments neutres 106
II.6.3 Cas où les deux fragmentations τ_1 et τ_2 sont rapides (< 100 ns), analyse des fragments neutres suivant leurs déviations relatives 113

II.7 Conclusion 119

Bibliographie 120

Annexe 1 121

Annexe 2 125

CHAPITRE II. ANALYSE DES DONNÉES EN COÏNCIDENCE ISSUES DE LA ZONE POLARISÉE

Dans ce chapitre nous traitons de l'analyse des données expérimentales obtenues lorsque l'interaction du faisceau incident avec le laser a lieu dans la zone polarisée. Ce deuxième chapitre résume toutes les techniques d'analyse développées et approfondies durant ma thèse.

Le principe des expériences « en coïncidence » effectuées avec notre dispositif est présenté dans le § II.1. Certaines données temporelles et spatiales enregistrées pour des fragments ioniques et neutres ne sont pas issues de particules détectées en coïncidences. C'est pourquoi on effectue un tri des données afin de regrouper toutes celles associées à un même évènement (§ II.2). Lorsqu'on corrèle deux à deux les observables issues du même évènement, on peut obtenir d'importantes informations sur la dynamique de fragmentation du système étudié (§ II.3). Nous avons développé un programme de simulation qui reproduit fidèlement les données expérimentales et permet d'interpréter rapidement ces diagrammes de corrélation (§ II.4).

La zone d'interaction polarisée permet de mesurer précisément, sur une échelle de temps allant de la dizaine de nanosecondes à la microseconde, le temps de fragmentation associé à chaque canal de fragmentation et de différencier les fragmentations qui se produisent en une étape (mécanisme direct) de celles produites en plusieurs étapes (mécanisme séquentiel). Ces temps de fragmentation peuvent être, soit estimés avec le programme de simulation, soit modélisés de façon analytique (§ II.5). Ce chapitre se termine en exposant le traitement de deux types de mécanismes séquentiels (§ II.6). Dans cette dernière partie nous discutons des limites de notre analyse de données en ce qui concerne le traitement des mécanismes séquentiels.

II.1 Expériences en coïncidences

Un « évènement physique » correspond à la dissociation d'une molécule selon un canal de fragmentation particulier. Comme nous étudions la dissociation de molécules simplement chargées, pour chaque événement, un fragment ionique est associé à un ou plusieurs fragments neutres. Un canal de fragmentation est donc identifié par son fragment ionique.

II.1.1 Principe des expériences réalisées

La connaissance du nombre de fragments neutres associés à chaque évènement nous permet d'avancer dans la compréhension du mécanisme de fragmentation mis en jeu pour chaque canal de fragmentation. S'il s'agit d'une fragmentation directe, en une étape, en pratique un seul neutre est produit[3]. Deux neutres (ou plus) sont émis dans le cas d'une fragmentation séquentielle, en plusieurs étapes. L'identification des fragments neutres émis et la connaissance de leur ordre d'arrivée permet de définir la nature et l'ordre des étapes d'un mécanisme séquentiel.

Pour une molécule donnée, on étudie chaque canal de fragmentation l'un après l'autre. Le champ électrique appliqué sur l'analyseur électrostatique est choisi pour sélectionner un fragment ionique donné et donc étudier un canal de fragmentation particulier. Seuls les ions de ce canal sont collectés sur le détecteur d'ions alors que le détecteur de neutres situé dans l'axe du faisceau incident reçoit les fragments neutres correspondant à tous les canaux de fragmentation. La méthode des coïncidences nous permet d'associer à chaque fragment ionique son ou ses fragments neutres issus du même évènement.

II.1.2 Problème des fausses coïncidences

Plusieurs « évènements physiques » peuvent se produire durant une même impulsion laser, de sorte qu'il se peut que l'on associe, par erreur, en tant qu'« évènement physique », un fragment ionique d'un premier évènement avec un fragment neutre d'un second événement. On appelle cela un faux événement ou fausse coïncidence puisque les deux fragments proviennent de deux molécules différentes.

Des évènements sont validés comme coïncidences si deux particules (ou plus), un ion et un (ou plusieurs) neutre(s), arrivent sur leurs détecteurs respectifs avec une différence de temps de vol (t_i - t_n) correspondant à la différence des temps de parcours d'un fragment ionique et d'un fragment neutre issus d'un même évènement (de l'ordre de 0 à 4 µs). Comme la largeur temporelle des impulsions laser est de 200 ns, plusieurs évènements de photofragmentation produits par une même impulsion laser peuvent arriver dans la même fenêtre temporelle. Le détecteur de neutres permet d'enregistrer plusieurs neutres si leur différence de temps d'arrivée est supérieure à 40 ns. Ces neutres peuvent donc provenir d'évènements différents. Il faut donc

[3] On n'a jamais observé une émission **simultanée** de plus de deux fragments (1 ion et plusieurs neutre) tel que cela se produit dans une explosion coulombienne.

s'assurer que pour chaque impulsion laser, on n'enregistre que les données issues de vraies coïncidences. Pour cela il faut qu'il n'y ait pas plus d'une molécule fragmentée par impulsion laser.

Si l'efficacité de détection était de 1 pour les détecteurs d'ions et de neutres, il suffirait d'avoir un taux de comptage légèrement inférieur à 1 ion / impulsion laser pour n'obtenir que des vraies coïncidences. Mais l'efficacité est de l'ordre de 30% pour le détecteur d'ions, notée ξ_i et de 20% pour le détecteur de neutres, notée ξ_n. L'efficacité de détecter un évènement en coïncidence, égale au produit de ξ_i par ξ_n, est donc de 6%. Le tableau II.1 résume les différents types d'évènements que l'on peut détecter : sans coïncidences (94%) ou avec des coïncidences (6%) vraies ou fausses.

Ion détecté	Neutre détecté	Type de coïncidence
Ion (a)	-	-
-	Neutre (a)	-
-	Neutre (x)	-
Ion (a)	Neutre (x)	Fausse coïncidence
Ion (a)	Neutre (a)	**Vraie coïncidence**

tableau II.1: Particules détectées dont l'évènement associé est indiqué entre parenthèses (x ≠ a) et type de coïncidence qui en résulte

Plus l'efficacité de détection est grande, plus le nombre moyen d'évènements par impulsion laser toléré pour garantir un nombre négligeable de fausses coïncidences est grand. Un calcul quantitatif a été effectué par Stert *et al* [1] en tenant compte des efficacité de deux détecteurs, du nombre et du nombre moyen d'évènements par impulsion laser. Valéria Lepère [2] a repris dans sa thèse les expressions analytiques de l'article de Stert [1] et a calculé le nombre moyen d'évènements par impulsion laser ainsi que les efficacités des deux détecteurs utilisés sur notre dispositif, connaissant le nombre total d'ions, de neutres et de coïncidences détectées, normalisés en fonction du temps d'acquisition et de la puissance du laser. A partir de ces données, V. Lepère a pu déterminer les probabilités de vraies et de fausses coïncidences en fonction du nombre moyen d'évènements et ce, dans le cas de la photofragmentation d'agrégats d'Argon. Ces probabilités ont été calculées en considérant une même efficacité de 30% pour les détecteurs d'ions et de neutres. Les résultats sont présentés à la figure II.1

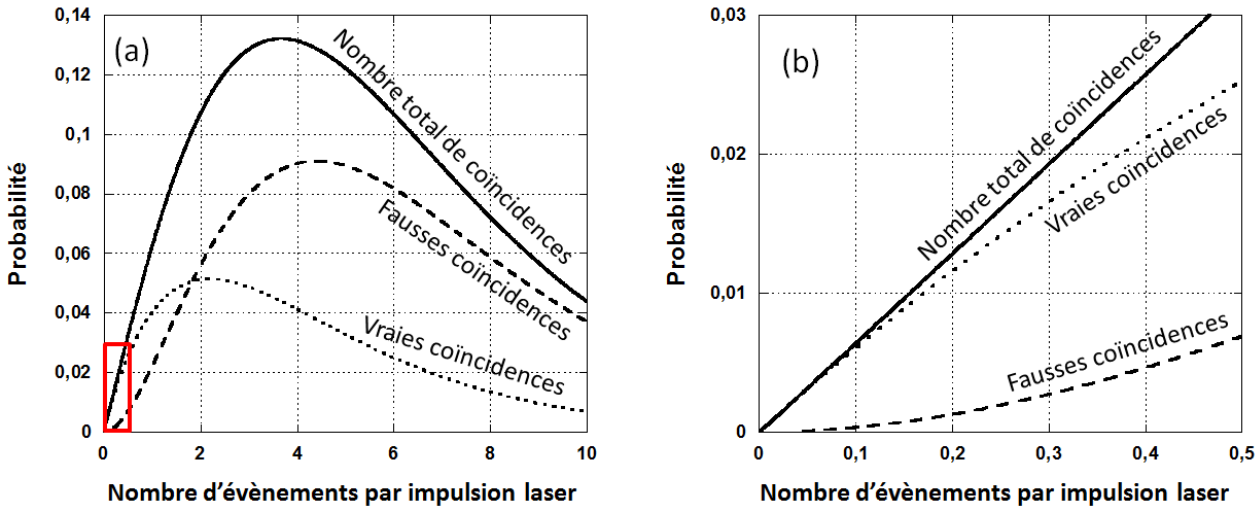


figure II.1 (issue de la référence [2]) : Probabilité de coïncidences en fonction du nombre d'évènements par impulsion laser. Trait plein : probabilité totale. Traits pointillés : vraies coïncidences. Tirets : fausses coïncidences. Graphique (b) : zoom de la partie du graphique (a) encadrée en rouge.

Sur le graphique (b) de la figure II.1, on voit que le taux de fausses coïncidences est négligeable pour un nombre d'évènements par impulsion laser inférieur à 0,2. Expérimentalement, on s'assure qu'il ne se produit qu'un nombre réduit, disons 0,1 à. 0,2 fragmentation par impulsion laser. Ceci est généralement obtenu en réduisant la puissance laser et éventuellement l'intensité du faisceau d'ions. Le laser est pulsé à 1 kHz, on travaille donc avec un taux de comptage de l'ordre de 100 particules neutres détectées par seconde sur l'ensemble des voies de fragmentation pour que les fausses coïncidences soient négligeables.

Le nombre d'ions N_i détectés sans coïncidence peut varier de 5 et 50 par seconde, suivant le système étudié, le nombre de canaux de fragmentation et leur intensité relative. Le nombre d'évènements en coïncidence, N_{ic} ou N_{nc}, est donc égal à $N_i*\xi_n$, soit 1 à 10 évènements par seconde. Pour avoir une statistique suffisante il est nécessaire d'enregistrer plusieurs millions d'évènements, soit un temps d'accumulation typique allant de quelques heures à plus de 12 heures pour chaque canal de fragmentation étudié.

II.2 Traitement : des données brutes aux observables

Pour chaque impulsion laser, on enregistre les informations temporelles et spatiales de toutes les particules détectées. Ces informations sont appelées « données brutes ». La carte DATEL code les quantités de charges collectées aux quatre coins de l'anode résistive du détecteur d'ions, ce qui permet de déterminer les positions y_i et z_i du fragment ionique sur le détecteur. Le CTNM3 code les informations sur le temps d'arrivée des ions, celui des neutres et les quatre signaux « temps-positions » qui permettent de déterminer les positions y_n et z_n des fragments neutres. Pour transcrire et valider les données brutes dans un format acceptable par le programme de traitement, on utilise le programme « moulinette ». Que fait exactement ce programme « moulinette » ? Il permet de valider les données brutes par un prétraitement de la même façon que le programme de visualisation en temps réel décrit au chapitre précédent. Les temps d'arrivée t_i, t_n ainsi que les positions d'arrivées y_i, z_i, y_n, z_n sont calculés. Seules sont conservées les données des particules dont toutes les informations spatiales et temporelles (y, z, t) sont complètes. Une vérification est effectuée pour voir si chaque ensemble de données (y, z, t) se rapporte bien à la même particule. Ces données ainsi traitées constituent les « évènements bruts » et contiennent de nombreux évènements sans coïncidence (cf tableau II.1). Une vérification est donc effectuée sur la différence de temps de vol $t_i - t_n$ afin de déterminer si elle correspond ou pas à la réalité physique de l'évènement. Les positions sont codées sur 12 bits (4096 pixels). Les temps d'arrivée sont également codés en 12 bits avec une résolution de 256 ps.

Les données brutes t_i, y_i, z_i, t_n, y_n, z_n, validées par le programme « moulinette » deviennent des observables qui sont ensuite analysées à l'aide du programme de traitement « proprement dit ». Ce programme permet de traiter les données enregistrées soit sans coïncidences, soit avec des coïncidences simples (1 ion – 1 neutre) ou multiples (1 ion – plusieurs neutres), ces dernières étant utilisées uniquement dans le cas de mécanismes séquentiels. Le traitement en multi-coïncidence est généralement limité à la détection de deux fragments neutres en coïncidence avec un fragment ionique. Le traitement des multicoïncidences effectuées avec un ion et plus de deux neutres est plus délicat à cause de l'efficacité réduite du détecteur de neutres.

On peut traiter un mécanisme séquentiel en simple ou en multicoïncidence. Dans le cas de coïncidences simples, le programme de traitement ne tient compte que du premier fragment neutre détecté (partie grisée du tableau II.2). Dû à l'efficacité de détection, le premier neutre détecté n'est pas toujours le premier émis. L'énergie relative de fragmentation peut entraîner une inversion de l'ordre d'arrivée des fragments neutres par rapport à leur ordre d'émission. Dans le cas de

multicoïncidences, le 1er neutre émis peut donc être détecté en 2ème (partie hachurée du tableau II.2)

Ion détecté	1er neutre détecté	2e neutre détecté
i	-	-
-	n	-
i	n_1	-
i	n_2	-
i	n_1	n_2
i	n_2	n_1

tableau II.2 : Fragmentation séquentielle : soit i l'ion final détecté, n_1 le premier neutre émis et n_2 le deuxième neutre émis. Les particules en grisé définissent les observables corrélées en simple coïncidence, celles hachurées définissent les observables corrélées en multicoïncidence.

Avec le programme de traitement, chaque observable peut être présentée sous forme d'histogramme (diagramme monodimensionnel) ou être corrélée à une autre observable et présentée sous forme de diagramme bidimensionnel[4]. On recherche alors les corrélations entre observables les plus pertinentes et les plus aptes à identifier les mécanismes de fragmentation.

II.3 Diagrammes de corrélation

Après avoir défini l'intérêt des corrélations, cette partie détaille en particulier deux types de corrélation : les corrélations (y_i, $t_i - t_n$) et (z_i / t_i , z_n / t_n), particulièrement utiles dans le traitement des données expérimentales. Pour analyser les diagrammes de corrélation, on utilise des filtres pour éliminer les évènements indésirables mais on ne peut pas filtrer les fragments induits par collision avec le gaz résiduel qui se superposent aux photofragments.

[4] Remarque : pour un traitement sans coïncidences, on ne peut corréler que les observables se rapportant à une seule particule, alors que pour un traitement où on a sélectionné les évènements en coïncidence, on peut corréler les différentes observables des particules issues d'un même évènement.

II.3.1 Généralités

Sans corrélation, certains histogrammes peuvent nous apporter des informations. Dans le chapitre précédent nous avons vu que la position y_i des ions permet de connaître l'énergie du fragment ionique détecté et de déterminer sa masse (cf figure II.2.b). Les histogrammes des observables y_i et t_n permettent de bien discriminer les molécules qui ont fragmenté à l'intérieur de la zone polarisée de celles qui ont fragmenté à l'extérieur, après avoir quitté la zone polarisée (figure II.2, diagrammes b. et d.) alors que cette discrimination est moins bien résolue avec l'observable t_i (diagramme a.). Cependant, les histogrammes des observables t_n, y_i et t_i peuvent devenir difficilement exploitables quand les composantes « intérieur » et « extérieur » de différents canaux de fragmentations se superposent comme dans le cas de la figure II.2.

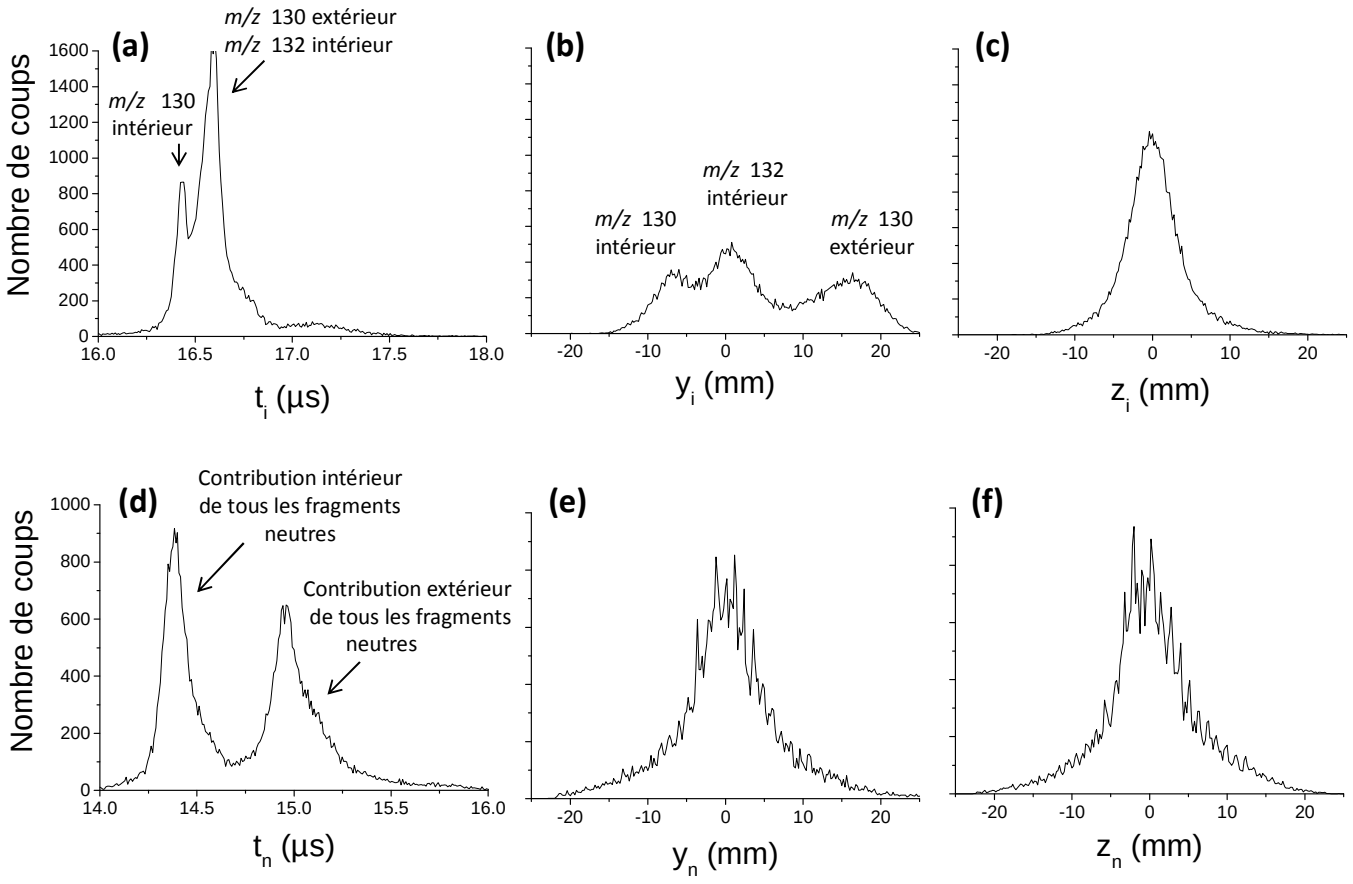


figure II.2 : Diagrammes monodimensionnels t_i, y_i, z_i, t_n, y_n et z_n traités en coïncidence, enregistrés pour les canaux m/z 130 et m/z 132 de la molécule de Tryptophane-H^+ (m/z 205)

Sur la figure II.2, les observables y_n, z_n et z_i montrent des contributions identiques, centrées par rapport à l'axe du faisceau incident. Cela indique uniquement la présence d'une distribution cylindrique des fragments ioniques sur l'axe $\vec{y}_i$ et neutres sur les axes $\vec{y}_n$ et $\vec{z}_n$.

Pour obtenir plus d'informations sur les mécanismes de fragmentation et lever le problème d'intrication de voies de fragmentation (figure II.2), on construit des diagrammes bidimensionnels à partir des différentes observables mises à notre disposition. Les observables les plus pertinentes α et β choisies parmi (t_i, y_i, z_i, t_n, y_n, z_n) ou parmi une combinaison de plusieurs observables (exemple : $t_i - t_n$ ou z_i / t_i) sont corrélées. Cela permet de construire un diagramme à 3 dimensions N(α, β) constitué d'une distribution de N points de coordonnées (α, β) où N est le nombre d'évènements enregistrés lors d'une acquisition. Ce diagramme N(α, β) est représenté avec une échelle de couleurs codant l'intensité de la carte.

II.3.2 Diagrammes $N(y_i, t_i\text{-}t_n)$

Reprenons l'exemple de la figure II.2. En effectuant des corrélations (y_i, t_i) ou (y_i, t_n) on sépare aisément, sur un même diagramme, les différentes masses ainsi que les contributions « intérieur » et « extérieur », comme montré sur la figure II.3.

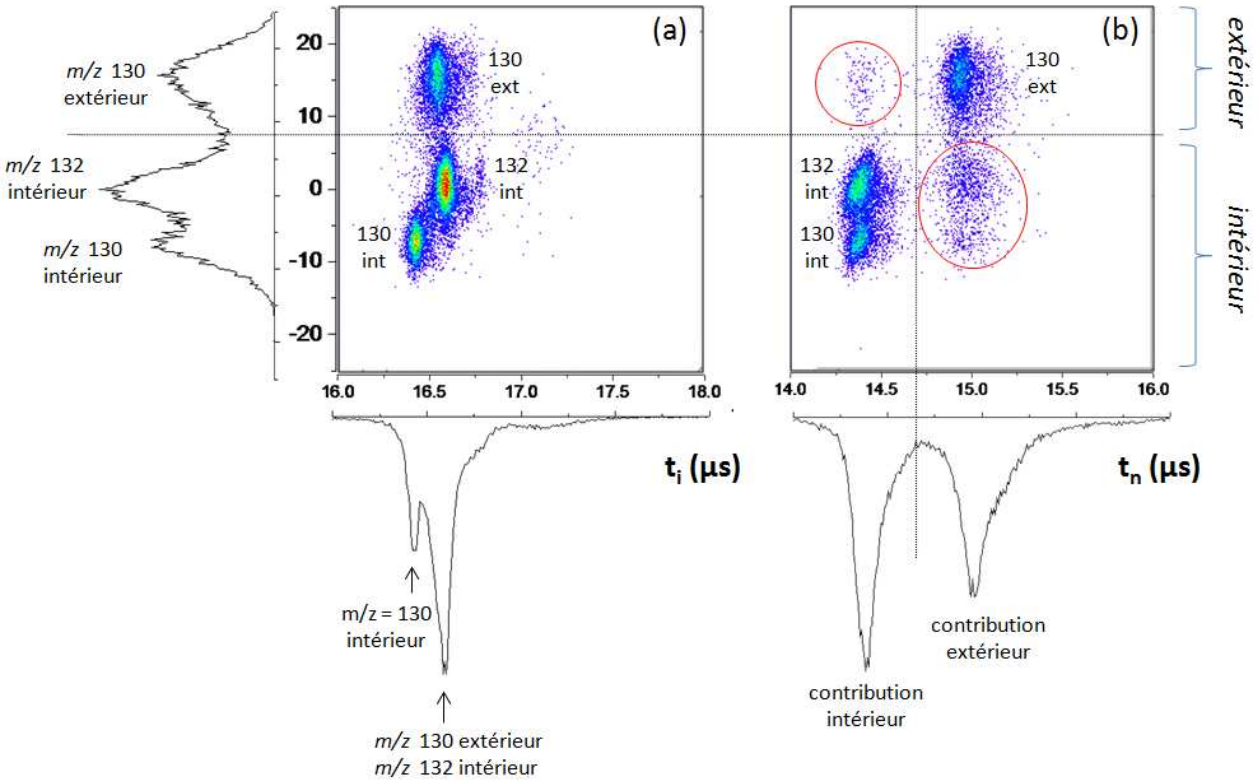


figure II.3 : Diagrammes bidimensionnels $N(y_i, t_i)$ et $N(y_i, t_n)$. Des traits pointillés indiquent la séparation des zones correspondant aux fragmentations produites à l'intérieur et aux fragmentations produites à l'extérieur. Les cercles rouges indiquent des évènements correspondants à des fausses coïncidences

La largeur des contributions observées (Δy_i = 7 à 8 mm, soit ΔE_i = 40 à 50 eV ; et Δt_n = 150 à 200 ns) est due (cf annexe 2) :

- au temps de diffusion des fragments lié à leur énergie cinétique relative (KER),
- à la largeur temporelle de l'interaction entre les ions et l'impulsion laser (200 ns),
- à la largeur spatiale du point focal du faisceau laser et
- à la distribution en vitesse du faisceau incident.

Le temps t_i possède une résolution inférieure à 200 ns. Ceci est du à l'effet réflectron de l'analyseur qui permet de compenser en temps la dispersion du à la diffusion des fragments (KER). Sur la figure II.3, on peut comparer la largeur temporelle des histogrammes en t_n à celle des histogrammes en t_i.

L'impulsion laser sert d'horloge à l'expérience. Par rapport à ce signal d'horloge, les ions interagissent avec les photons UV pendant un laps de temps $\Delta\tau$ défini par le recouvrement entre l'impulsion laser et le paquet d'ions. Il existe donc une incertitude $\Delta\tau$ entre le temps t = 0 (défini par l'arrivée d'une impulsion laser sur la photodiode) et l'instant où les ions, différemment répartis dans le paquet d'ions, traversent la zone d'interaction-laser. Par voie de conséquence, cette incertitude $\Delta\tau$ se retrouve sur les temps de vol t_i et t_n mesurés.

Notons que la largeur des signaux des temps de vol t_i et t_n est plus petite que la durée de l'impulsion laser. Ceci indique que le paquet d'ions est plus fin temporellement que l'impulsion laser de 200 ns. Cependant nous n'avons jamais mesuré la durée du paquet d'ions dans cette zone de l'expérience. Pour cela, il faudrait, soit placer une galette à micro-canaux, soit disposer d'un laser de durée d'impulsion plus courte. Le paquet d'ions mesure quelques dizaines de ns en début d'expérience et est élargi le long de son trajet jusqu'aux détecteurs, dû à la dispersion en énergie.

L'incertitude $\Delta\tau$ que nous avons évoquée précédemment peut néanmoins être supprimée grâce aux coïncidences. En effet, les temps de vol t_i et t_n des fragments ionique et neutre, issus d'un même événement, sont tous les deux définis par rapport au même signal de déclenchement de la photodiode. Ces deux temps de vol issus du même évènement présentent donc la même valeur pour cette incertitude $\Delta\tau$ que l'on peut éliminer par la soustraction $t_i - t_n$. On crée ainsi une nouvelle observable ($t_i - t_n$), plus précise que t_i ou que t_n lorsqu'elle est corrélée à y_i. En effet, le diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ permet de séparer plus finement les différentes contributions et masses

observées comme montré sur la figure II.4. Sur ce diagramme on identifie même la présence d'un fragment ionique *m/z* 131 de faible intensité qui n'était pas visible sur les diagrammes $N(y_i, t_i)$ et $N(y_i, t_n)$ de la figure II.3.

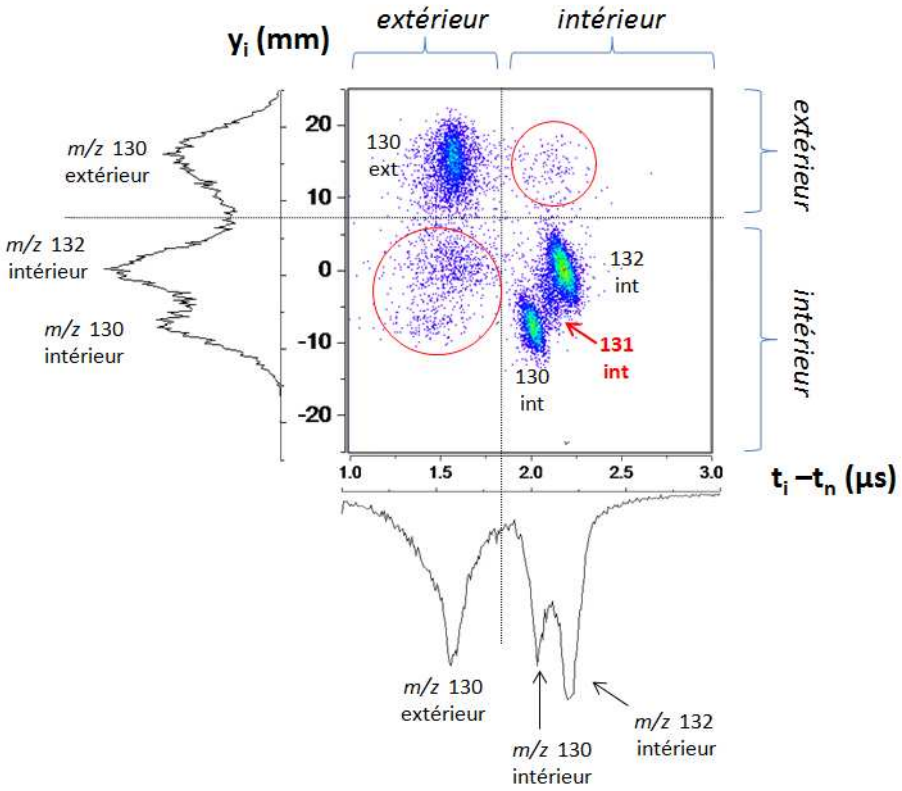


figure II.4 : diagramme bidimensionnel[5] $N(y_i, t_i - t_n)$. Les cercles rouges indiquent des évènements correspondants à des fausses coïncidences

Malgré les précautions expérimentales prises pour minimiser les fausses coïncidences, toutes ne sont pas éliminées. Sur les diagrammes de la figure II.3.b et de la figure II.4, de faibles tâches diffuses, encerclées en rouge, sont observées. Elles correspondent à des évènements où les fragments ioniques sont produits à l'intérieur de la zone polarisée et les fragments neutres à l'extérieur, ainsi qu'à des évènements où les fragments ioniques sont produits à l'extérieur et les fragments neutres à l'intérieur. Ces points, correspondent à des fausses coïncidences. L'intensité de ces motifs nous permet de vérifier le taux de fausses coïncidences dans nos enregistrements.

[5] Remarque : sur les diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$, les contributions « extérieur » se trouvent aux plus grandes valeurs de t_i-t_n (évolution inverse de celle du temps de vol des neutres t_n)

II.3.3 Filtres des diagrammes bidimensionnels

Sur un diagramme de corrélation, chaque point correspond à un évènement. Il est possible de filtrer une partie des évènements pour ne garder que la contribution qui nous intéresse. Sur la figure suivante on a sélectionné deux contributions différentes sur le diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$. Pour chacune de ces familles d'évènements (figure II.5.a et c), nous avons représenté le diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ associé (figure II.5.b. et d). Ces deux diagrammes ont des structures différentes qui indiquent la présence de deux mécanismes différents.

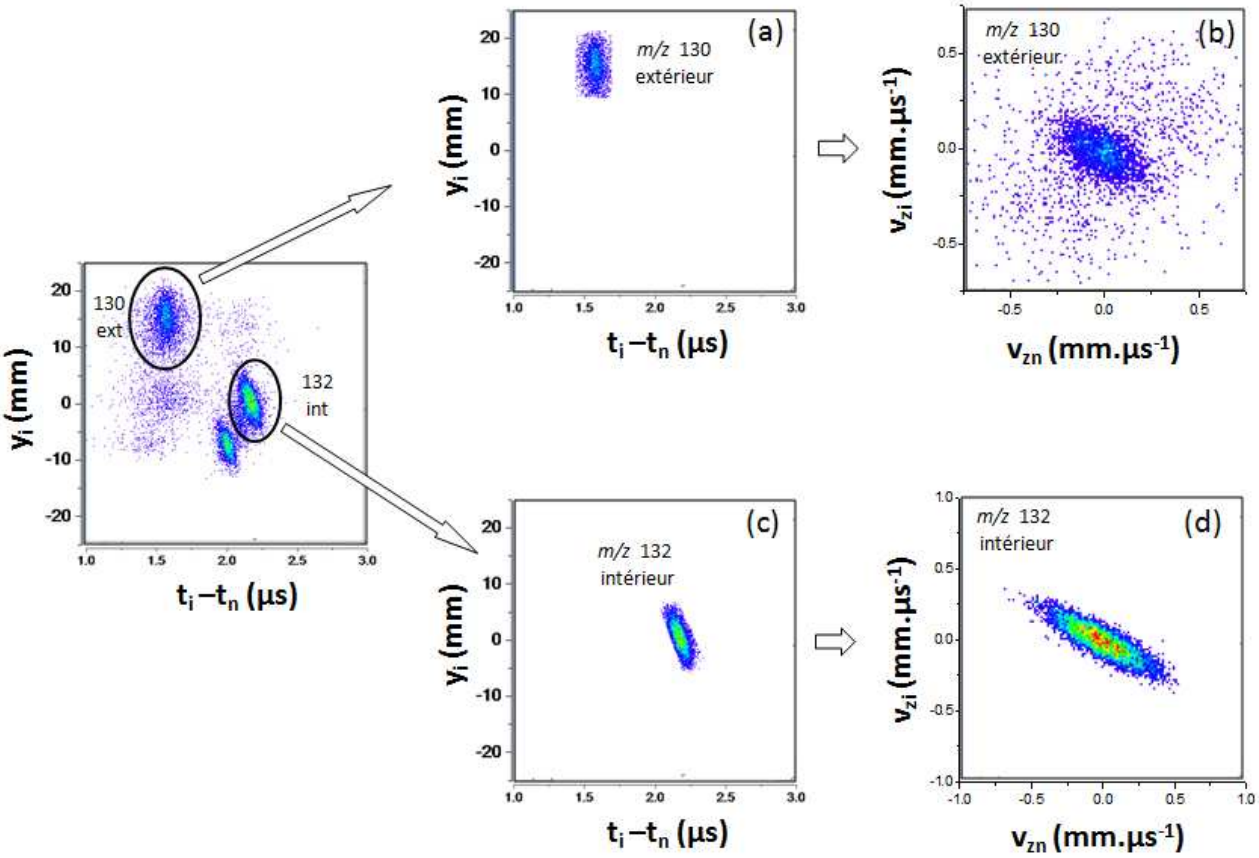


figure II.5 : Filtres en $N(y_i, t_i - t_n)$ au niveau des contributions m/z 130 extérieur (a) et m/z 132 intérieur (b) et diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ correspondants (c. et d. respectivement).

II.3.4 Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$

Considérons la fragmentation binaire d'une molécule donnant un fragment ionique et un fragment neutre de masses respectives m_i et m_n. Ces fragments sont émis avec des vitesses $\overrightarrow{v_i}$ et $\overrightarrow{v_n}$ dans le référentiel du centre de masse. D'après la conservation de la quantité de mouvement appliquée dans le centre de masse de la molécule :

$$m_i\vec{v_i} + m_n\vec{v_n} = \vec{0} \qquad \text{(II.1)}$$

La composante horizontale de la trajectoire des ions (y_i) est modifiée par le champ électrique de l'analyseur électrostatique, tandis que sa composante verticale (z_i) n'est soumise à aucun champ électrique. L'expression (II.1), appliquée à notre expérience, peut donc être projetée sur l'axe $\vec{z}$ et se réduit alors à l'expression $m_i v_{zi} + m_n v_{zn} = 0$, dans laquelle v_{zi} et v_{zn} sont la projection sur l'axe $\vec{z}$ des vecteurs vitesse d'un ion et d'un neutre détectés en coïncidence.

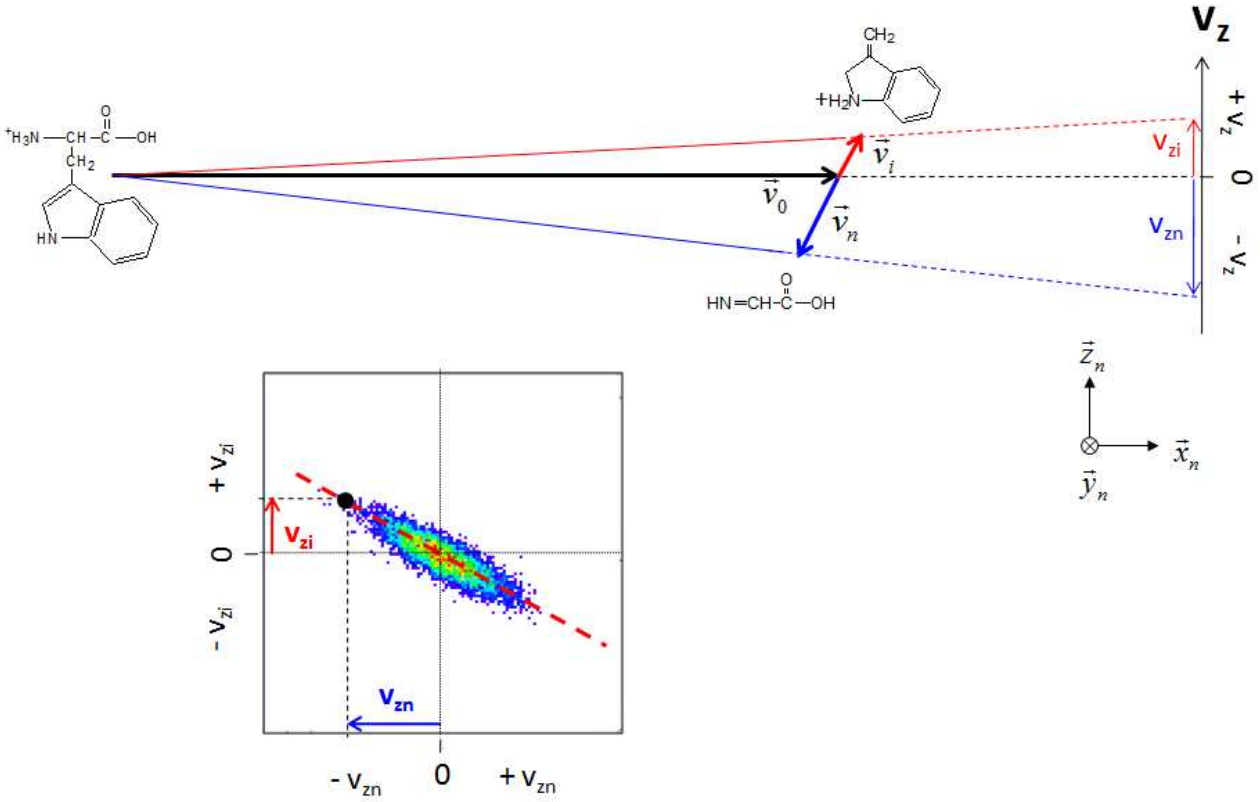


figure II.6 : Conservation de la quantité de mouvement dans le référentiel de la molécule dans le cas d'une fragmentation binaire et diagramme N(v_{zi}, v_{zn}) correspondant.

A partir des observables z_i, z_n, t_i et t_n, enregistrées en coïncidence, on obtient de nouvelles observables $v_{zi} = z_i / t_i$ et $v_{zn} = z_n / t_n$ que l'on peut corréler comme montré sur la figure II.6. Pour une fragmentation binaire, les points expérimentaux traduisent une relation linéaire entre v_{zi} et v_{zn} et s'alignent sur une droite dont la pente R traduit le rapport des masses des deux fragments ionique et neutre émis.

$$R = \frac{v_{zi}}{v_{zn}} = -\frac{m_n}{m_i} \qquad \text{(II.2)}$$

Les points expérimentaux forment une ellipse dont les extrémités correspondent aux évènements pour lesquels les fragments sont émis le long de l'axe z avec un maximum d'énergie

cinétique relative. Tandis que la partie centrale du diagramme correspond aux évènements qui se passent dans le plan de l'expérience (z = 0).

Nous connaissons la masse m_0 de l'ion parent et nous déduisons la masse m_i du fragment ionique, à partir de sa position d'arrivée y_i sur le détecteur d'ions, compte tenu de la tension choisie pour l'analyseur. Dans le cas d'une fragmentation binaire, nous connaissons donc déjà la masse du fragment neutre complémentaire au fragment ionique détecté : $m_n = m_0 - m_i$. La pente R d'un diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$, sur laquelle sont alignés les points expérimentaux, permet, connaissant la masse de m_i de l'ion détecté, de confirmer s'il s'agit d'une fragmentation binaire ou séquentielle par vérification de la masse m_n :

$$\text{(II.3)} \qquad m_n = -Rm_i$$

Si les points ne s'alignent pas sur une droite (figure II.7) ou si la pente obtenue ne traduit pas le rapport des masses attendu, c'est qu'il ne s'agit pas d'un mécanisme direct. Un autre type de mécanisme (séquentiel) doit être recherché.

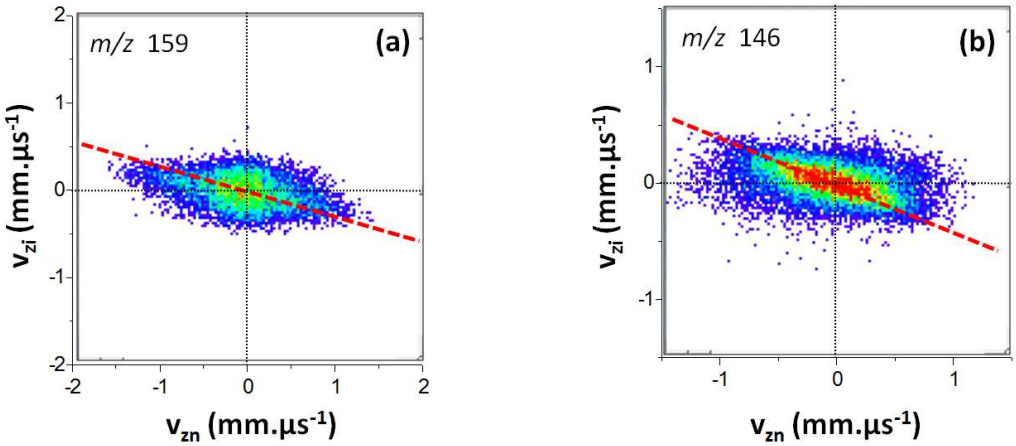


figure II.7 : Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ enregistrés pour l'ion m/z 159 (a) et l'ion m/z 146 (b) de la molécule de Tryptophane-H^+ (m/z 205). Le trait rouge en pointillé correspond au rapport des masses m_n / m_i dans le cas d'une fragmentation binaire.

II.3.4.1 Modélisation de la pente d'un diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$

Pour estimer les pentes des diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ à partir des résultats expérimentaux, nous avons développé un programme de calcul d'axes d'inertie. Le principe est d'assimiler la distribution de points comme une distribution de masse, chaque point ayant une masse unité. Chercher la droite autour de laquelle s'aligne cette distribution de points revient à chercher les

axes d'inertie de la distribution de masse correspondante. Comme l'image est pixélisée, la masse N_j associée à chaque pixel correspond au nombre de points à l'intérieur de chaque pixel.

On exprime la matrice d'inertie par rapport au centre de masse de coordonnée (X_0,Y_0):

$$\text{(II.4)} \qquad \begin{bmatrix} \sum_j N_j(Y_j - Y_0)^2 & -\sum_j N_j(X_j - X_0)(Y_j - Y_0) \\ -\sum_j N_j(X_j - X_0)(Y_j - Y_0) & \sum_j N_j(X_j - X_0)^2 \end{bmatrix}$$

En diagonalisant la matrice d'inertie, on trouve ses valeurs propres qui permettent d'exprimer les coordonnées des vecteurs propres $\overrightarrow{u_1}\,(x_1, y_1)$ et $\overrightarrow{u_2}\,(x_2, y_2)$ orthogonaux à la matrice diagonale. Le rapport y_i / x_i des coordonnées du vecteur propre associé à la valeur propre la plus grande, nous donne la pente R de l'axe d'inertie.

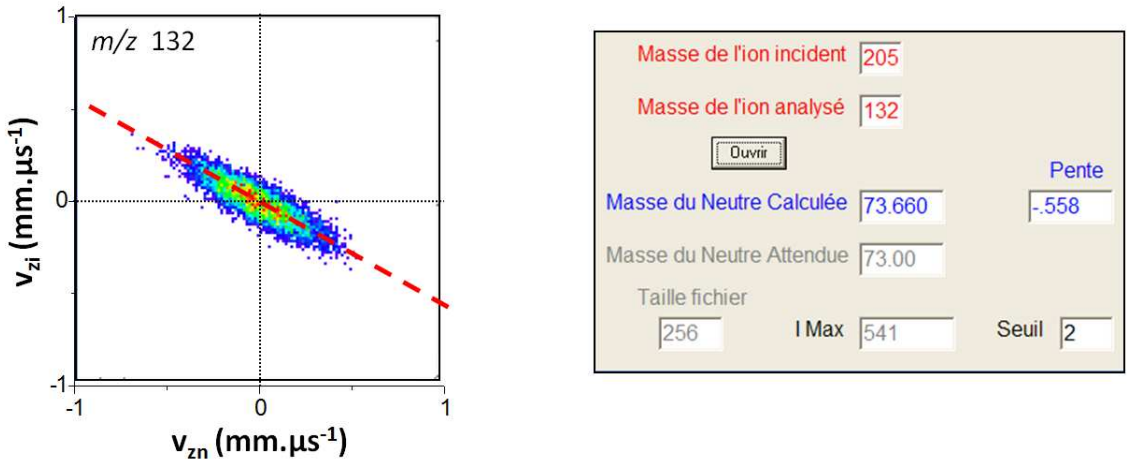


figure II.8 : Exemple d'une mesure de fit de pente (fragmentation directe et séquentielle)

Ce programme de modélisation nous donne une estimation de la valeur de la pente d'un diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ à environ 3% près.

II.3.5 Compétition entre photofragmentation et collision

Suivant la nature du système étudié, pour certains canaux de fragmentation, des évènements dus aux collisions avec le gaz résiduel peuvent se superposer aux évènements de photofragmentation. Les collisions induisent de vraies coïncidences : on détecte des fragments ionique et neutre issus de la même molécule. Par rapport au signal de photofragmentation, le signal de collision est plus diffus spatialement car il implique un transfert d'impulsion entre le gaz

résiduel et un constituant de la molécule. Le centre de gravité du système collisionnel est dévié. Ceci se traduit par un diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ qui présente un motif de symétrie cylindrique.

Le nombre de collisions par unité de temps dN_c/dt, dépend de l'intensité I_0 du faisceau incident, de la section efficace de collision σ, de la densité de gaz résiduel n/V dans l'enceinte de volume V et de la longueur ℓ de la zone d'interaction.

$$\text{(II.5)} \qquad \frac{dN_c}{dt} = I_0\, \sigma\, \frac{n}{V}\, \ell$$

D'après la loi des gaz parfaits appliquée au gaz résiduel, $n/V = P/(k_B T)$ où P est la pression du gaz présent à la température T et k_B, la constante de Boltzmann.

$$\text{(II.6)} \qquad \frac{dN_c}{dt} = I_0\, \sigma\, \frac{P}{k_B T}\, \ell$$

Dans les expériences effectuées, l'intensité I_0 du faisceau d'ion est constante, l'expérience se fait à température ambiante et la pression au niveau de la zone polarisée et de l'analyseur électrostatique est également constante et égale à 10^{-7} Torr. La longueur de la zone d'interaction (partie « intérieur ») est de 12 mm et la distance parcourue par les ions en aval de cette zone avant d'entrer dans l'analyseur (partie « extérieur ») est de 400 mm. Le taux de collisions à l'intérieur de la zone polarisée est négligeable (3%) par rapport à l'extérieur (97%).

Un exemple en est donné quand on compare les deux diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ de la figure II.5 (b) et (d), page 89. Les évènements du diagramme (b) sont issus de fragments formés à l'extérieur. Ce diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ indique la présence de fragmentations induites par collisions qui se superposent au signal de photofragmentation. Le diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ de la figure II.5.d, dont les évènements sont issus de fragments formés à l'intérieur, traduit correctement la conservation de la quantité de mouvement.

Il n'est pas possible de supprimer les évènements induits par collision qui se superposent au signal de photofragmentation. On peut cependant quantifier l'intensité du signal de collision par rapport au signal de photofragmentation en effectuant deux enregistrements simultanément : un enregistrement avec le laser synchronisé sur le paquet d'ions (enregistrement avec superposition des signaux de photofragmentation et de collision) et un enregistrement avec le laser décalé temporellement par rapport au paquet d'ions (enregistrement du signal de collision uniquement). Ces deux enregistrements, normalisés par rapport au temps d'acquisition et traités sans coïncidence, nous permettent d'estimer le taux de collisions par rapport au taux de photofragments.

II.4 Programme de simulation

Pour aider à l'interprétation de nos résultats expérimentaux, nous avons développé un programme de simulation qui reproduit les expériences réalisées. C'est un programme de type « Monte Carlo ». Pour se faire, on génère un grand nombre d'évènements tirés au hasard, dont on détermine les observables (t_i, y_i, z_i, t_n, y_n, z_n). On traite ensuite ces observables avec le même programme que celui utilisé pour les données expérimentales.

On définit avec précision l'expérience que l'on veut simuler. Toutes les distances du dispositif expérimental, de la zone polarisée aux détecteurs, sont introduites dans le programme de simulation. On choisit la masse de l'ion incident, son énergie cinétique (5000 eV), la masse des fragments, le champ de l'analyseur électrostatique V_{ana} et les tensions des électrodes d'entrée et de sortie de la zone polarisée (V_1 et V_2). On peut également choisir la longueur de la zone polarisée.

On utilise des distributions gaussiennes pour définir différents paramètres. Ces distributions gaussiennes sont centrées sur des valeurs de référence, indiquées entre parenthèses ci-dessous, et qui peuvent être modifiées. On introduit sous forme de distribution exponentielle le temps de fragmentation ($e^{-t/\tau}$) et sous la forme de distributions gaussiennes l'énergie de dissociation (100 mV), l'incertitude sur la direction du faisceau incident [diamètre d'ouverture (0,5 mm), ouverture angulaire (0,1°), largeur en énergie cinétique (15 eV)] et la largeur des impulsions laser [largeur spatiale (1 mm) et temporelle (200 ns)]. On reproduit les données expérimentales par une série de tirages aléatoires indépendants les uns des autres, effectués pour toutes les distributions. La figure II.10 reproduit le menu du programme de simulation avec les différents paramètres ajustables.

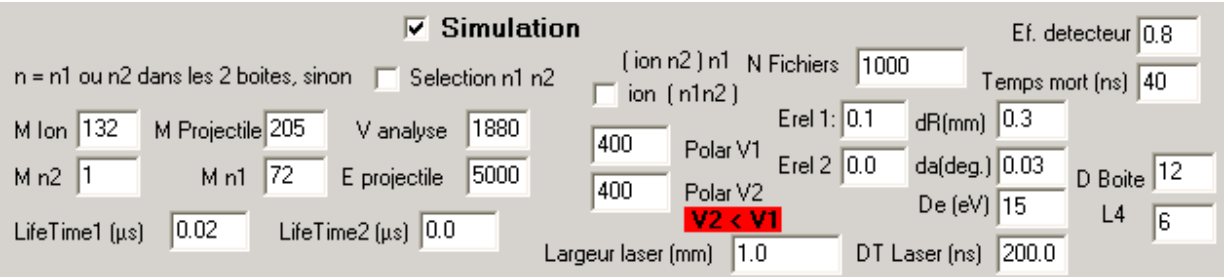


figure II.9 : Menu du programme de simulation

On peut simuler, soit des fragmentations directes, en une étape, soit des fragmentations séquentielles, en deux étapes. Pour une fragmentation séquentielle, on peut simuler, soit des simples coïncidences entre le fragment ionique et un des fragments neutres, en tenant compte de l'efficacité du détecteur de neutres (paramètre ajustable), soit des coïncidences multiples entre

l'ion et les deux fragments neutres, en tenant compte du temps mort du détecteur (également ajustable). La comparaison des diagrammes de corrélation simulés et expérimentaux permet une interprétation plus rapide que les méthodes analytiques présentées dans le paragraphe qui suit.

Après chaque modification des paramètres expérimentaux (ex : position du laser ou longueur de la zone d'interaction), on vérifie que le programme de simulation reproduit les données expérimentales de photofragmentation des canaux *m/z* 130 et *m/z* 132 de la molécule de Tryptophane-H^+ (figure II.10)

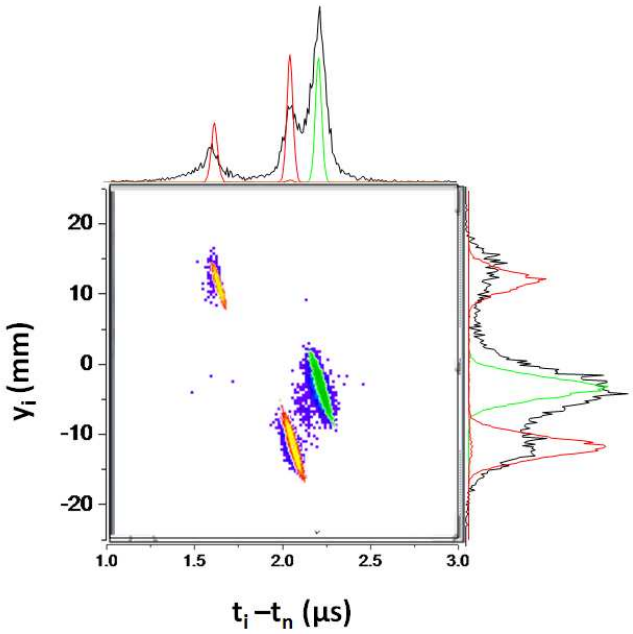


figure II.10 : Comparaison avec la simulation. En noir : projection des points expérimentaux ; en rouge : simulation de m/z 130 intérieur et extérieur ; en vert : simulation de m/z 132 intérieur.

II.5 Mesure des temps de fragmentation

Avec le piège électrostatique, on mesure des temps de fragmentation supérieurs à 10 µs qui correspondent au temps de métastabilité de l'ion piégé. Les constantes de temps mesurées avec le piège correspondent à des constantes globales de fragmentation et on ne connaît pas la nature des canaux associés à ces temps de fragmentation. Avec la zone polarisée, tous les produits de fragmentation sont détectés en coïncidence. On mesure donc les temps de fragmentation associés à chaque canal. Ceux inférieurs à 500 ns sont mesurés avec précision tandis que ceux allant de 500 ns à quelques microsecondes sont seulement estimés.

Dans cette partie, nous présentons le principe des expériences effectuées avec la zone polarisée en champ électrique pour mesurer les temps de fragmentation. Nous montrerons quels sont les paramètres qui définissent la limite de résolution des constantes de temps mesurées. Les temps de fragmentation sont obtenus, soit par modélisation (analytique) des résultats expérimentaux, soit par estimation en comparant résultats expérimentaux et simulés.

II.5.1 Principe des expériences de fragmentation dans un champ électrique

Pour déterminer expérimentalement la constante de temps τ associée à chaque canal de fragmentation d'un système étudié, on applique un champ électrique qui décélère les ions parents et fragments entre les électrodes E_1 et E_2 de la zone d'interaction. Les ions sont soumis à un potentiel qui varie en fonction de leur position dans la zone d'interaction (figure II.11). Notons que la fragmentation induite par le laser ne se produit pas immédiatement après l'interaction des ions avec le laser mais est distribuée sur un certain intervalle de temps. Cette distribution temporelle définit la constante de vitesse k ou de temps $\tau = 1/k$ associée au canal de fragmentation étudié.

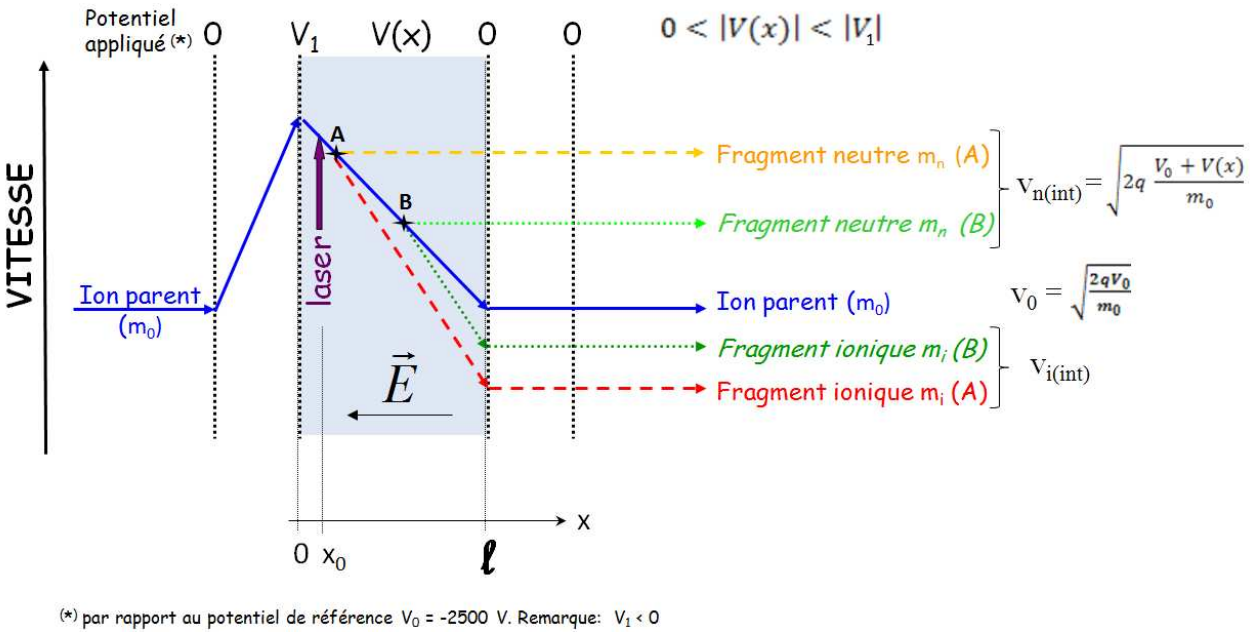


figure II.11 : Représentation des vitesses $v_{n(int)}$ et $v_{i(int)}$ des fragments ioniques et neutres associés à un même canal de fragmentation mais produits à deux endroits différents (en « A » et en « B ») de la zone polarisée par un champ électrique.

Soit $v_{n(int)}$ et $v_{i(int)}$ la vitesse des fragments neutres et ioniques produits à l'intérieur de la zone polarisée par un champ électrique. Les vitesses $v_{n(int)}$ et $v_{i(int)}$ dépendent du potentiel subi au moment de la fragmentation (figure II.11). Nous avons vu précédemment que les observables y_i et t_n permettent de séparer les fragments qui ont des énergies et des vitesses différentes. Le temps d'arrivée t_n d'un fragment neutre et la position d'impact y_i d'un fragment ionique varient en fonction des vitesses $v_{n(int)}$ et $v_{i(int)}$ (figure II.11) et donc en fonction de la localisation de la fragmentation dans la zone polarisée par un champ. Les histogrammes en y_i et en t_n obtenus avec la zone polarisée en champ permettent donc de visualiser le nombre de fragments produits à chaque instant à l'intérieur de la zone polarisée (figure II.12.c. et d.).

La figure II.12 compare, pour un même canal de fragmentation, les données expérimentales obtenues en y_i (histogrammes a. et c.) et en t_n (histogrammes b. et d.) avec la zone d'interaction laser polarisée par un potentiel (histogrammes a. et b.) ou par un champ (histogrammes c. et d.). Remarquons sur la figure II.12 que les histogrammes en y_i sont assez semblables à ceux en t_n. Cela est dû au traitement en coïncidence.

Pour les histogrammes (c) et (d) de la figure II.12, enregistrés avec la zone polarisée par un champ, on observe une décroissance qui définit la constante de temps τ de la réaction de fragmentation étudiée. Pour la même expérience effectuée avec la zone polarisée en potentiel, histogrammes (a) et (b), le pic intérieur représente le nombre total de fragments produits dans la zone polarisée, c'est-à-dire l'intégrale par rapport au temps de tous les fragments produits dans la zone polarisée en champ. Notons que la polarisation en champ ou en potentiel ne modifie la distribution des fragments produits à l'extérieur de la zone polarisée. Cette distribution conserve une forme gaussienne dû au potentiel unique V_0 présent en aval de la zone polarisée[6].

[6] Les intensités des contributions extérieures, enregistrées en potentiel ou en champ, sont différentes car il s'agit d'enregistrements avec des temps d'acquisition différents. Pour un même temps d'acquisition nous aurions la même intensité pour ces contributions extérieur, quel que soit le type de polarisation, champ ou potentiel

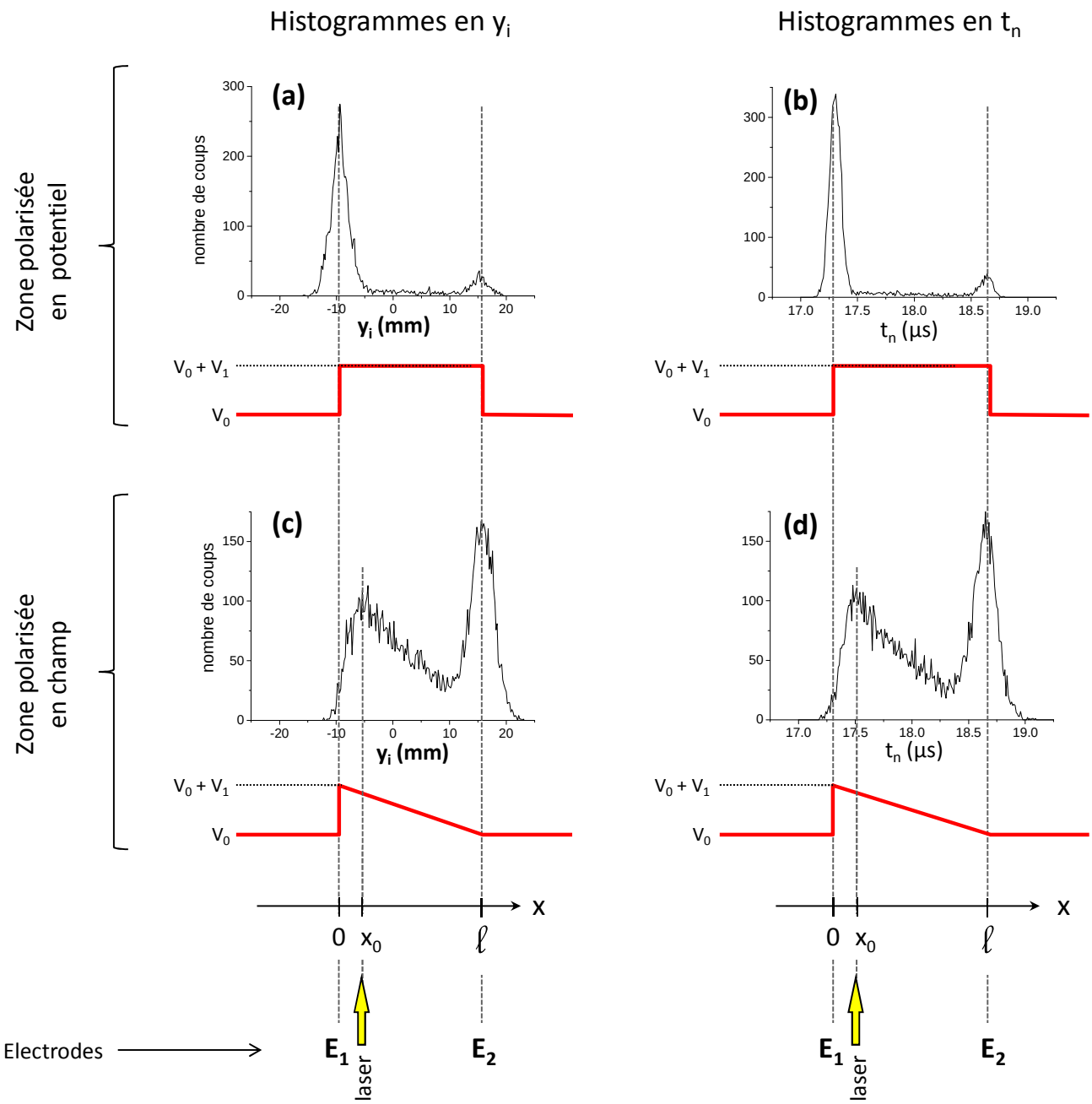


figure II.12 : Comparaison des histogrammes obtenus en y_i et en t_n, pour la zone d'interaction polarisée en potentiel (figures a. et b.) et en champ (figures c. et d.), avec V_1 = 810 Volts, enregistrées pour le fragment m/z 245 de la molécule GWG-H^+ (m/z 319) ; V_{ana} = 2290 Volts

La position d'arrivée des ions y_i et le temps d'arrivée des neutres t_n dépendent du potentiel subi au moment de la fragmentation, en x_0. Le potentiel $V(x_0)$ n'est pas le même pour une polarisation en potentiel ($V_0 + V_1$) et pour une polarisation en champ ($V_0 + V_1 \frac{\ell - x_0}{\ell}$). C'est pourquoi la position y_i et le temps t_n correspondant à l'instant de l'interaction laser sont différents quand on compare les résultats obtenus pour ces deux types de polarisation (figure II.12).

II.5.2 Mesure des constantes de temps

Soit I_0 l'ion parent incident, I_1 et N_1 les fragments ionique et neutre produits avec une constante de vitesse k, dans le cas d'une fragmentation binaire :

$$I_0 \xrightarrow{k} I_1 + N_1$$

Les fragmentations observées expérimentalement sont des réactions élémentaires (ruptures de liaisons covalentes) qui suivent une cinétique d'ordre 1. D'après la loi de vitesse relative à la réaction ci-dessus [3] on peut écrire :

$$\text{(II.7)} \qquad [I_0] = [I_0]_0 e^{-kt} = [I_0] - [I_1] = [I_0] - [N_1]$$

avec $[I_0]_0$ le nombre de molécules I_0 initialement excitées par le laser, $[I_0]$ le nombre de molécules I_0 restantes après excitation et $[I_1]$ et $[N_1]$, le nombre de molécules I_1 et N_1 produites.

Les histogrammes du nombre de fragments neutres en fonction de t_n ou du nombre de fragments ioniques en fonction de y_i enregistrés avec la zone polarisée en champ représentent les taux de fragmentation $\frac{d[N_1]}{dt}$ et $\frac{d[I_1]}{dt}$ exprimés dans l'équation ci-dessous :

$$\text{(II.8)} \qquad -\frac{d[I_0]}{dt} = \frac{d[I_1]}{dt} = \frac{d[N_1]}{dt} = k[I_0]_0 \mathrm{e}^{-\mathrm{kt}}$$

La décroissance temporelle observée sur les histogrammes (c) et (d) de la figure II.12 est une décroissance de type exponentiel $\mathrm{Ae}^{-\mathrm{kt}}$. La modélisation de cette décroissance nous permet donc d'estimer la constante de temps $\tau = 1/k$ associée à la réaction de fragmentation étudiée.

La résolution des constantes de temps mesurées dépend de la dispersion des décroissances exponentielles obtenues en y_i et en t_n. Cette dispersion Δy_i ou Δt_n augmente en fonction de la différence de potentiel V_1 appliquée à la zone polarisée. Mais la dispersion Δy_i est limitée par la taille du détecteur d'ions (-20 mm $\leq y_i \leq +20$ mm). On ajuste le potentiel V_1 pour que Δy_i soit maximal en tenant compte du fait que la fragmentation commence en x_0, au potentiel $V(x_0) = V_1 \frac{\ell - x_0}{\ell}$. (cf figure II.12)

Soit T_f le temps au bout duquel une molécule incidente fragmente à l'intérieur de la zone polarisée[7]. Pour mesurer τ, on transforme en fonction de T_f les histogrammes obtenus en y_i et en t_n avec la zone polarisée en champ (figure II.12.c et d). Pour cela il existe des relations linéaires, démontrées dans l'annexe 1, qui relient les observables y_i ou t_n à T_f :

[7] En x_0, lieu de l'interaction laser, $T_f = 0$, $t_n = 0$ et $t_i = 0$

(II.9) $$T_f \approx -\frac{v_{x0}}{\gamma} + \frac{{v_{x0}}^2}{\gamma(L-x_0)} t_n$$

(II.10) $$T_f = \frac{1}{2(\gamma_i-\gamma)v_{x0}}\left(\frac{y_{galion} q V_a}{m_i h} - v_{x0}^2 + 2\gamma_i(L-x_0)\right) + \frac{qV_a}{2m_i h(\gamma_i-\gamma)v_{x0}} y_i$$

avec v_{x0} : vitesse des ions parents en x_0; γ et γ_i : décélération des ions parents et fragments à l'intérieur de la zone polarisée ; L : distance entre l'interaction laser et le détecteur de neutres ; m_i : masse de l'ion étudié ; y_{galion}, h et V_a : paramètres de l'analyseur définis au chapitre précédent.

A partir de l'équation (II.10), on montre que l'observable y_i est plus appropriée à l'étude des constantes de temps des ions de petite masse. En calculant la différentielle de cette équation, on peut la mettre sous la forme :

(II.11) $$\Delta y_i = C \times m_n \Delta T_f$$ où C est une constante

avec Δy_i est la dispersion en y_i obtenue pour un temps de fragmentation T_f variant sur l'intervalle ΔT_f. Pour un intervalle de temps ΔT_f constant, la dispersion Δy_i est plus grande pour les canaux associés à un fragment neutre de grande masse ou un fragment ionique de petite masse. D'après l'équation (II.11), la décroissance observée en y_i est donc mieux résolue et la mesure de la constante de temps plus précise pour les fragments ioniques de petite masse. Par opposition, pour les fragments ioniques de grande masse, l'histogramme en t_n est mieux adapté pour les mesures de temps de fragmentation.

II.5.3 Elargissement temporel des pics

Quand la zone d'interaction est polarisée par un potentiel, les pics correspondants aux contributions des fragments formés à l'intérieur et à l'extérieur se présentent sous la forme de distributions gaussiennes (histogrammes (a) et (b) de la figure II.12). La demi-largeur de ces distributions définit la limite de résolution des temps de fragmentation mesurés. Cet élargissement est en partie dû à l'énergie cinétique relative libérée par les fragments (KER). Dans l'annexe 2 on démontre que l'élargissement induit par le KER sur les observables y_i et t_n est tel que :

(II.12) $$\Delta y_i = \frac{8h}{qV_a}\sqrt{\frac{E_0\, KER\, m_n m_i}{m_0^2}}$$

(II.13) $$\Delta t_n = L\sqrt{\frac{2\, KER\, m_0}{{E_0}^2}}\sqrt{\frac{m_i}{m_n}}$$

Avec l'observable t_n, il faut également tenir compte de l'élargissement $\Delta\tau$ lié au recouvrement temporel entre le paquet d'ions et l'impulsion laser .

Quand la zone d'interaction est polarisée par un champ électrique, un élargissement supplémentaire est produit par la largeur spatiale du point focal du faisceau laser (d = 0.5 à 1 mm). Dans l'annexe 2, on montre que, pour un champ électrique de 810 Volts, cet élargissement supplémentaire est négligeable devant l'élargissement dû au KER. Il semble que le recouvrement temporel entre le paquet d'ions et l'impulsion laser ait un effet plus faible que le KER sur l'élargissement en t_n. L'énergie cinétique libérée apparaît donc comme le paramètre dominant. Dans l'annexe 2, on montre qu'une valeur du KER comprise entre 50 et 100 mV provoque un élargissement de 40 ns sur la valeur de T_f et suffit à reproduire l'élargissement observé de 150 à 200 ns observé en t_n.

II.5.4 Modélisation des données expérimentales

A partir de l'enregistrement d'un canal de fragmentation en coïncidence, on effectue des filtres sur les diagrammes bidimensionnels afin de ne sélectionner que les évènements correspondants au canal que l'on veut analyser (contribution intérieur et extérieur). Pour les évènements sélectionnés, on représente les histogrammes en fonction de de y_i et de t_n (cf figure II.12). On convertit ces diagrammes monodimensionnels en fonction du temps T_f de fragmentation à l'intérieur de la zone polarisée. Si la constante de temps de fragmentation est inférieure à 500 ns elle peut être mesurée en fonction de T_f. Mais si la constante τ est supérieure à 500 ns elle est mesurée à l'aide du programme de simulation.

II.5.4.1 Mesure de τ par modélisation analytique (τ < 500 ns)

Les histogrammes obtenus en fonction de y_i sont la convolution d'un élargissement gaussien dû principalement au KER et d'une exponentielle décroissante $e^{-\frac{t}{\tau}}$ où τ est la constante de temps associée au canal de fragmentation étudié. La gaussienne utilisée est de la forme $e^{-\frac{t^2}{2\sigma^2}}$ avec σ l'écart-type de cette gaussienne[8]. Le produit de convolution utilisé pour modéliser les résultats expérimentaux est de la forme :

[8] La largeur à mi-hauteur FWHM de la gaussienne est égale à 2.35*σ.

(II.14) $$h(t) = \int_{-\infty}^{t} A_0 e^{-\frac{t-x}{\tau}} \, e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \, dx = A_0 \sigma \sqrt{2} \, e^{\left(\frac{\sigma^2}{2\tau^2} - \frac{t}{\tau}\right)} \int_{-\infty}^{\frac{t}{\sqrt{2}\sigma} - \frac{\sigma}{\sqrt{2}\tau}} e^{-y^2} \, dy$$

On introduit une fonction d'erreur $\mathrm{erf}(t) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^t e^{-x^2} \, dx$ dans l'équation ci-dessus. La fonction h(t) s'exprime alors sous la forme :

(II.15) $$h(t) = A \left[1 + \mathrm{erf}\left(\frac{(t - t_0) - \frac{\sigma^2}{\tau}}{\sqrt{2}\sigma} \right) \right] e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau}}$$

L'équation (II.15) est utilisée pour modéliser les décroissances obtenues expérimentalement. Cette fonction dépend de 4 paramètres : t_0 le temps à l'origine, qui rend compte de la position de l'interaction entre les ions et le laser ; σ l'écart type de la gaussienne ; A l'amplitude de la distribution et τ la valeur de la décroissance exponentielle.

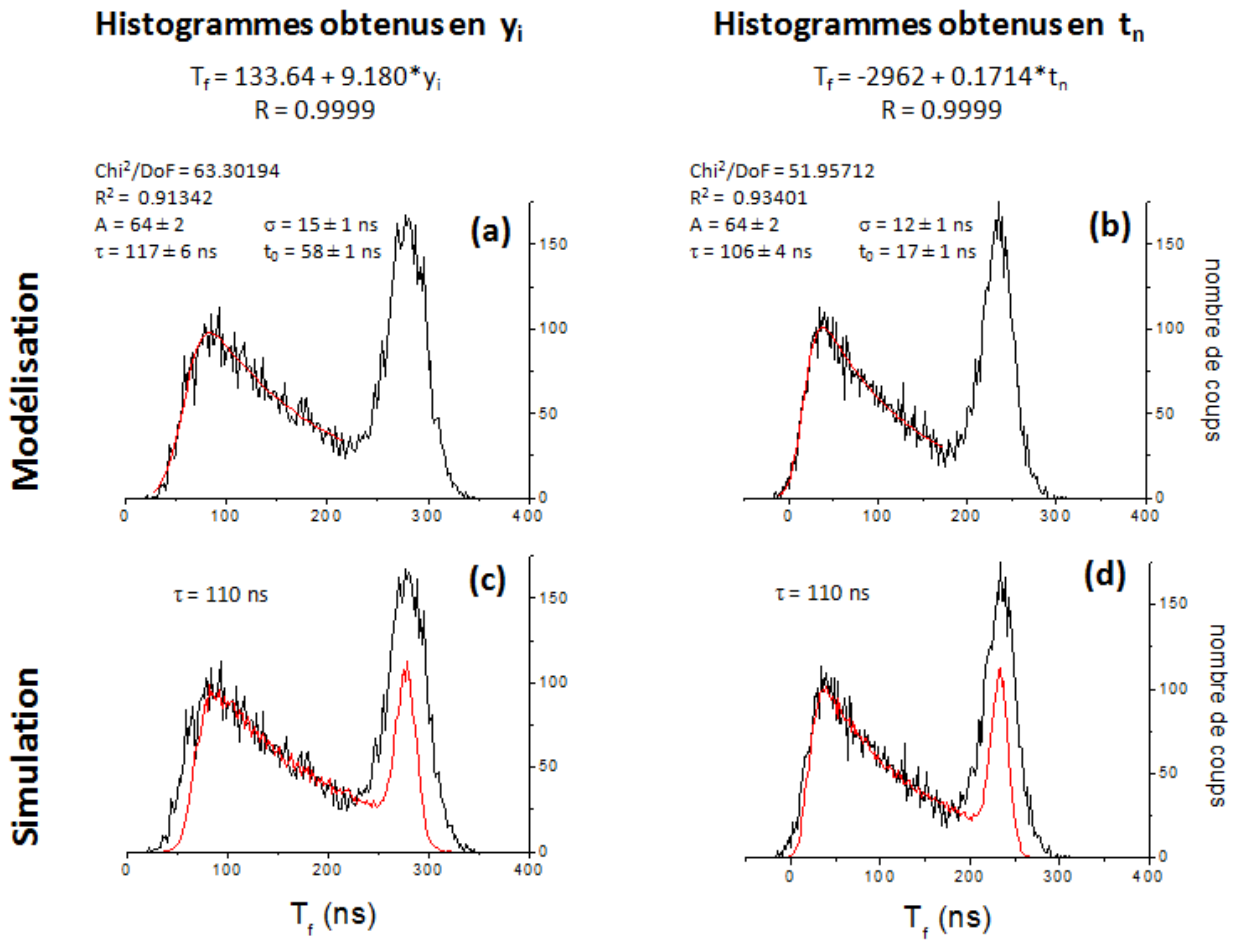


figure II.13 : Modélisation et simulation du temps de vie respectivement en y_i (a. et c.) et en t_n (b. et d.) à partir de l'exemple de la figure II.12. Points expérimentaux en noir ; modélisation et simulation en rouge.

La figure II.13 compare les temps de fragmentation τ obtenus sur les décroissances en y_i et en t_n, à partir de la modélisation (figures a. et b.) et de la simulation (figures c. et d.). L'accord est excellent et nous fournit la valeur τ = 110 +/- 10 ns, avec une incertitude de 10%. Pour déterminer τ, il faut que $e^{-\frac{t}{\tau}}$ varie plus lentement que la fonction gaussienne modélisant l'élargissement. Il faut donc que τ soit plus grand que l'écart-type σ. Cet écart-type donné par la modélisation nous permet de vérifier la limite de résolution de la constante de temps mesurée. Pour la plupart des expériences réalisées dans cette thèse, la résolution que nous avons observée est d'environ 15 à 20 ns, tel l'écart-type σ donné sur les modélisations de la figure II.13.

Sur la figure II.13, on remarque que la simulation sous-estime l'élargissement des pics et qu'elle ne reproduit pas l'intensité de la contribution extérieure. La différence entre la simulation et les résultats expérimentaux observée sur le pic extérieur suggère que des fragments sont produits par collisions avec le gaz résiduel à l'extérieur de la zone polarisée et se superposent aux photofragments.

II.5.4.2 Estimation de τ à l'aide du programme de simulation (τ > 500 ns)

Pour les fragmentations qui se produisent principalement à l'extérieur de la zone polarisée, avec une constante de temps τ supérieure à 500 ns, l'intensité des photofragments produits à l'intérieur de la zone polarisée est trop faible pour effectuer une modélisation précise de la décroissance (figure II.14).

Si τ > 500 ns, on estime le temps de fragmentation en effectuant le rapport entre le nombre de fragments produits à l'intérieur de la zone polarisée et ceux produits à l'extérieur. Après avoir soustrait les éventuelles collisions présentes à l'extérieur, les résultats expérimentaux sont comparés à ceux donnés par la simulation et on choisit la meilleure constante de temps pour de temps τ simulée (figure II.14.c. et d.)

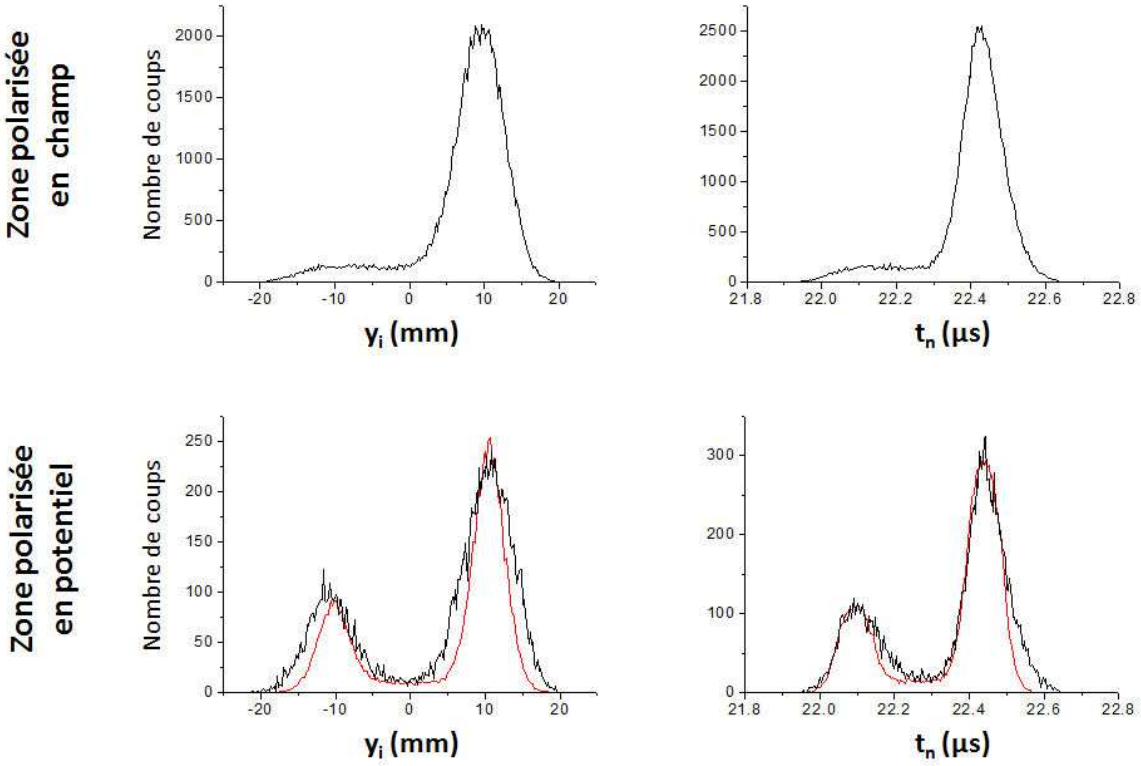


figure II.14 : Comparaison des résultats obtenus en champ (a. et b.) et en potentiel (c. et d.) sur les observables y_i et t_n pour le canal m/z 205 du complexe [Trp(CE) + H]$^+$ (m/z 469). Sur les figures c. et d., les résultats expérimentaux (en noir) sont comparés aux résultats obtenus par simulation (en rouge) pour τ = 900 ns.

II.6 Traitement des mécanismes séquentiels

Nous avons vu jusqu'ici comment identifier un mécanisme et mesurer une constante de temps dans le cas d'une fragmentation directe. Dans la dernière partie de ce chapitre nous allons nous intéresser au traitement des mécanismes séquentiels. La partie « généralités », introduit les deux exemples de mécanismes séquentiels dont le traitement (identification de l'intermédiaire de fragmentation et des constantes de temps) est détaillé dans la suite.

II.6.1 Généralités

On commence toujours par traiter nos données en simple coïncidence, c'est-à-dire en supposant qu'il s'agit d'une fragmentation binaire. On vérifie alors si la corrélation entre les vitesses verticales v_{zi} et v_{zn} respecte la conservation de la quantité de mouvement, connaissant la

masse du fragment ionique et de l'ion incident. Si la pente obtenue ne correspond pas au rapport de masse attendu, c'est qu'il s'agit d'une fragmentation séquentielle ou multiple.

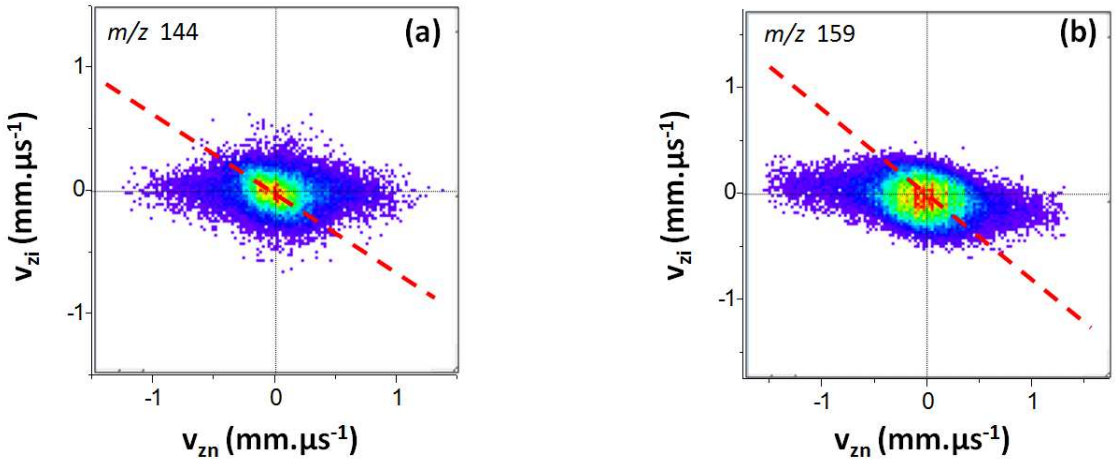


figure II.15 : Diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) de simple coïncidence enregistrés pour la molécule de Tryptophane-Glycine-H$^+$ (m/z 262). L'analyse de ces deux diagrammes sera expliquée dans cette partie du chapitre. Le trait rouge en pointillé correspond au rapport des masses m_n / m_i dans le cas d'une fragmentation binaire. Diagramme (a) : ion m/z 144, V_1 = V_2 = 600 Volts et V_{ana} = 1690 Volts. Diagramme (b) : ion m/z 159, V_1 = V_2 = 1000 Volts et V_{ana} = 1640 Volts.

La figure II.15 illustre deux exemples de fragmentation séquentielle où les points expérimentaux ne s'alignent sur les droites en traits pointillés rouge, de pente (m_i – m_0)/m_i.

Pour expliquer une fragmentation séquentielle, l'hypothèse la plus probable est de considérer une fragmentation en deux étapes avec passage par un ion intermédiaire, du type :

$$I_0 \overset{k_1}{\rightarrow} I_1 + N_1$$

$$I_1 \overset{k_2}{\rightarrow} I_2 + N_2$$

avec I_0 l'ion parent ; I_1 l'ion intermédiaire produit en même temps que le fragment neutre N_1 avec une constante de vitesse k_1 ; I_2 l'ion final associé au neutre N_2, tous deux issus de l'ion intermédiaire I_1 et produits avec une constante de vitesse k_2.

Il faut compter environ 5 à 6 µs à un ion pour aller de la zone d'interaction laser à l'entrée de l'analyseur. Suivant le canal de fragmentation étudié, on ne détecte pas forcément l'ion intermédiaire I_1 mais le neutre N_1 est toujours détecté. En simple coïncidence, pour un mécanisme séquentiel, les fragments neutres N_1 ou N_2 sont corrélés au fragment ionique final I_2. Pour un mécanisme séquentiel, les diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) de simple coïncidence correspondent donc à la

superposition de deux motifs de corrélation : la corrélation entre l'ion I_2 et le neutre N_1 et la corrélation entre l'ion I_2 et le neutre N_2 (figure II.15). Dans le cas d'une fragmentation séquentielle, si le motif linéaire du diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ reste linéaire, il est plus large que celui observé dans le cas d'une fragmentation binaire car la deuxième fragmentation ne se produit plus dans le centre de masse de la molécule incidente.

Les informations sur les constantes de vitesse k_1 et k_2, la masse des fragments neutres m_{n1} et m_{n2} et la masse de l'ion intermédiaire m_{i1} ne peuvent être obtenues que s'il est possible de différencier les fragments neutres émis dans un traitement en multicoïncidence (1 ion - 2 neutres). Rappelons que les multicoïncidences ne sont enregistrées que si la différence de temps d'arrivée de deux fragments neutres est supérieure à 40 ns (temps mort du détecteur).

Deux types de mécanisme séquentiel observés expérimentalement peuvent être analysés en multicoïncidences. Le premier cas, celui de la figure II.15.(a), est un mécanisme dans lequel la première étape est rapide ($\tau_1 < 100$ ns) et la deuxième étape est lente ($\tau_2 > 1$ µs). Les fragments neutres associés à chaque étape de fragmentation sont séparés temporellement ce qui permet de les différencier puis de les identifier. Le deuxième cas, celui de la figure II.15.(b), est un mécanisme où les fragments neutres émis sont détectés quasiment en même temps ($\tau_1 \approx \tau_2 < 100$ ns). Dans certains cas, tel celui qui est présenté ici, les fragments neutres sont différenciés suivant leur déviation relative par rapport au centre de masse de la molécule incidente.

II.6.2 Cas $\tau_1 \ll \tau_2$, séparation temporelle des fragments neutres

Dans ce cas, où $\tau_1 \ll \tau_2$, les deux étapes sont parfaitement séparées temporellement. La première étape se déroule à l'intérieur de la zone d'interaction ($\tau_1 < 100$ ns) et la deuxième étape, essentiellement à l'extérieur ($\tau_2 > 500$ ns). L'ion final I_2 est produit avec un temps suffisamment long pour qu'une partie des ions intermédiaires I_1 arrivent jusqu'au détecteur avant d'avoir fragmenté et soient détectés.

II.6.2.1 Analyse du diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$

Les évènements de la

figure II.16, enregistrés pour une zone d'interaction non-polarisée, sont relatifs aux mêmes évènements que ceux de la figure II.15(a). Si aucun champ électrique n'est appliqué à la zone d'interaction, tous les fragments neutres ont le même temps d'arrivée et ne peuvent être différenciés. On n'a donc qu'une seule contribution sur le diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ correspondant à

la corrélation de l'ion final avec les différents fragments neutres émis lors de cette fragmentation séquentielle.

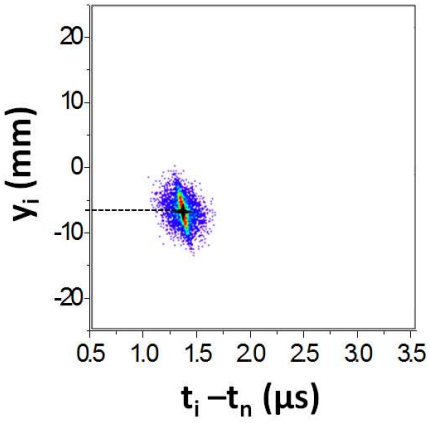


figure II.16 : Diagramme N(y_i, t_i - t_n) de simples coïncidences issu des mêmes évènements que le diagramme de la figure II.15(a) : molécule de Trp-Gly-H$^+$ (m/z 262) ; V_1 = V_2 = 0 Volts et V_{ana} = 1690 Volts.

On mesure une position y_i = -6.8 mm.

La position y_i mesurée permet de calculer l'énergie E_{i2} de l'ion I_2 à l'aide de l'équation :

$$E_i = \frac{qV_a}{2h}\left(y_{galion} + y_i\right) \qquad \text{(II.16)}$$

Soit **E_{i2} = 2750 eV**, pour V_a = 1690 Volts, h = 152.9 mm, y_{galion} = 504.4 mm et y_i = - 6.8 mm (figure II.16). Pour une zone d'interaction non-polarisée, on calcule la masse m_{i2} de l'ion analysé connaissant son énergie E_{i2}, l'énergie E_0 et la masse m_{i0} de l'ion parent I_0 :

$$E_{i2} = E_0 \frac{m_{i2}}{m_{i0}} \qquad \text{(II.17)} \qquad \text{soit} \qquad \text{(II.18)} \quad m_{i2} = \frac{E_{i2} \times m_{i0}}{E_0}$$

On calcule **m_{i2} = 144.1 uma**, pour E_{i2} = 2750 eV, E_0 = 5 keV, m_{i0} = 262 uma

Les évènements de la figure II.17, sont relatifs au même canal de fragmentation que la figure précédente, c'est-a-dire à la production de l'ion *m/z* 144. En revanche, ces données ont été obtenues avec la zone d'interaction polarisée par un potentiel de 600 Volts. L'application d'un potentiel permet de séparer les fragments neutres formés à l'intérieur de la zone polarisée de ceux formés à l'extérieur. Ils ont des temps d'arrivée différents suivant la localisation de leur fragmentation, à l'intérieur ou à l'extérieur de la zone polarisée. On observe donc deux contributions sur le diagramme N(y_i, t_i - t_n) de simple coïncidence de la figure II.17 : la corrélation de l'ion *m/z* 144 avec les fragments neutres produits à l'intérieur de la zone polarisée et la corrélation du même ion avec les neutres produits à l'extérieur. Ces deux motifs apparaissent pour une même position y_i correspondant à l'énergie de l'ion fragment final I_2.

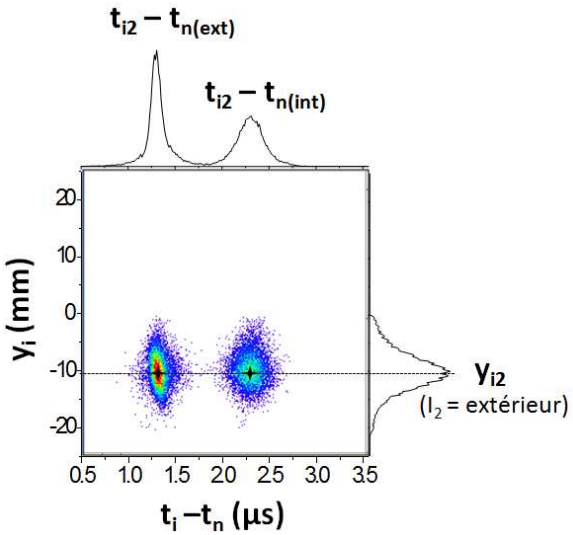


figure II.17 : Diagramme N(y_i, t_i - t_n) de simple coïncidence enregistré pour l'ion m/z 144 de Trp-Gly-H^+ (m/z 262) ;

V_1 = V_2 = 600 Volts et V_{ana} = 1690 Volts.

On mesure une position y_i = -10.6 mm

Pour une zone d'interaction polarisée par un potentiel V, l'énergie E_{i2} de l'ion final dépend de sa masse m_{i2} et de la masse m_{i1} de l'ion intermédiaire:

(II.19) $E_{i2} = q(V_0 + V)\frac{m_{i2}}{m_{i0}} - qV\frac{m_{i2}}{m_{i1}}$ soit, (II.20) $m_{i1} = \frac{qVm_{i2}}{q(V_0+V)\frac{m_{i2}}{m_{i0}} - E_{i2}}$

On calcule E_{i2} en fonction de y_i à l'aide de l'équation (II.16), soit **E_i = 2728 eV** pour V_a = 1690 Volts, h = 152.9 mm, y_{galion} = 504.4 mm et y_i = - 10.8 mm (figure II.17). Puis on déduit m_{i1} de l'équation, (II.20) connaissant m_{i2}, soit **m_{i1} = 247.0 uma** calculé pour V = 600 Volts, m_{i2} = 144 uma, V_0 = 5 kV, m_{i0} = 262 uma et E_{i2} = 2729 eV.

La masse « réaliste » la plus proche de ce calcul est m_{i1} = 245 uma. On suppose que l'ion incident de masse *m/z* 262 fragmente à l'intérieur de la zone polarisée (τ_1 < 100 ns) en un ion intermédiaire *m/z* 245 associé à une molécule d'ammoniac (m_{n1} = 17 uma). Cet ion intermédiaire fragmente principalement après avoir quitté la zone polarisée (τ_2 > 1 µs) en un ion final *m/z* 144 associé à un neutre de masse 101 uma. La figure II.18 représente le scénario proposé.

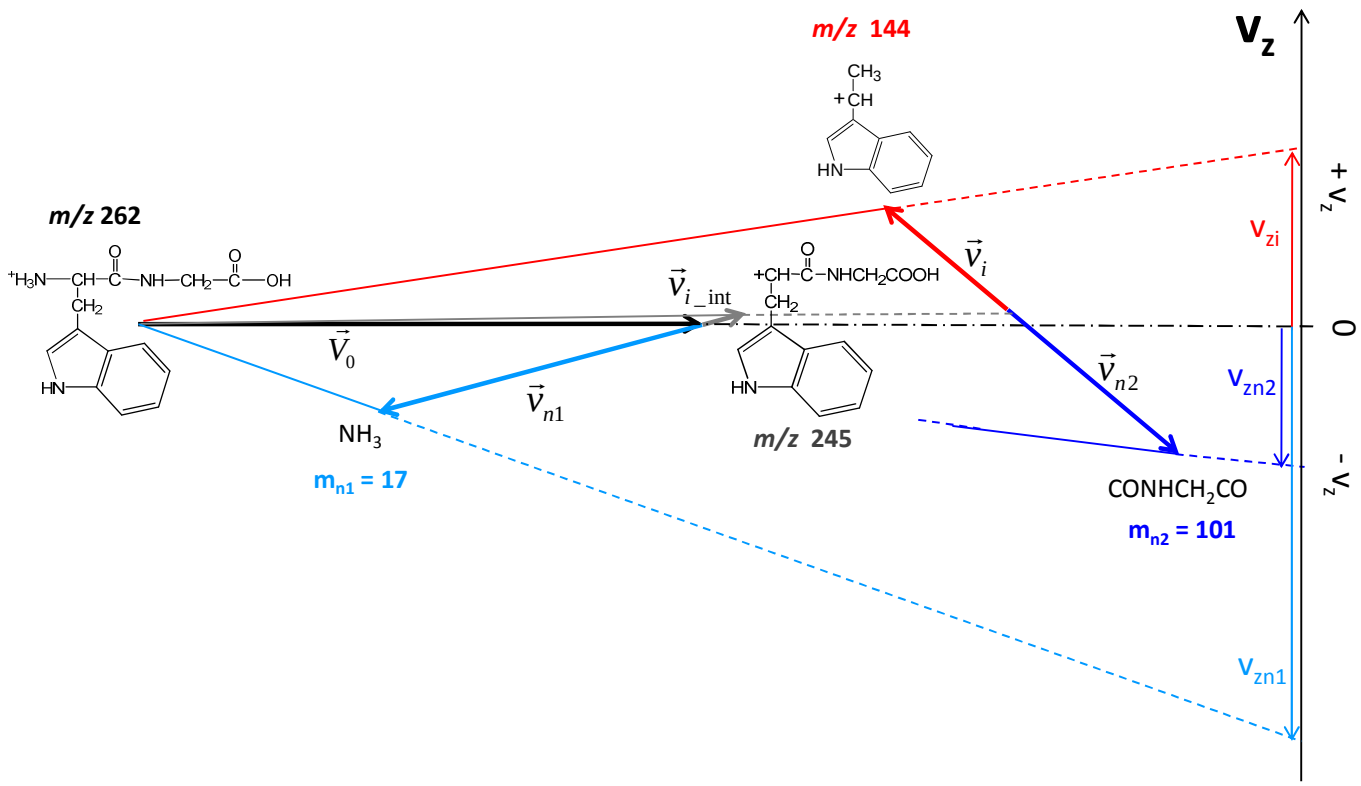


figure II.18 : Scénario proposé pour expliquer le mécanisme séquentiel associé aux évènements de la figure II.17 : $262^+ \rightarrow 245^+ + 17$

$245^+ \rightarrow 144^+ + 101$

On vérifie cette hypothèse à l'aide du programme de simulation en prenant des temps de fragmentation τ_1 = 10 ns et τ_2 = 10 µs.

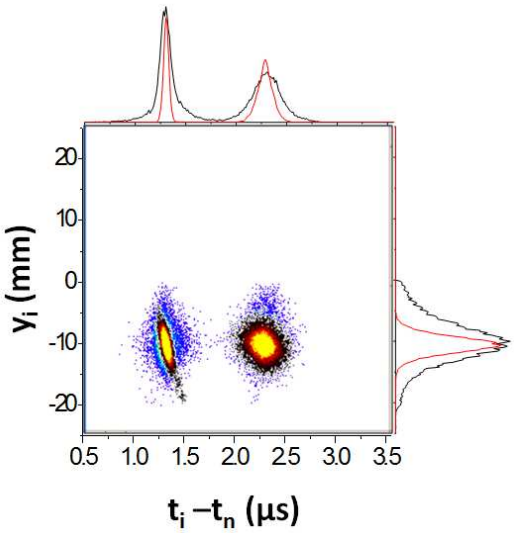


figure II.19 : Comparaison entre la simulation en jaune (projetée en rouge) et les données expérimentales en bleu (projetées en noir).

Ces données expérimentales sont celles de la figure II.17

L'excellent accord entre les points simulés et les points expérimentaux confirme notre hypothèse.

II.6.2.2 Analyse des diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) en multicoïncidence

L'analyse des diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) de multicoïncidences permet de confirmer l'hypothèse précédente. Le programme d'analyse de données identifie les fragments neutres par leur temps d'arrivée : soit n_1 le 1er neutre détecté et n_2 le 2e neutre détecté. Sur la figure II.20 on voit que le 1er neutre détecté est majoritairement produit à l'intérieur de la zone polarisée et le 2e neutre, à l'extérieur. Pour plus de simplicité on ne sélectionne dans l'analyse suivante que les évènements pour lesquels le 1er neutre (noté N_1) est émis exclusivement à l'intérieur alors que le 2e neutre (noté N_2) est émis à l'extérieur. Seuls les évènements correspondants à N_1 et N_2, entourés en rouge sur la figure II.20, sont utilisées pour effectuer les multicoïncidences (i, n_1, n_2) présentées dans la suite. Avec cette sélection, nous sommes sûr que le 1er neutre détecté est le 1er émis et que le 2ème détecté correspond au 2ème neutre émis.

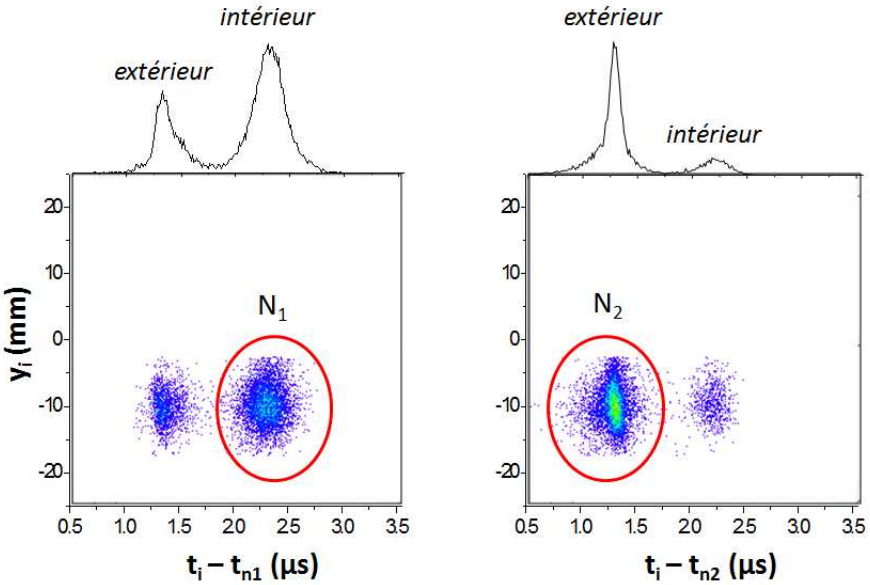


figure II.20 : diagrammes N(y_i, t_i - t_{n1}) et N(y_i, t_i - t_{n2}) issu des mêmes évènements que ceusx de la figure II.17. Ici ces évènements sont traités en multicoïncidence, n_1 est le 1er neutre détecté et n_2 le 2e neutre détecté. Les cercles rouges indiquent les contributions affectées à N_1, neutre issu de la 1ère fragmentation, et N_2, neutre issu de la 2e fragmentation.

Analysons d'abord la 2e fragmentation en nous appuyant sur l'hypothèse émise précédemment pour ce mécanisme : I_1 (*m/z* 245) → I_2 (*m/z* 144) + N_2 (m_{n2} = 101). L'ion intermédiaire I_1 est légèrement dévié par rapport à l'axe du faisceau incident à cause de la 1ère fragmentation. On peut cependant appliquer la conservation de la quantité de mouvement au centre de masse de l'ion I_1 pour analyser la déviation relative de ses fragments I_2 et N_2. Le diagramme de corrélation N(v_{zi2}, v_{zn2}) de la figure II.21 présente un motif linéaire. Ce motif est

élargi par rapport à celui d'une fragmentation directe, du fait de la déviation de la première étape de fragmentation. Cependant, la pente R de ce diagramme traduit toujours le rapport des masses :

$$R = -\frac{m_{n2}}{m_{i2}} \qquad \text{(II.21)}$$

On connaît les masses des ions I_1 (*m/z* 245) et I_2 (*m/z* 144) d'après l'analyse du diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$. La mesure expérimentale de la pente R permet de vérifier la masse m_{n2} du neutre N_2.

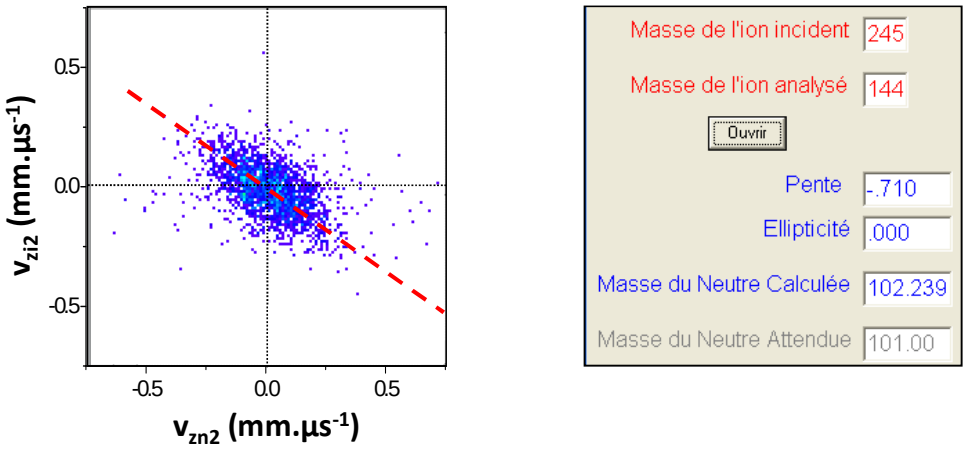


figure II.21 : Diagramme $N(v_{zi}, v_{zn2})$ et résultat de la modélisation de la pente de cette distribution, avec I_2 l'ion analysé, de masse m/z 144, issu de l'ion I_1 de masse m/z 245. Le trait pointillé rouge représente la pente théorique attendue : R = -101/144 = -0.701

On obtient une erreur de l'ordre de 1% sur la masse m_{n2} attendue. La bonne correspondance entre la pente théorique, tracée en trait pointillé rouge sur la figure II.21, et les points expérimentaux confirme notre hypothèse concernant le mécanisme de fragmentation.

On analyse ensuite la 1ère fragmentation, toujours d'après l'hypothèse précédente :

I_0 (*m/z* 262) → I_1 (*m/z* 245) + N_1 (m_{n1} = 17). La conservation de la quantité de mouvement appliquée dans le centre de masse de l'ion parent I_0 est projetée sur l'axe z :

$$m_{i1}\vec{v}_{zi1} + m_{n1}\vec{v}_{zn1} = m_{i2}\vec{v}_{zi2} + m_{n2}\vec{v}_{zn2} + m_{n1}\vec{v}_{zn1} = \vec{0} \qquad \text{(II.22)}$$

Ici, comme nous travaillons sur un enregistrement relatif à l'ion final, nous n'avons pas accès aux données de l'ion intermédiaire. La projection du vecteur vitesse $\vec{v}_{zi1}$ de ce dernier est calculée à partir des données expérimentales[9] $\vec{v}_{zi2}$ et $\vec{v}_{zn2}$ et des masses m_{i2}, et m_{n2} testées :

$$\vec{v}_{zi1} = \frac{m_{i2}\vec{v}_{zi2} + m_{n2}\vec{v}_{zn2}}{m_{i2} + m_{n2}} \qquad \text{(II.23)}$$

La pente R du diagramme de corrélation $N(v_{zi1}, v_{zn1})$ permet de vérifier la masse du neutre N_1, connaissant celle des ions I_0 (*m/z* 262) et I_1 (*m/z* 245) :

$$R = -\frac{m_{n1}}{m_{i1}} \qquad \text{(II.24)}$$

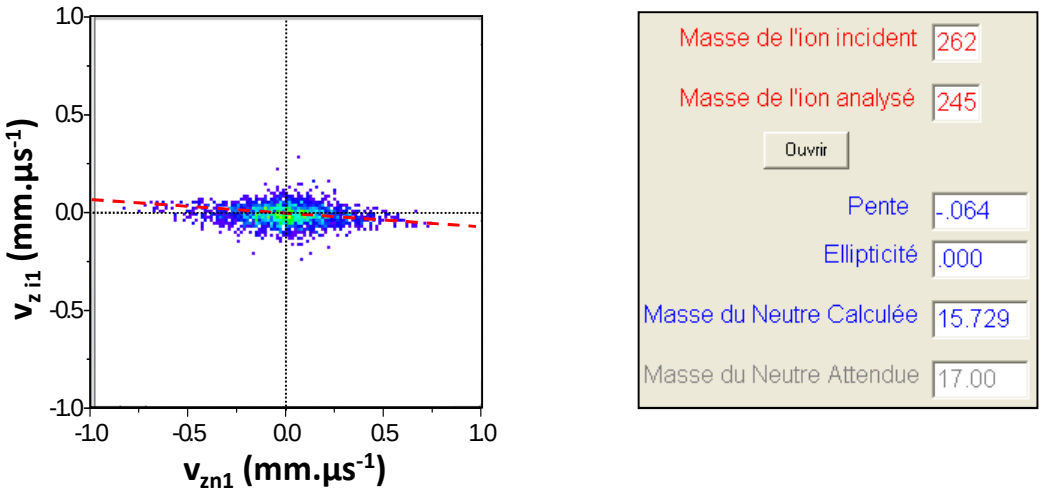


figure II.22 : diagramme $N(v_{zi1}, v_{zn1})$ et résultat de la modélisation de la pente de cette distribution, pour l'ion fragment m/z 245 issu de l'ion incident m/z 262. Le trait pointillé rouge représente la pente théorique attendue : R = - 17 / 245 = - 0.069

Le programme de modélisation nous donne une valeur de m_{n1} avec un écart de 7.5% par rapport à la masse attendue. On observe un bon accord entre les points expérimentaux et la pente théorique tracée sur la figure II.22. L'écart entre la masse attendue et la masse calculée est moins bon que pour l'analyse de la deuxième étape.

Dans cet exemple l'ion fragment intermédiaire est faiblement dévié lors de la première fragmentation. Or, dans l'équation (II.23), la déviation de l'ion intermédiaire (v_{zi1}) est calculée à partir des déviations mesurées des fragments I_2 et N_2 (v_{zi2} et v_{zn2}). La déviation v_{zi1} est faible devant l'incertitude liée aux mesures des positions de N_2 et I_2. Cependant, le résultat de cette

[9] $\vec{v}_{zi2}$ et $\vec{v}_{zn2}$ sont exprimés expérimentalement par rapport au centre du faisceau incident, c'est-à-dire par rapport au centre de masse de I_0

deuxième corrélation N(v_{zi1}, v_{zn1}), présenté sur la figure II.22, est juste utilisé pour confirmer le résultat de la figure II.21.

Les diagrammes de multicoïncidence N(v_{zi1}, v_{zn1}) et N(v_{zi2}, v_{zn2}) nous ont permis de confirmer les deux étapes du mécanisme testé.

II.6.2.3 Analyse des temps de fragmentation

Dans l'exemple considéré, comme la deuxième étape est lente, l'ion intermédiaire I_1 est détecté. En changeant la tension de l'analyseur par rapport aux données précédentes, on peut enregistrer l'ion I_1 en coïncidence avec le neutre N_1. L'estimation du temps de fragmentation de la 1ère étape est réalisée à partir de cet enregistrement, comme dans le cas d'une fragmentation directe ayant lieu dans la zone polarisée.

Si une partie des ions intermédiaires I_1 atteignent le détecteur avant d'avoir fragmenté, les ions I_2 sont formés quasi-essentiellement à l'extérieur et $\tau_2 > 1$ µs. Le temps de la deuxième fragmentation ne peut pas être mesuré plus précisément à l'aide de la zone d'interaction polarisée, non-adaptée à la mesure des temps longs.

II.6.3 Cas où les deux fragmentations τ_1 et τ_2 sont rapides (< 100 ns), analyse des fragments neutres suivant leurs déviations relatives

Dans ce cas, l'ion final est formé exclusivement à l'intérieur de la zone d'interaction et les deux étapes sont terminées en 200 ns. L'ion intermédiaire ne peut pas être détecté.

II.6.3.1 Analyse du diagramme N(y_i, $t_i - t_n$)

L'énergie cinétique E_{i2} de l'ion final I_2, formé à l'intérieur de la zone polarisée, est la même que la fragmentation soit directe ($I_0 \rightarrow I_2$) ou séquentielle avec passage par un ion intermédiaire ($I_0 \rightarrow I_1 \rightarrow I_2$), dans le cas d'une zone d'interaction polarisée par un potentiel V :

$$E_{i2} = q(V_0 + V)\frac{m_{i2}}{m_{i0}} - qV \qquad \text{(II.25)}$$

avec m_{i0} : masse de l'ion parent ; m_{i2} : masse de l'ion final ; qV_0 : énergie de l'ion parent.

La position y_i mesurée sur le diagramme N(y_i, $t_i - t_n$) permet d'identifier la masse m_{i2} de l'ion final mais ne donne pas d'informations sur la masse m_{i1} de l'ion intermédiaire. On calcule E_{i2}

en fonction de y_i à l'aide de l'équation (II.16) de la page 107, puis à partir de l'équation (II.25) on calcule la masse m_{i2} :

$$m_{i2} = \frac{m_{i0}}{q(V_0+V)}(E_{i2} + \mathrm{qV}) \qquad \text{(II.26)}$$

Soit $\mathbf{E_i}$ **= 2636 eV** pour V_a = 1640 Volts, h = 152.9 mm, y_{galion} = 504.4 mm et y_i = - 12.8 mm (figure II.23) ; et $\mathbf{m_{i2}}$ **= 158.8 uma** pour m_{i0} = 262 uma, V_0 = 5 kV, V = 1 kV, E_{i2} = 2.636 keV

La masse la plus proche de ce calcul correspondant à un fragment attendu est m_{i2} = 159 uma

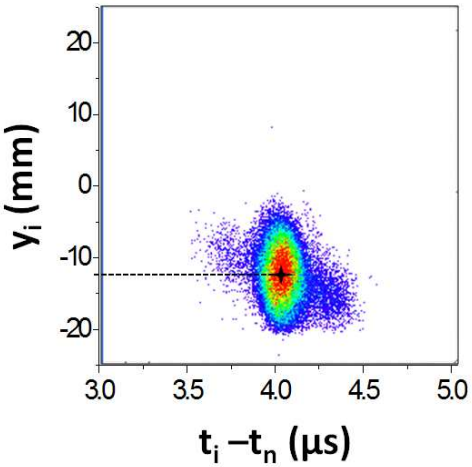


figure II.23 : Diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ de simple coïncidence pour la molécule de Trp-Gly-H^+ (m/z 262) ;

$V_1 = V_2$ = 1000 Volts et V_{ana} = 1640 Volts

On mesure une position y_i = -12.8 mm

Le diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ de la la figure II.23 présente une structure bimodale. Nous allons voir dans le paragraphe suivant que ces deux structures correspondent aux deux étapes de fragmentation de ce mécanisme.

II.6.3.2 Analyse des diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ en multi-coïncidences

Dans le cas $\tau_1 \approx \tau_2$ (< 100 ns), pour chaque évènement, les deux fragments neutres sont formés à l'intérieur de la zone polarisée et arrivent en même temps sur le détecteur. On ne peut pas les identifier par leur temps d'arrivée. On peut cependant dans certains cas, comme celui présenté ici, les séparer par leur déviation relative par rapport au centre de masse de la molécule incidente. Ces évènements de multicoïncidence sont notés (i, $n_{+dévié}$, $n_{-dévié}$). Notre programme de traitement de données permet de différencier des fragments neutres suivant l'amplitude de leur déviation d par rapport au centre du faisceau incident :

$$d = \sqrt{y_n^2 + z_n^2} \qquad \text{(II.27)}$$

avec y_n et z_n les positions d'arrivée de chaque fragment neutre traité.

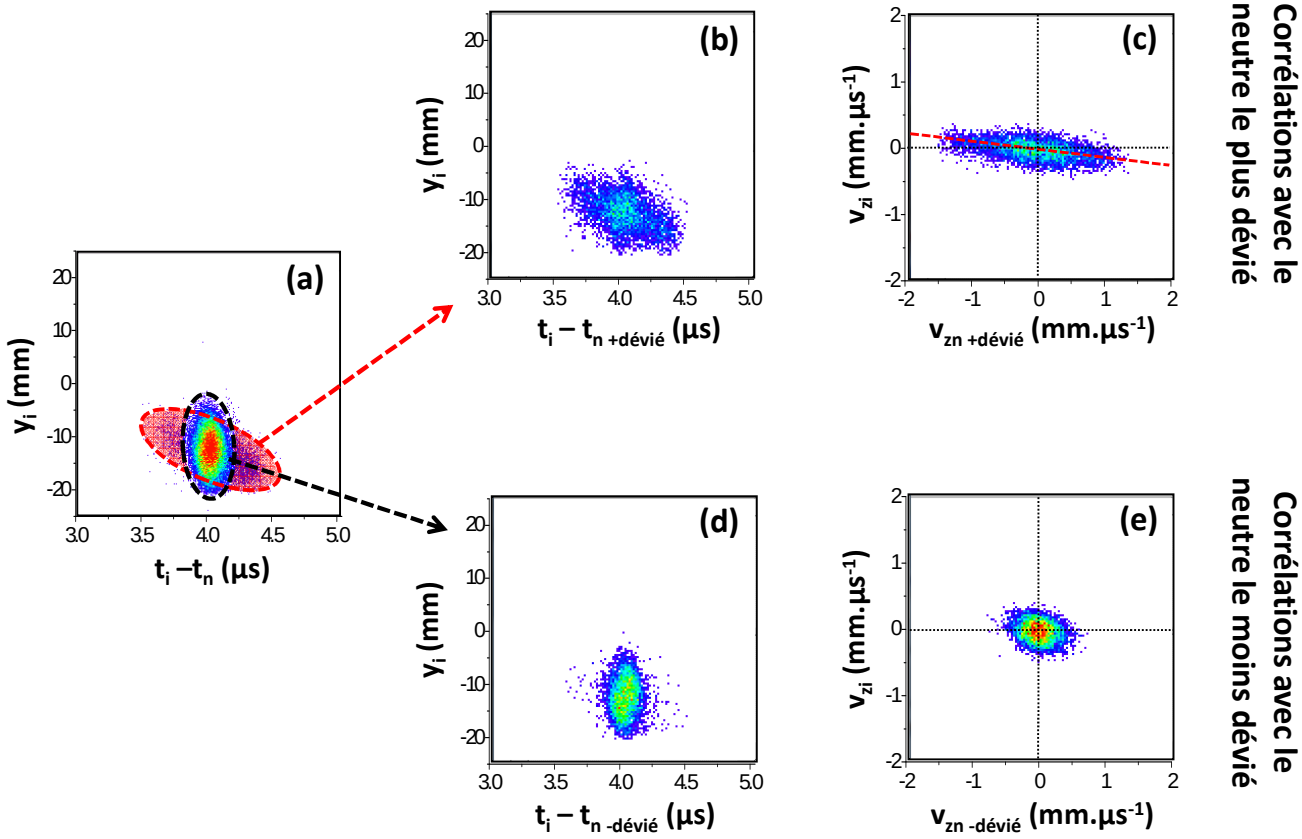


figure II.24 : Diagrammes enregistrés pour l'ion final m/z 159 de Trp-Gly-H$^+$ (m/z 262). Diagramme (a) : simples coïncidence. Diagrammes (b) à (e) : multicoïncidence avec séparation des neutres suivant leur déviation relative. Diagrammes (b) et (c) : corrélation entre l'ion final m/z 159 et le neutre le plus dévié N(y_i, t_i - $t_{n\ +dévié}$) et N(v_{zi}, $v_{zn\ +dévié}$). La modélisation de la pente du diagramme (c), R = - 0.12, est représentée en trait pointillé rouge. Diagrammes (d) et (e) : corrélation entre l'ion m/z 159 et le neutre le moins dévié N(y_i, t_i - $t_{n\ -dévié}$) et N(v_{zi}, $v_{zn\ -dévié}$).

Les contributions dues aux neutres les plus et les moins déviés sont superposées sur le diagramme (a) de la figure II.24. Ces deux contributions sont différenciées par un traitement en multicoïncidence présenté sur diagammes (b), (c), (d) et (e) de la figure II.24. Le diagramme N(v_{zi}, $v_{zn+dévié}$), diagramme (c) montre une forme allongée avec une petite pente correspondant à un neutre de petite masse éjecté. La mesure de cette pente R = -0.12 donne une indication sur la masse du fragment neutre le plus dévié donc le plus léger. Le diagramme N(v_{zi}, $v_{zn\ -dévié}$), diagramme (e) montre une forme quasiment ronde, dont la pente n'est pas exploitable. Les évènements des diagrammes (d) et (e) sont relatifs à tous les fragments neutres détectés en coïncidence avec l'ion *m/z* 159, émis dans une direction très proche de celle du faisceau incident et ne donnent pas d'indications sur la masse du fragment le plus lourd. Pour éliminer ces évènements, proche de 0° et obtenir une corrélation plus nette entre l'ion final et le neutre le moins

dévié, on sélectionne parmi les neutres les plus déviés, uniquement ceux qui ont le plus grand KER. Cette sélection, effectuée sur le diagramme N(y_i, $t_i - t_{n\ +dévié}$), est indiquée sur la figure II.25(a). les évènements sélectionnés permettent de tracer le diagramme N(v_{zi}, $v_{zn\ -dévié}$) de la figure II.25(b).

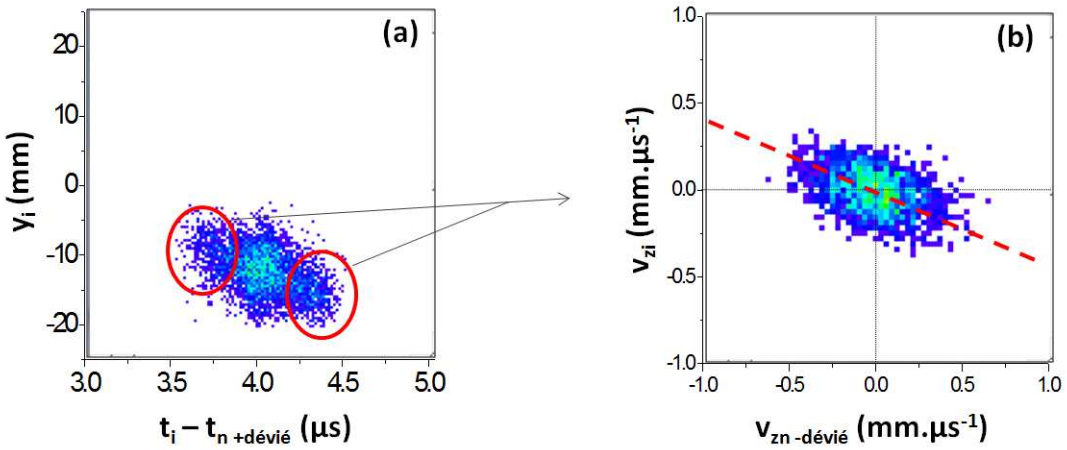


figure II.25 : Diagrammes de multicoïncidence (i, $n_{+\ dévié}$, $n_{-\ dévié}$), enregistrés pour l'ion m/z 159 de la molécule Trp-Gly-H$^+$ (m/z 262). Sur le diagramme (a), N(y_i, t_i - $t_{n\ -dévié}$), les cercles rouges indiquent les évènements sélectionnés pour construire le diagramme (b) N(v_{zi}, $v_{zn\ -dévié}$). La modélisation R = - 0.32, de la pente du diagramme (b) est représentée en trait pointillé rouge

Sur le diagramme N(v_{zi}, $v_{zn\ -dévié}$) de la figure II.25(b), on observe une structure un peu plus linéaire que celle du diagramme (e) de la figure II.24. Nous avons mesuré une pente R = - 0.32 associée à cette structure. Cette pente est plus grande que celle mesurée pour le diagramme N(v_{zi}, $v_{zn\ +dévié}$), de la figure II.24(c) (R = -0.12). Cela confirme clairement l'éjection additionnelle d'un fragment neutre plus lourd moins dévié. Deux scénarios sont alors possibles pour une fragmentation en deux étapes :

- soit le neutre léger ($n_{+\ dévié}$) est émis lors de la 1ère étape de fragmentation et le neutre lourd ($n_{-\ dévié}$) lors de la 2e ,
- soit le neutre lourd est émis lors de la 1ère étape et le neutre léger lors de la 2e.

Ces étapes sont trop rapides pour permettre une séparation temporelle de la séquence de fragmentation comme dans le cas précédent ($\tau_1 \ll \tau_2$). On examine donc les masses des fragments neutres émis pour les deux hypothèses.

On notera maintenant N_+ le neutre léger (le plus dévié) et m_{n+} sa masse et N_- le neutre lourd (le moins dévié) de masse m_{n-} . On examine la pente R obtenue sur les diagrammes N(v_{zi2}, v_{zn+}) et

N(v_{zi2}, v_{zn-}), figure II.24(c) et figure II.25(b), que l'on compare aux pentes théoriques correspondant aux différentes hypothèses de mécanismes possibles.

Considérons d'abord le neutre léger. Si il est émis lors de la 1ère étape, on le notera $N_{+(1)}$ de masse $m_{n+(1)}$ et si il est émis lors de la 2e étape, il sera noté $N_{+(2)}$ de masse $m_{n+(2)}$. Soit m_{i0} la masse de l'ion parent *m/z* 262, m_{i2} la masse de l'ion final *m/z* 159 et m_{i1} la masse de l'ion intermédiaire.

Prenons d'abord le cas où le neutre léger N_+ est émis lors de la 2e étape de fragmentation :

$$I_0 \rightarrow I_1 + N_1$$

$$I_1 \rightarrow I_2 + N_{+(2)}$$

D'après la conservation de la quantité de mouvement appliquée dans le centre de masse de l'ion intermédiaire I_1 :

$$m_{i2}\vec{v}_{i2} + m_{n+(2)}\vec{v}_{n+(2)} = \vec{0} \qquad \text{(II.28)}$$

Les données expérimentales utilisées $\vec{v}_{zi2}$ et $\vec{v}_{zn+(2)}$ sont exprimées par rapport au centre du faisceau incident et non par rapport au centre de masse de l'ion I_1. En utilisant ces données, on néglige la déviation provoquée par la première fragmentation ($\vec{v}_{i1}$) qui produit une structure de symétrie cylindrique autour de l'axe incident. Le diagramme N(v_{zi2}, v_{zn+}), figure II.24(c), présente alors un motif linéaire, élargi par la première fragmentation, de pente :

$$R = -\frac{v_{zi2}}{v_{zn+(2)}} = -\frac{m_{n+(2)}}{m_{i2}} \text{, d'après l'équation (II.28)} \qquad \text{(II.29)}$$

A partir de la valeur expérimentale de R, on calcule $m_{n+(2)} = -R \times m_{i2}$

Si le neutre léger N_+ est émis en premier, suivant la réaction :

$$I_0 \rightarrow I_1 + N_{+(1)}$$

$$I_1 \rightarrow I_2 + N_2$$

D'après la conservation de la quantité de mouvement dans le centre de masse de I_0 :

$$m_{i1}\vec{v}_{zi1} + m_{n+(1)}\vec{v}_{zn+(1)} = \vec{0} \qquad \text{(II.30)}$$

La deuxième étape de fragmentation dévie la trajectoire de l'ion I_2 par rapport à celle de I_1. En corrélant les déviations de l'ion I_2 et du neutre $N_{+(1)}$ on obtient des points alignés comme pour

une fragmentation binaire. La deuxième étape de fragmentation induit uniquement un élargissement de cette distribution mais ne change pas la pente.

La pente R du diagramme N(v_{zi2}, v_{zn+}), figure II.24(c), nous permet d'obtenir des informations sur la masse $m_{n+(1)}$ du neutre le plus dévié dans le cas où il est émis en premier :

$$R = -\frac{m_{n+(1)}}{m_{i1}} = -\frac{m_{n+(1)}}{m_{i0}-m_{n+(1)}} \qquad \text{(II.31)}$$

A partir de la mesure expérimentale R, on calcule $m_{n+(1)} = -\frac{R \times m_{i0}}{1-R}$

Le même raisonnement est appliqué pour le neutre lourd N_{-} , pour les deux mêmes hypothèses, en utilisant la pente R = -0.32 du diagramme N(v_{zi2}, v_{zn-}) de la figure II.25(b).

La mesure de la pente du neutre léger est beaucoup plus fiable que celle du neutre lourd. Nous ne considèrerons donc que le calcul des masses à partir du neutre le plus dévié. Les résultats des calculs effectués avec $N_{+dévié}$ sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	$N_{+dévié}$	Neutre complémentaire
Pente R mesurée expérimentalement	- 0.122	
Masse calculée pour $N_{+dévié}$ émis en 1er	28.5 ≈ 28 (CO)	75
Masse calculée pour $N_{+dévié}$ émis en 2e	19.4 ≈ 18 (H_2O) ou 17 (NH_3)	85 ou 86

tableau II.3 : Calculs des masses du neutre le plus dévié à partir de la pente mesurée expérimentalement sur le diagramme (c) de la figure II.24, pour les deux mécanismes possibles.

Ce traitement en multicoïncidence nous permet de conclure que

- soit le neutre le plus dévié est émis en 1er et il s'agit d'une molécule de CO
- soit le neutre le plus dévié est émis lors de la 2ème étape et correspond à une molécule de NH_3 ou de H_2O

Ce traitement ne nous permet pas de déterminer la dynamique de fragmentation de manière univoque mais nous permet de proposer deux scénarios possibles. Des calculs de chemin réactionnel devront permettre de valider l'un ou l'autre des scénarios.

II.6.3.3 Analyse des temps de fragmentation

Nous avons vu que le KER provoquait un élargissement d'environ 40 ns pour une fragmentation directe. Si les deux fragmentations se produisent en moins de 40 ns, il n'est pas possible de différencier k_1 de k_2. Dans la plupart des expériences où nous avons observé un mécanisme séquentiel, où $\tau_1 \approx \tau_2$ (< 100 ns), il n'est pas possible de mesurer de façon indépendante chacune des constantes k_1 et k_2 car on ne peut pas séparer temporellement les fragments neutres émis. On peut cependant effectuer une mesure du temps global de fragmentation par rapport à la quantité d'ions finaux formés par unités de temps. On modélise, comme dans le cas d'une fragmentation directe, la décroissance en y_i observée pour l'ion final[10].

Dans des réactions successives, la cinétique est gouvernée par l'étape la plus lente. Le temps de fragmentation global mesuré correspond donc à l'étape la plus lente que ce soit la 1ère ou la 2e étape de fragmentation. Notons que dans certains cas, le programme de simulation peut nous indiquer quelle est la plus lente ou la plus rapide des deux étapes.

II.7 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons détaillé l'analyse des résultats expérimentaux qui seront présentés dans les chapitres suivants. Tous les résultats présentés par la suite sont enregistrés avec un taux de comptage choisi pour avoir un minimum de fausses coïncidences. Néanmoins, on ne peut pas toujours s'affranchir des fragmentations produites par collisions avec le gaz résiduel. Dans la suite, nous faisons en sorte de filtrer ces collisions le plus possible.

Les diagrammes de corrélation nous fournissent d'importantes informations concernant la dynamique de fragmentation du système. Les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ permettent de vérifier si les fragments détectés sont issus d'un processus de fragmentation direct ou séquentiel. Les diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ permettent, avec l'aide du programme de simulation, de déterminer les masses des différents canaux de fragmentation détectés. Sur un diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$, la projection sur l'axe $\vec{y_i}$ des évènements enregistrés avec la zone polarisée en champ électrique permet de mesurer avec précision la constante de temps de fragmentation associée au canal

[10] On ne peut pas utiliser la décroissance en t_n car elle est formée par une partie de la décroissance liée aux deux neutres

sélectionné si celle-ci est comprise entre 20 ns et 500 ns. La limite de résolution de 20 ns des temps de fragmentation mesurés est due à l'élargissement temporel provoqué par l'énergie cinétique relative des fragments (KER). Les constantes de temps allant de 500 ns à quelques microsecondes sont estimées en comparant la quantité de fragments produits à l'intérieur de la zone polarisée à la quantité de fragments produits à l'extérieur.

Une fragmentation séquentielle est traitée en multicoïncidence et analysée uniquement si l'on peut séparer temporellement, ou suivant leur énergie cinétique relative, les différents fragments neutres associés à chaque évènement. L'incertitude obtenue sur la masse des fragments neutres est de l'ordre de 3%. Le programme de simulation nous aide à déterminer les masses des différents fragments émis, le temps global de fragmentation associé à ce mécanisme et permet dans certains cas d'estimer le temps de fragmentation associé à chaque étape. Si on ne peut ni séparer temporellement les fragments neutres, ni les séparer suivant leur énergie cinétique relative, le mécanisme séquentiel observé ne peut être analysé.

Bibliographie

1. V. Stert, W. Radloff, C.P. Schulz, I.V. Hertel, *Ultrafast photoelectron spectroscopy: Femtosecond pump-probe coincidence detection of ammonia cluster ions and electrons*, Eur. Phys. J. D **5**, 97 (1999)
2. V. Lepere, *Dynamique de photofragmentation de petits agrégats d'Argon et de molécules biologiques : nouvel outil par piégeage et corrélation vectorielle*, in *LCAM*. 2006, Université Paris-Sud 11: Orsay.
3. J.I. Steinfeld, J.S. Francisco, W.L. Hase, *Chemical kinetics and dynamics*. Englewood Cliffs, ed. Prentice-Hall. 1989, New Jersey 07632.

Annexe 1

On démontre ici la relation linéaire qui relie le temps de vol des fragments neutres t_n au temps T_f de fragmentation dans la zone polarisée.

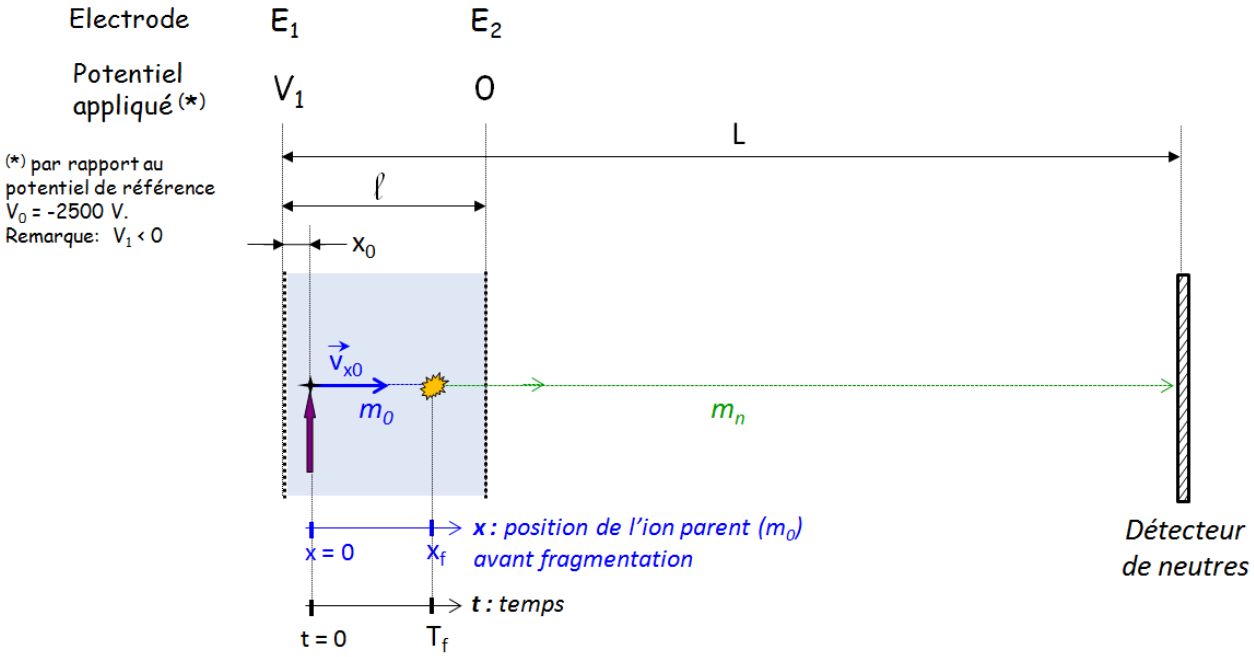


figure II.26 : Définition des paramètres nécessaires au calcul du temps de vol t_n des fragments neutres en fonction du temps de fragmentation T_f de l'ion parent dans la zone d'interaction polarisée par un champ électrique.

Les ions parents de masse m_0 sont décélérés par la tension V_1 appliquée entre les électrodes E_1 et E_2 séparées d'une distance ℓ. Cette décélération notée γ est telle que :

(II.32) $$\gamma = \frac{qV_1}{m_0 \ell}$$

Au temps t = 0, les ions parents ont une vitesse v_{X0} en x_0, lieu de l'interaction ions-laser, situé 1 mm en aval de l'électrode E_1 ; qV_0 étant l'énergie des ions incidents avant la zone polarisée

(II.33) $$v_{x0} = \sqrt{\frac{2}{m_0} q \left(V_0 + V_1 \left(\frac{\ell - x_0}{\ell}\right)\right)}$$

En intégrant l'équation du mouvement, on détermine la position x_f et le temps T_f de fragmentation dans la zone polarisée.

(II.34) $$x_f = -\frac{1}{2}\gamma\, T_f^2 + v_{x0} T_f = T_f v_{x0} \left(1 - \frac{1}{2}\frac{\gamma}{v_{x0}} T_f\right)$$

On calcule $\frac{\gamma}{v_{x0}}\ T_f = \mathbf{4,46.10^{-2}}$ (pour V_1 = 400 Volts, V_0 = 5 kVolts, m_0 = 205 uma, ℓ = 12 mm, x_0 = 1 mm et T_f = 200 ns). Donc $\frac{\gamma}{v_{x0}}\ \mathbf{T_f} \ll \mathbf{1}$.

On effectue un développement limité de l'équation (II.34), à l'ordre 1 en T_f :

(II.35) $$x_f \approx v_{x0} T_f$$

Les ions ont une énergie cinétique initiale de 5000 Volts. L'effet de la décélération γ (plusieurs centaines de Volts) est donc négligeable sur la distance parcourue par les ions avant fragmentation (quelques mm).

Le temps de vol t_n des fragments neutres entre l'interaction laser et leur arrivée sur le détecteur s'exprime par la relation ci-dessous où le premier terme est le temps de vol de l'ion parent avant fragmentation et le deuxième terme le temps de vol libre d'un fragment neutre formé jusqu'à son arrivée au détecteur (distance L parcourue, environ 1 m) :

(II.36) $$t_n = T_f + \frac{L - x_0 - x_f}{-\gamma T_f + v_{x0}} = T_f + \left(\frac{L - x_0 - x_f}{v_{x0}}\right)\left(\frac{1}{1 - \frac{\gamma}{v_{x0}} T_f}\right)$$

De même, on effectue un développement limité à l'ordre 1 en T_f et on remplace x_f par l'expression obtenue équation (II.35) :

(II.37) $$t_n \approx T_f + \left(\frac{L - x_0}{v_{x0}} - T_f\right)\left(1 + \frac{\gamma}{v_{x0}} T_f\right)$$

On obtient l'expression suivante pour t_n, à l'ordre 1 en T_f :

(II.38) $$t_n \approx \frac{L - x_0}{v_{x0}} + \frac{\gamma (L - x_0)}{{v_{x0}}^2} T_f$$

Ce qui nous permet d'exprimer T_f en fonction de t_n :

(II.39) $$\mathbf{T_f} \approx -\frac{v_{x0}}{\gamma} + \frac{{v_{x0}}^2}{\gamma (L - x_0)} \mathbf{t_n}$$

De même montrons qu'il existe une relation linéaire entre le temps de fragmentation T_f et la position d'arrivée y_i d'un fragment ionique de masse m_i.

Dans le chapitre précédent nous avons établi la relation suivante qui existe en y_i et v_i, la vitesse des ions fragments à l'entrée de l'analyseur électrostatique :

(II.40) $$y_i = \frac{v_i^2 m_i h}{q V_a} - y_{galion}$$

avec h : hauteur de l'analyseur ; V_a : tension appliquée à l'analyseur ; y_{galion} : distance entre l'entrée du faisceau incident au niveau de l'analyseur et le centre du détecteur d'ions.

Nous allons chercher à exprimer v_i^2 en fonction du temps de fragmentation T_f. Le champ électrique est constant entre la sortie de la zone d'interaction et l'entrée de l'analyseur électrostatique. La vitesse du fragment ionique à la sortie de la zone d'interaction $v_{i(sortie)}$ est donc égale à celle qu'il a à l'entrée de l'analyseur électrostatique $v_{i(ana)}$. Nous devons donc exprimer $v_{i(sortie)}$ en fonction de T_f en tenant compte de la décélération de l'ion parent et de l'ion fragment dans la zone d'interaction.

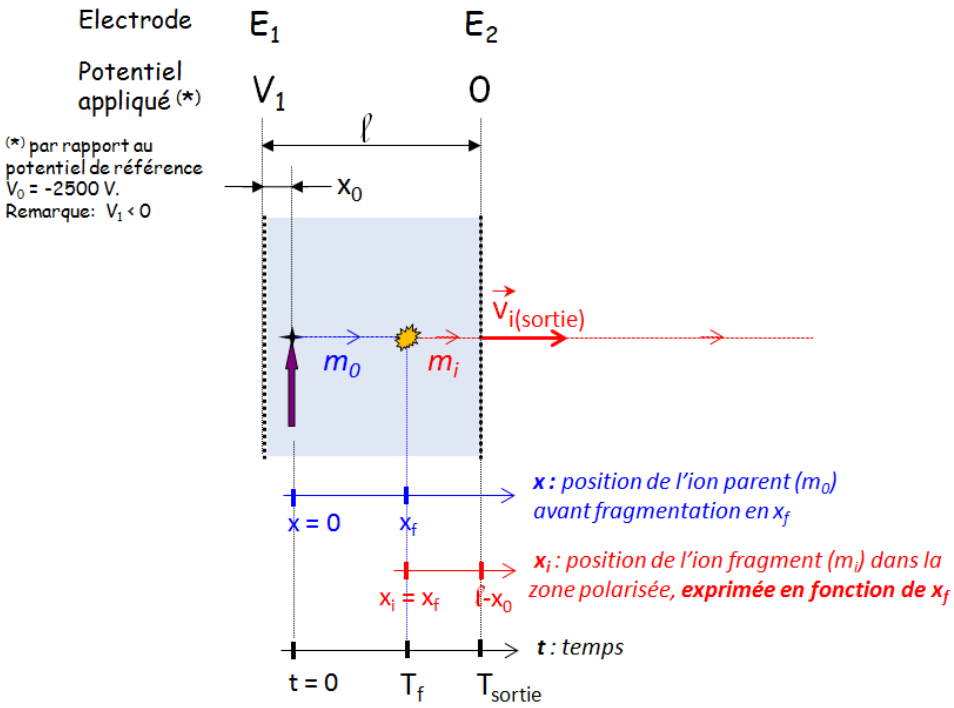


figure II.27 : Définition des paramètres nécessaires au calcul de la position y_i des fragments ioniques en fonction du temps de fragmentation T_f de l'ion parent dans la zone d'interaction polarisée par un champ électrique.

Reprenons l'équation du mouvement de l'ion parent dans la zone d'interaction (II.34) et exprimons, sans négliger la décélération, T_f en fonction de x_f, position de l'ion parent après interaction laser:

(II.41) $$T_f = \frac{1}{\gamma}\left(v_{x0} - \sqrt{v_{x0}^2 - 2\gamma\, x_f}\right)$$

(II.42) $$v_f = -\gamma T_f + v_{x0} = \sqrt{v_{x0}^2 - 2\gamma\, x_f}$$

Le fragment ionique de masse m_i est produit dans la zone polarisée en x_f ($0 \leq x_f \leq \ell - x_0$) avec une vitesse v_f. Ce fragment ionique subit ensuite une décélération γ_i telle que :

(II.43) $$\gamma_i = \frac{qV_1}{m_i \ell}$$

On en déduit les équations du mouvement de ce fragment ionique :

(II.44) $$v_i = -\gamma_i t + v_f$$

(II.45) $$x_i = -\frac{1}{2}\gamma_i\, t^2 + v_f t + x_f$$

Donc

(II.46) $$t = \frac{1}{\gamma_i}\left(v_f - \sqrt{v_f^2 - 2\gamma_i(x_i - x_f)}\right)$$

A la sortie de la zone d'interaction, en $xi = \ell - x_0$, $t = T_{(sortie)}$ et $v_i = v_{i(sortie)}$, l'équation (II.46) devient :

(II.47) $$T_{(sortie)} = \frac{1}{\gamma_i}\left(v_f - \sqrt{v_f^2 - 2\gamma_i(\ell - x_0 - x_f)}\right)$$

(II.48) $$v_{i(sortie)} = -\gamma_i T_{(sortie)} + v_f = \sqrt{v_f^2 - 2\gamma_i(\ell - x_0 - x_f)}$$

L'équation (II.42) donne l'expression de v_f en fonction de x_f, puis à l'aide du développement limité $x_f \approx v_{x0} T_f$, on peut exprimer $v_{i(sortie)}$ en fonction de T_f :

(II.49) $$v_{i(sortie)}^2 = v_{x0}^2 - 2\gamma_i(L - x_0) + 2(\gamma_i - \gamma)v_{x0}T_f = v_{i(ana)}^2$$

En insérant la relation ci-dessus dans l'équation (II.40), on définit y_i en fonction de T_f puis T_f en fonction de y_i :

(II.50) $$y_i = (v_{x0}^2 - 2\gamma_i(L - x_0) + 2(\gamma_i - \gamma)v_{x0}T_f)\frac{m_i h}{qV_a} - y_{galion}$$

(II.51) $$\mathbf{T_f = \frac{1}{2(\gamma_i - \gamma)v_{x0}}\left(\frac{y_{galion}qV_a}{m_i h} - v_{x0}^2 + 2\gamma_i(L - x_0)\right) + \frac{qV_a}{2m_i h(\gamma_i - \gamma)v_{x0}}y_i}$$

Annexe 2

Elargissement en y_i

L'énergie cinétique E_i d'un fragment ionique de masse m_i, est de la forme :

(II.52) $$E_i = \frac{1}{2} m_i V_i^2 = \frac{1}{2} m_i (V_0 + v_i)^2 = \frac{1}{2} m_i V_0^2 + \frac{1}{2} m_i v_i^2 + m_i V_0 v_i$$

Avec V_i la vitesse de l'ion fragment dans le référentiel du laboratoire, v_i sa vitesse dans le référentiel moléculaire et V_0 la vitesse de l'ion incident dans le référentiel du laboratoire. Le terme en v_i^2 et négligeable devant celui en V_0^2. Le terme en $V_0 v_i$ représente un effet amplificateur dû au KER. C'est cet effet amplificateur qui provoque l'élargissement observé en y_i.

<u>Effet du KER sur l'élargissement en y_i</u>

La position y_i est définie par l'expression suivante, démontrée au chapitre I : $y_i = \frac{2E_i h}{qV_a} - y_{galion}$. Par différentiation , on obtient :

(II.53) $$\Delta y_i = \frac{2h}{qV_a} \times \Delta E_i$$

On définit la variation d'énergie ΔE_i due au KER comme la différence maximale d'énergie à l'entrée de l'analyseur électrostatique entre deux ions de même nature émis à l'extérieur de la zone polarisée :

(II.54) $$\Delta E_i = \frac{1}{2} m_i [(v_0 + v_i)^2 - (v_0 - v_i)^2] = 2 m_i v_0 v_i$$

On introduit l'expression ci-dessus dans l'équation (II.53) en remplaçant v_0 et v_i par leurs expressions démontrées au chapitre I, $v_0 = \sqrt{\frac{2\,E_0}{m_0}}$ et $v_i = \sqrt{\frac{2\,KER\,m_n}{m_0\,m_i}}$, ce qui nous permet de définir l'élargissement Δy_i dû au KER :

(II.55) $$\boldsymbol{\Delta y_i = \frac{8h}{qV_a} \sqrt{\frac{E_0\,KER\,m_n m_i}{m_0^2}}}$$

<u>Application numérique et comparaison aux résultats expérimentaux</u>

On calcule Δy_i pour : h = 152.9 mm ; V_a = 2290 Volts ; E_0 = 5000 Volts ; m_0 = 319 uma ; m_i = 245 uma ; m_n = 74 uma ; dans le cas d'un KER de 100 mV et d'un KER de 50 mV. Les résultats du calcul sont présentés dans le tableau II.4. Ce tableau présente également la valeur de la largeur

à mi-hauteur donnée par la modélisation des résultats expérimentaux présentés figure II.13(a) : FWHM = σ*2.35. Ici, σ = 15 ns donc $FWHM_{(exp)}$ = 35 ns. On utilise la relation linéaire $\Delta T_f = 9.18*\Delta y_i$, établie à l'aide de l'expression (II.51) de l'annexe 1, pour calculer ΔT_f (ns) en fonction de Δy_i (mm) ou inversement.

	Pic y_i	
	Δy_i	ΔT_f
Calcul pour KER = 100 mV	5 mm	46 ns
Calcul pour KER = 50 mV	3.6 mm	33 ns
Mesure expérimentale	3.8 mm	35 ns

tableau II.4 : Comparaison de l'élargissement du pic y_i des résultats expérimentaux de la figure II.13(a), page 102, à l'élargissement calculé pour un KER de 100 et 50 mV à partir des mêmes données expérimentales.

L'estimation de l'élargissement de la distribution Δy_i due au KER est en bonne concordance avec le résultat expérimental. Certes la comparaison n'est pas totalement rigoureuse. En effet, le calcul présenté ici n'a été effectué que pour une seule valeur du KER (50 ou 100 mV) et ne tient pas compte du fait que le KER est une distribution du KER. L'élargissement ΔT_f associé reproduit cependant assez bien le résultat expérimental donné par la modélisation (FWHM = 35 ns).

Elargissement en t_n

Ici on considère plusieurs incertitudes : l'élargissement en t_n lié au KER, à la largeur temporelle et à la largeur spatiale de l'impulsion laser.

<u>Elargissement du t_n lié au KER :</u>

L'élargissement Δt_n dû au KER correspond à la différence maximale de temps de vol de deux fragments neutres émis. On considère une distance L parcourue, L ≈ 1.025 m, allant de la l'interaction laser dans la zone non-polarisée jusqu'au détecteur (trajectoire de vol libre dans une zone sans champ) :

(II.56) $$\Delta t_n = \left| L\left(\frac{1}{v_0 + v_n} - \frac{1}{v_0 - v_n}\right)\right| = \frac{2Lv_n}{v_0^2 - v_n^2} = \frac{2Lv_n}{v_0^2\left(1 - \left(\frac{v_n}{v_0}\right)^2\right)}$$

v_n est vitesse d'un fragment neutre exprimée dans le référentiel moléculaire et v_0 la vitesse de l'ion initial exprimée dans le référentiel du laboratoire. Comme v_n « v_0, on effectue un développement limité en v_n/v_0 afin d'exprime l'équation (II.56) à 1er ordre en v_n :

(II.57) $$\Delta t_n \approx \frac{2L}{v_0^2} v_n$$

On insère dans l'équation ci-dessus les expressions de v_n et v_0, $v_n = \sqrt{\frac{2\,KER\,m_i}{m_0\,m_n}}$ et $v_0 = \sqrt{\frac{2E_0}{m_0}}$, ce qui nous permet d'exprimer l'élargissement Δt_n dû au KER:

(II.58) $$\boldsymbol{\Delta t_n = L\sqrt{\frac{2\,KER\,m_0}{{E_0}^2}}\sqrt{\frac{m_i}{m_n}}}$$

Pour[11] un KER de 50 mV, on a $\mathbf{\Delta t_n = 215}$ **ns** et pour un KER de 100 mV, on a $\mathbf{\Delta t_n = 304}$ **ns**, calculés avec L = 1.025 m ; E_0 = 5000 eV ; m_0 = 319 uma ; m_i = 245 uma ; m_n = 74 uma .

Elargissement du t_n lié au recouvrement entre l'impulsion laser et le paquet d'ions :

Ce point a déjà été discuté dans le paragraphe II.3.2, page 86. Ne connaissant pas la largeur temporelle du paquet d'ions au niveau de la zone d'interaction polarisée, dans cette partie de l'expérience il est impossible d'évaluer cette contribution sur l'élargissement Δt_n. On sait juste que cet élargissement provoqué par le recouvrement temporel des paquets d'ions avec les impulsions laser, est inférieur à l'élargissement total observé expérimentalement en t_n.

Elargissement du t_n lié à la largeur spatiale de l'impulsion laser :

On considère un faisceau laser de diamètre 0.5 à 1 mm. On calcule le temps T_f mis par un ion parent pour fragmenter à la distance d. Cette distance est comptée par rapport à x_0 = 1 mm, dans une zone d'interaction de longueur ℓ = 12 mm polarisée par un potentiel V_1. En reprenant les équations du mouvement de l'ion parent données au début de l'annexe 1, (II.34) page 121, on en déduit :

(II.59) $$\mathrm{d} = -\frac{1}{2}\gamma\,{T_f}^2 + v_{x0}\,T_f$$

[11] Ces applications numériques sont effectuées en unités MKSA avec 1 eV = 1.60E^{-19} J et 1 uma = 1.66E^{-27} kg

avec $\gamma = \frac{qV_1}{m_0 \ell}$ et $v_{x0} = \sqrt{\frac{2}{m_0} q \left(V_0 + V_1 \left(\frac{\ell - x_0}{\ell}\right)\right)}$

L'équation (II.59) du second degré pour exprimer T_f ne présente qu'une solution correspondant à la réalité de notre expérience :

$$T_f = \frac{1}{\gamma}\left(v_{x0} - \sqrt{v_{x0}^2 - 2\gamma d}\right) \qquad \text{(II.60)}$$

On calcule $\gamma = 2.04.10^7$ m.s^{-2} pour V_1 = 810 Volts, m_0 = 319 uma et ℓ = 12 mm et on calculé v_{x0} = $5.89.10^4$ m.s^{-1}. On trouve donc une valeur **ΔT_f = 8 ns** pour un faisceau laser de diamètre d = 0.5 mm et **ΔT_f = 17 ns** si d = 1 mm.

Résumé des différentes applications numériques et comparaison aux résultats expérimentaux

Le tableau II.5 présente la valeur de largeur à mi-hauteur obtenue à partir de la modélisation du résultat expérimental de la figure II.13(b), page 102, où σ = 12 ns. Toutes les applications numériques effectuées sur l'élargissement en t_n sont résumés dans le tableau II.5. On utilise la relation linéaire $\Delta T_f = 0.171 * \Delta t_n$, établie à l'aide de l'expression (II.39) de l'annexe 1, pour calculer ΔT_f (ns) en fonction de Δt_n (ns) ou inversement. La valeur ainsi calculée est indiquée en italique.

	Pic t_n	
	Δt_n	ΔT_f
Mesure expérimentale	*165 ns*	28 ns
Calcul pour KER = 50 mV	215 ns	*37 ns*
Calcul pour KER = 100 mV	305 ns	*52 ns*
Largeur temporelle de l'impulsion laser	< 165 ns	*< 28 ns*
Largeur spatiale du point focal d = 0.5 mm	*45 ns*	8 ns
Largeur spatiale du point focal d = 1 mm	*100 ns*	17 ns

tableau II.5 : Comparaison de l'élargissement du pic t_n des résultats expérimentaux de la figure II.13(c), page 102, à l'élargissement calculé pour un KER de 100 et 50 mV et pour une largeur du point focal de 1 et 0,5 mm, à partir des données expérimentales de la figure II.13(c).

Les estimations des élargissements calculés pour des KER de 50 mV et 100 mV correspondent respectivement à des élargissements temporels Δt_n de 200 et 300 ns. Ces valeurs sont légèrement supérieures au Δt_n donné par la modélisation expérimentale, de 165 ns. Le calcul effectué pour le KER ne tient pas compte du fait que cette énergie cinétique est répartie sur l'ensemble des fragments détectés. Le KER n'est pas traité en tant que distribution, ce qui explique pourquoi cette valeur calculée est supérieure aux résultats expérimentaux.

Nous avons calculé différentes composantes qui contribuent à l'élargissement en t_n. En considérant que chacune de ces incertitudes est une distribution gaussienne, les valeurs présentées dans le tableau II.5 sont considérées comme équivalentes à la largeur à mi-hauteur ($FWHM_{(i)}$) de chaque distribution. La largeur à mi-hauteur de la gaussienne qui exprime l'élargissement total en Δt_n est donnée par la relation :

$$\text{(II.61)} \qquad \text{FWHM} = \sqrt{\sum_i FWHM_{(i)}^2}.$$

D'après la relation (II.61) et les résultats du tableau II.5, nous en déduisons que la contribution de la taille du point focal sur l'élargissement total Δt_n est négligeable par rapport à l'effet d'élargissement provoqué par le KER. Cette information nous indique qu'il n'est pas nécessaire de focaliser plus le faisceau laser pour espérer gagner en résolution temporelle. Les paquets d'ions possèdent une taille transversale de 0,5 mm à 0,8 mm définie par la taille du diaphragme utilisé à l'entrée de la zone polarisée. En focalisant plus finement que sur 0,5 mm, on risque de diminuer le recouvrement *spatial* entre le laser et les paquets d'ions.

Comme le KER reproduit à lui tout seul l'élargissement expérimental observé, nous en déduisons que le recouvrement *temporel* entre les paquets d'ions et les impulsions laser contribue de façon mineure à l'élargissement total en t_n. Ceci indique que la durée du paquet d'ions est bien plus faible que la durée d'une impulsion laser (200 ns). Une mesure expérimentale est nécessaire afin de vérifier quelle est la largeur du paquet d'ions à cet endroit du dispositif (cf § II.3.2, page 86)

Conclusion

Dans le tableau II.6 sont résumées les différentes valeurs d'élargissement ΔT_f calculées en y_i et en t_n (élargissement total qui prend en compte une largeur de 0,5 mm pour le point focal), pour un

KER de 50 mV et un KER de 100 mV. L'élargissement dû au KER étant indiqué entre parenthèses. Ces valeurs sont comparées à celles déduites des deux modélisations de la figure II.13.

	Pic y_i	Pic t_n
Calcul pour KER = 100 mV	52 ns	55 ns *(52 ns)*
Calcul pour KER = 50 mV	37 ns	41 ns *(37 ns)*
Mesure expérimentale	35 ns	28 ns

tableau II.6 : Ce tableau présente les résultats obtenus pour l'élargissement ΔT_f, du temps de vol dans la zone d'interaction laser. Cet élargissement a été calculé à partir des mesures expérimentales (modélisation) de Δy_i et Δt_n et de façon analytique, pour un KER de 100 et de 50 mV. L'élargissement ΔT_f présenté ici a été calculé pour un élargissement total en Δt_n qui tient compte à la fois du KER (contribution indiquée entre parenthèses) et de la largeur du point focal (calcul effectué uniquement pour d = 0,5 mm)

Les élargissements calculés sont cohérents avec ceux déduits de la modélisation des résultats expérimentaux. Nous constatons que le KER est la principale source d'élargissement temporel sur la mesure des temps de fragmentation.

Cet élargissement dû au KER a été calculé et mesuré pour d'autres systèmes dans des conditions expérimentales différentes. Il provoque, en moyenne, un élargissement temporel de 30 à 40 ns sur le temps de vol T_f des ions dans la zone polarisée ainsi que sur les constantes de temps τ mesurées. Cet élargissement est de type gaussien. L'écart-type σ donné par la modélisation (cf page 102) représente le temps de montée de cette gaussienne. Cet écart-type est de l'ordre de 15 à 20 ns, en moyenne. Cela définit la limite de résolution des constantes de temps τ mesurées à partir les décroissances expérimentales en y_i et en t_n

CHAPITRE III

Comparaison de la photofragmentation du Tryptophane protoné isolé et complexé à un éther-couronne

CHAPITRE III. COMPARAISON DE LA PHOTOFRAGMENTATION DU TRYPTOPHANE PROTONÉ ISOLÉ ET SOLVATÉ PAR UN ÉTHER-COURONNE 133

III.1 Etat de l'art des connaissances sur la fragmentation du Trp-H^+ 134

III.2 Mécanismes de fragmentation dans l'état excité du Tryptophane protoné 139
III.2.1 Analyse des canaux de fragmentation *m/z* 130 et *m/z* 132 du Trp-H^+ 139
III.2.2 Rupture de la liaison C_α-C_β du Trp-H^+, de la Tyr-H^+ et de leurs dérivés décarboxylés 142
III.2.3 Etats excités du Trp-H^+ impliqués dans les mécanismes UVPD 147
III.2.4 Modèle de transfert d'électron / transfert de H^+ 149

III.3 Influence d'un éther-couronne sur les mécanismes de transfert de proton 152
III.3.1 Résultats obtenus avec le piège électrostatique 154
III.3.2 Résultats obtenus avec la zone polarisée 156
III.3.3 Discussion sur les temps de fragmentation statistiques observés 162
III.3.4 Perte de NH_3(CE) dans l'état excité 163
III.3.5 Discussion sur les temps de fragmentation non-statistiques 165

III.4 Comparaison avec les expériences effectuées à Aarhus 167
III.4.1 Principe des expériences réalisées à Aarhus 167
III.4.2 Comparaison des résultats obtenus 168
III.4.3 Différence entre les deux dispositifs expérimentaux d'Aarhus et d'Orsay 170

III.5 Evaluation de l'énergie interne des molécules étudiées avec notre dispositif 171
III.5.1 Rappels sur la théorie RRKM 171
III.5.2 Calcul effectué 172
III.5.3 Résultats obtenus 172

III.6 Conclusion 176

Bibliographie 178

CHAPITRE III. Comparaison de la photofragmentation du Tryptophane protoné isolé et solvaté par un éther-couronne

Seuls trois des acides aminés du vivant présentent un chromophore capable d'absorber le rayonnement UV. Il s'agit de la Phénylalanine, la Tyrosine et le Tryptophane. Le Tryptophane (Trp) est le plus étudié à cause de son fort rendement de fluorescence dans ce domaine spectral [1]. La molécule de Trp est présentée sur la figure III.1. Sa chaîne latérale est composée du chromophore indole. En nomenclature IUPAC [2] on utilise des lettres grecques pour désigner les différents hétéroatomes de la chaîne latérale d'un acide aminé, la lettre α étant attribuée au Carbone de la chaîne peptidique auquel est attachée la chaîne latérale. Les mécanismes de fragmentation de la liaison C_α-C_β du Trp-H^+ sont un des points importants de ce chapitre. Des calculs ont montré que le site de protonation privilégié du Trp en phase gazeuse comme en phase liquide est le N-terminal de la chaîne peptidique [3-5].

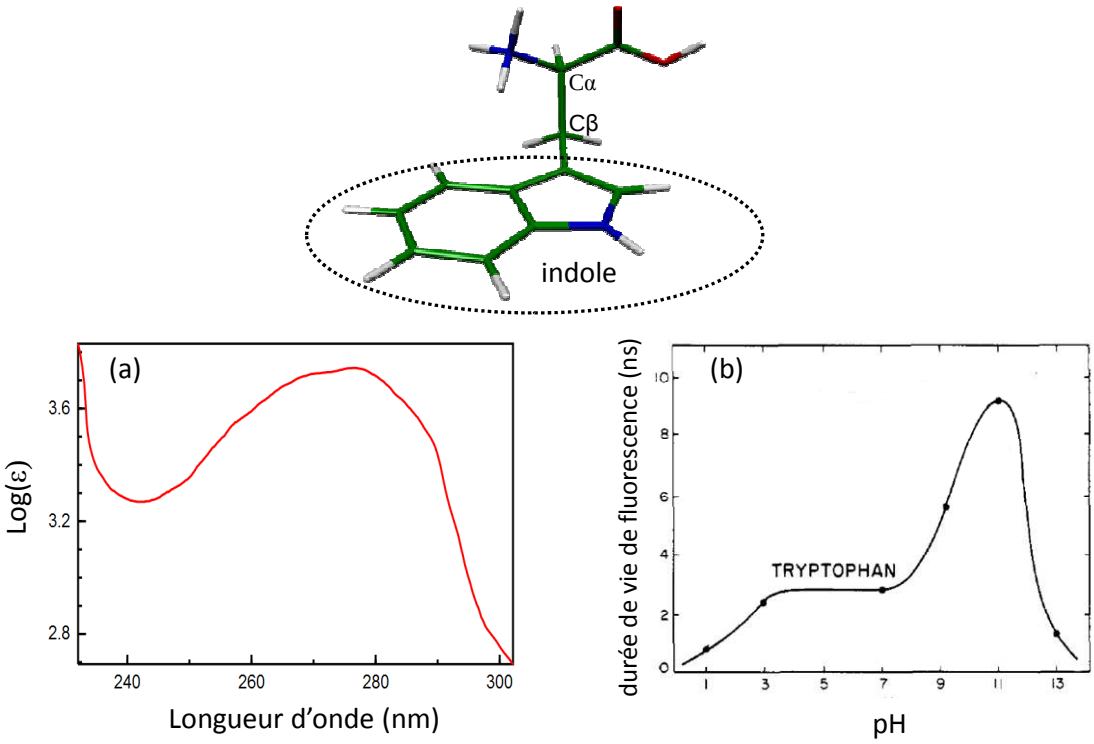


figure III.1 : Molécule de Tryptophane protoné ; spectre (a) : spectre d'absorption du Trp en phase liquide ; spectre (b) : évolution de la durée de vie de fluorescence en fonction du pH pour le Trp en solution à 18°C.

Le Trp est un marqueur fluorescent naturel présent dans les protéines [1]. Des cellules malignes et des cellules saines ne présentent pas le même profil de fluorescence [6, 7]. La compréhension des mécanismes de fluorescence peut permettre d'améliorer son efficacité pour la détection de cancer [8]. Pour cela, il faut tout d'abord comprendre les mécanismes photo-induits qui ont lieu au niveau de la molécule isolée.

Le temps de vie de fluorescence du Trp et son intensité varient de plusieurs ordres de grandeur quand le pH varie (figure III.1). Dans le domaine des faibles pH quand le Trp est protoné, les processus non-radiatifs prédominent [1]. H. Shizuka *et al.* [9] ont montré que l'intensité de fluorescence augmente de façon significative quand le Trp est complexé avec un éther-couronne. Cette observation suggère que le groupe ammonium joue un rôle clé dans le déclin radiatif du Trp.

Dans ce chapitre, après avoir présenté l'état de l'art en ce qui concerne la fragmentation du Trp-H$^+$, nous détaillons les mécanismes de fragmentation spécifiques UV du Trp-H$^+$ mis en évidence avec notre dispositif. Puis nous nous intéressons à l'influence d'un éther-couronne sur les mécanismes de photofragmentation du Trp-H$^+$. Ces résultats obtenus sur la molécule isolée et solvatée par un éther-couronne sont comparés aux résultats obtenus par l'équipe danoise d'Aarhus. Ce parallèle effectué entre nos deux types d'expériences nous a permis d'évaluer l'énergie interne des molécules que nous étudions.

III.1 Etat de l'art des connaissances sur la fragmentation du Trp-H$^+$

L'étude de la fragmentation d'acides aminés en phase gazeuse, par différentes méthodes (CID, ECD, UVPD, IRMPD…), a permis de mieux comprendre les propriétés énergétiques de ces molécules qui sont les briques élémentaires du vivant. Chaque méthode de fragmentation apporte un type particulier d'information que les autres méthodes ne fournissent pas. Toutes ces méthodes de fragmentation sont donc complémentaires.

Dans cette première partie nous présenterons les mécanismes de fragmentation CID du Trp-H$^+$ puis la spectroscopie UV très particulière du Trp-H$^+$ qui s'explique par la nature de ses états excités. Ensuite nous comparerons les photofragments UV du Trp-H$^+$ obtenus par spectrométrie de masse tandem à ceux observés avec notre dispositif expérimental.

La fragmentation du Tryptophane-H^+ (*m/z* 205) a d'abord été étudiée par CID [3, 10-12]. Les mécanismes correspondants ont été établis par spectrométrie de masse tandem (MS^n) et par échange Hydrogène / Deutérium. Le mécanisme de fragmentation proposé par El Aribi *et al.* [12] est présenté figure III.2.

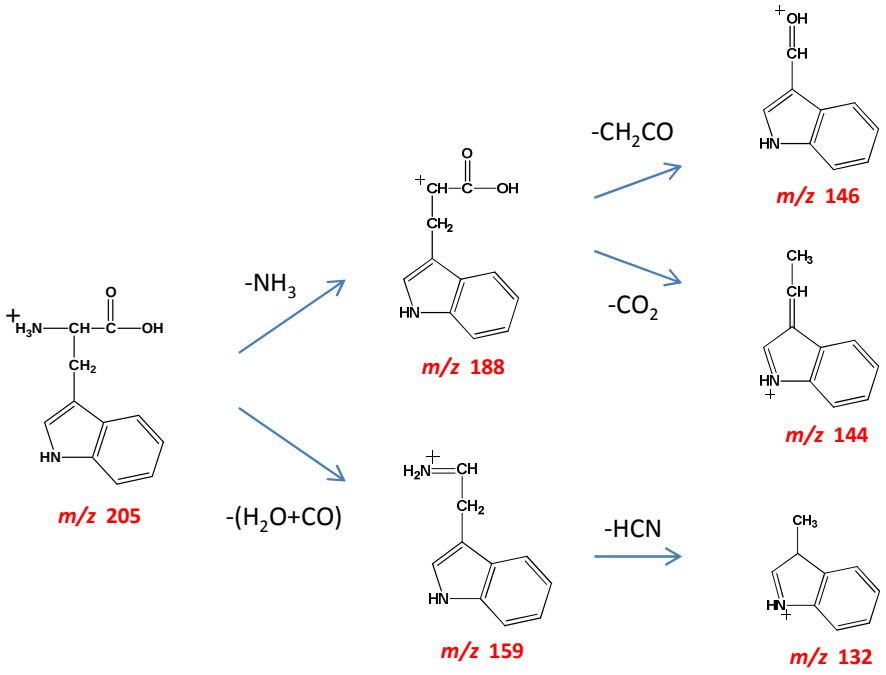


figure III.2 : Mécanisme CID/MS^n du Trp-H^+ proposé par El Aribi et al [12]

Avant d'évoquer les résultats obtenus par photofragmentation UV (UVPD) du Trp-H^+, il est nécessaire de s'intéresser à la spectroscopie UV de cette molécule. La différence observée entre le spectre UV très large du Trp-H^+ [5, 13, 14] et celui bien structuré du Trp neutre [15-19] (figure III.3) a suscité de nombreuses interrogations sur la nature des états excités de ces molécules. De façon surprenante, le spectre UV du Trp-H^+ reste très large même pour des expériences effectuées avec des molécules refroidies à quelques Kelvin [14].

(a) : image extraite de l'article de O.V. Boyarkin et al., J Am Chem Soc ***128****, 2816 (2006)*

(b) : image extraite de l'article de F. Piuzzi et al., Chem Phys Lett ***320****, 282 (2000)*

figure III.3 : spectres UV : (a) du Trp-H^+ à moins de 10 K [14] ; (b) du Trp neutre à 485 K [20]

L'élargissement spectral observé pour le Trp-H^+ a été expliqué par la présence d'un état excité dissociatif à très courte durée de vie (< 10 fs), spécifique du Trp-H^+ et absent pour la molécule neutre correspondante [21]. Kang *et al.* [22] ont suggéré qu'il s'agissait d'un état excité de symétrie πσ*, dissociatif le long d'une liaison N-H de l'ammonium (-NH_3^+) du Trp-H^+, conduisant à la perte d'un atome d'hydrogène et à la production de l'ion *m/z* 204. Cet état πσ* est représenté sur le diagramme d'énergie potentielle de la figure III.4. L'état ππ est l'état fondamental et l'état ππ*, l'état excité optiquement actif du Trp-H^+. La présence de l'état πσ* du Trp-H^+ a été mise en évidence par des expériences pompe-sonde effectuées avec des impulsions laser femtoseconde, complétées par des calculs ab initio [22-27].

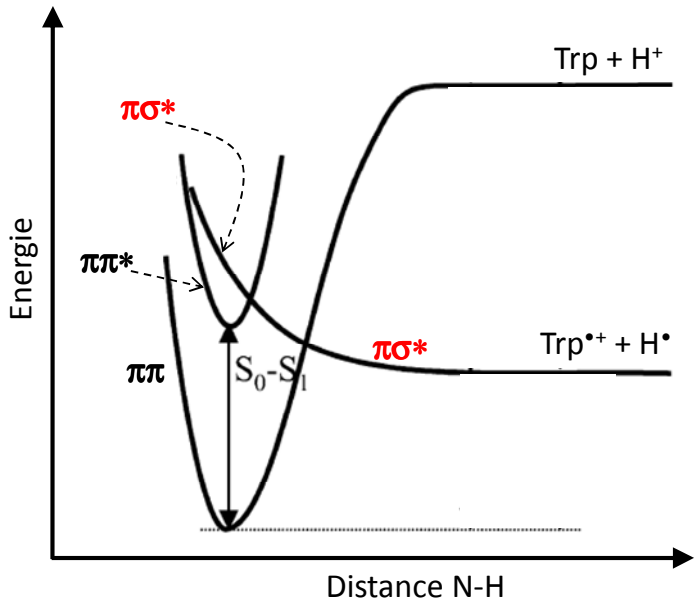


figure III.4 Représentation schématique des courbes d'énergie potentielle de TrpH$^+$ suivant la coordonnée NH

Parmi les mécanismes de photofragmentation UV du Trp-H^+, on observe des fragmentations induites dans l'état excité comme la perte de $H^\bullet$ (figure III.4) mais également des fragmentations qui se produisent après conversion interne vers l'état fondamental et redistribution vibrationnelle de l'énergie. Ce deuxième type de mécanisme induit des fragmentations semblables à celles observées en CID (figure III.2).

Talbot *et al.* [13] ont étudié la photofragmentation UV du Trp-H^+ par spectrométrie de masse tandem MS^3 avec un laser à 266 nm. Ces résultats sont résumés sur la figure III.5. Ils ont montré que le radical cation $Trp^{\bullet+}$ (*m/z* 204) produit après perte de $H^\bullet$ est instable et se désexcite en produisant un fragment *m/z* 130. L'ion *m/z* 204 et son fragment consécutif *m/z*

130 qui ne sont pas observés en CID sont des fragments spécifiques de la photodissociation UV du Trp-H^+.

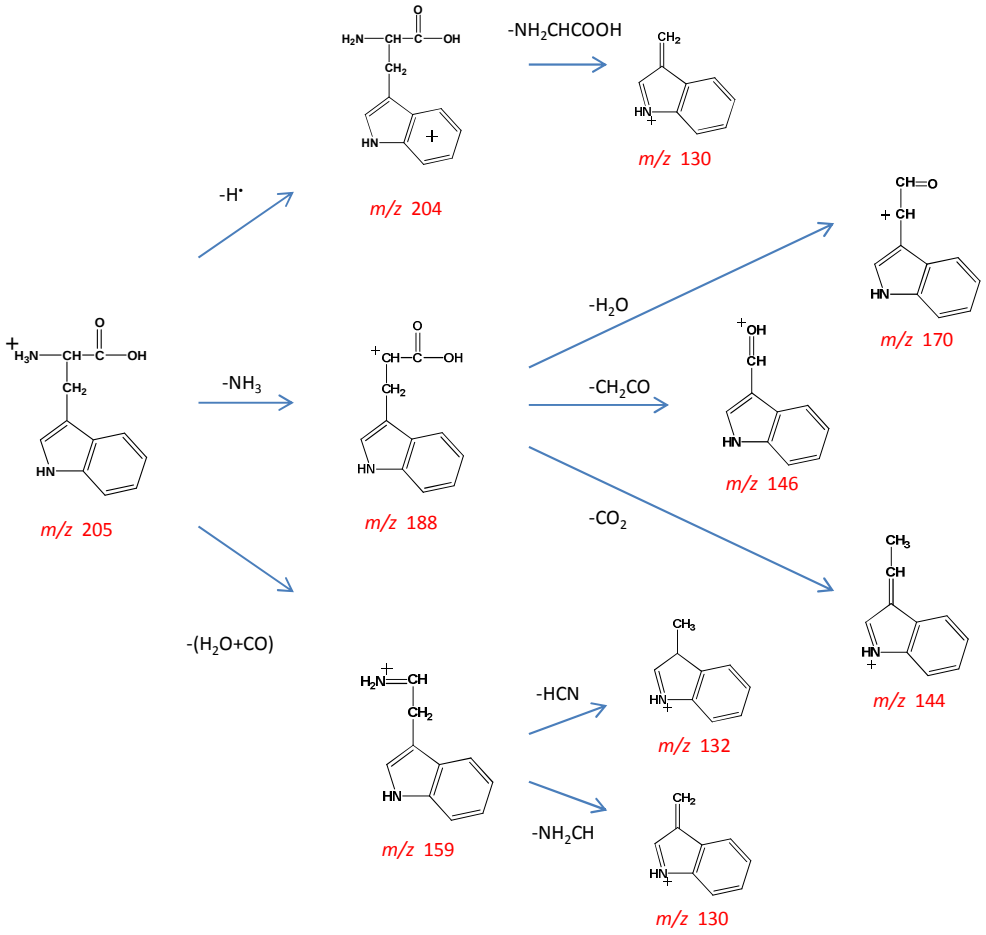


figure III.5 : Résultats UVPD obtenus pour le Trp-H^+ (m/z 205) par MS^3 [13]

Talbot *et al.* [13] ont également observé en UVPD des fragments identiques à ceux obtenus en CID, non-spécifiques UV, tels les ions *m/z* 188 et *m/z* 159 et leurs ions consécutifs (*m/z* 144, *m/z* 146, *m/z* 132...). On suppose que ces ions sont produits après redistribution vibrationnelle de l'énergie dans l'état fondamental. Suivant la quantité d'énergie vibrationnelle présente dans le système, on peut ouvrir ou pas certains canaux de fragmentation. C'est pourquoi on suppose que ce même mécanisme est à l'origine des ions *m/z* 170 consécutifs aux ions *m/z* 188 et des ions *m/z* 130 consécutifs à *m/z* 159 (figure III.5) bien qu'ils n'aient pas été observés par El Aribi *et al.* [12] en CID.

Notons sur la figure III.5 la présence de deux voies de production de l'ion *m/z* 130. Ce fragment est, soit consécutif de l'ion *m/z* 204 induit dans l'état excité et spécifique de la

photodissociation UV, soit consécutif de l'ion *m/z* 159 induit *a priori* après redistribution vibartionnelle dans l'état fondamental et non-spécifique UV.

Les résultats obtenus sur la photofragmentation UV du Trp-H^+ avec notre dispositif expérimental sont présentés dans le tableau III.1.

		Rupture C_α-C_β	Rupture C_α-C_β	Perte de NH_3	Perte de H_2O + CO	Fragmentations aux temps longs	
$[W + H]^+$	fragments ioniques	130^+	132^+	188^+	159^+	130^+	146^+ - 144^+
***m/z* 205**	nombre d'étapes	1	1	1	2	2	2
	constante de temps	20 ns	20 ns	20 ns	20 ns	>> 1 µs	> 1 µs
	probabilité relative	5%	15%	13%	10%	15%	42%

tableau III.1 : Résultats obtenus avec la zone polarisée sur l'expérience ARC-EN-CIEL pour la photofragmentation UV du Trp-H^+ (m/z 205).

Nous présentons ici uniquement les résultats obtenus en coïncidence avec la zone polarisée pour le Trp-H^+. Les résultats obtenus avec le piège électrostatique sont présentés dans la suite de ce chapitre.

Dans le tableau III.1, remarquons la présence d'ions *m/z* 188 (perte de NH_3), *m/z* 159 (perte de H_2O+CO) ainsi que deux canaux de fragmentation consécutifs à la perte de NH_3 : *m/z* 144 et *m/z* 146. On retrouve ici des résultats similaires à ceux obtenus par Talbot *et al.* [13] et El Aribi *et al.* [12]. Nous supposons donc qu'il s'agit de fragmentations induites après redistribution vibrationnelle de l'énergie dans l'état fondamental.

Notons par ailleurs que les ions *m/z* 130 et *m/z* 132 observés avec notre dispositif, sont produits en une seule étape, en 20 ns, contrairement aux résultats de Talbot *et al.* [13] où ceux sont des fragments secondaires de l'ion *m/z* 159. Il ne s'agit donc pas du même mécanisme de fragmentation que celui présenté sur la figure III.5. Notons par ailleurs la présence d'une autre voie de fragmentation pour l'ion *m/z* 130 avec un temps de fragmentation $\tau >> 1$ µs. Ces canaux de fragmentation sont relatifs à des fragmentations induites dans l'état excité, spécifiques UV. Leur analyse est détaillée dans le paragraphe suivant.

Les expériences en coïncidence réalisées avec le dispositif ARC-EN-CIEL ont fourni de nouvelles données permettant de mieux comprendre le rôle des états excités dans les mécanismes de photodissociation du Trp-H^+ [28-30].

III.2 Mécanismes de fragmentation dans l'état excité du Tryptophane protoné

Les études MS^n, de spectrométrie de masse tandem, pour des raisons expérimentales, ne permettent d'observer et de sélectionner que les fragmentations ioniques qui ont une durée de vie *supérieure* à la microseconde. L'expérience ARC-EN-CIEL, dédiée à l'étude de la photofragmentation UV, permet de mettre en évidence des fragmentations rapides ayant une constante de temps *inférieure* à la microseconde. Nous allons voir que, dans le cas du Trp-H^+, cette échelle de temps a permis d'observer des mécanismes de fragmentations initiées dans l'état excité, qui n'étaient pas visibles par MS^n [28-30].

Ces « nouveaux » mécanismes, mis en évidence avec notre dispositif, correspondent à la production en une seule étape des fragments ioniques *m/z* 130 et *m/z* 132 du Trp-H^+. Ces ions sont produits par rupture de la liaison C_α-C_β qui relie la chaîne peptidique et la chaîne latérale du Trp-H^+ (cf figure III.1), la charge ionique étant située sur l'indole. L'ion *m/z* 130 correspond à une simple rupture de la liaison C_α-C_β tandis que l'ion *m/z* 132 nécessite, en plus, un transfert d'hydrogène et de proton au niveau de l'indole.

Nous présenterons tout d'abord l'analyse des canaux de fragmentation m/z 130 et 132 du Trp-H^+ observés avec notre dispositif expérimental. La comparaison des fragments produits par rupture de la liaison C_α-C_β du Trp-H^+, de la Tyr-H^+ et de leurs dérivés décarboxylés nous a permis d'émettre des hypothèses quant à la nature des états excités mis en jeu dans ces fragmentations. Après présentation des états excités calculés pour le Trp-H^+, nous exposerons le mécanisme de fragmentation dans l'état excité proposé pour cette molécule.

III.2.1 Analyse des canaux de fragmentation *m/z* 130 et *m/z* 132 du Trp-H^+

Les résultats obtenus en simple coïncidence (1 ion – 1 neutre), pour les ions *m/z* 130, *m/z* 131 et *m/z* 132 du Trp-H^+ sont présentés sur la figure III.6. Le diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ de la figure III.6.(a) a été enregistré avec la zone d'interaction polarisée par un champ électrique. Cela permet de mesurer le temps de fragmentation de chaque canal observé. Sur ce diagramme nous avons indiqué la masse correspondant à chaque contribution observée. Nous avons également indiqué quels sont les temps $(t_i - t_n)$ et les positions y_i qui correspondent à des fragments produits à l'intérieur et à l'extérieur de la zone polarisée.

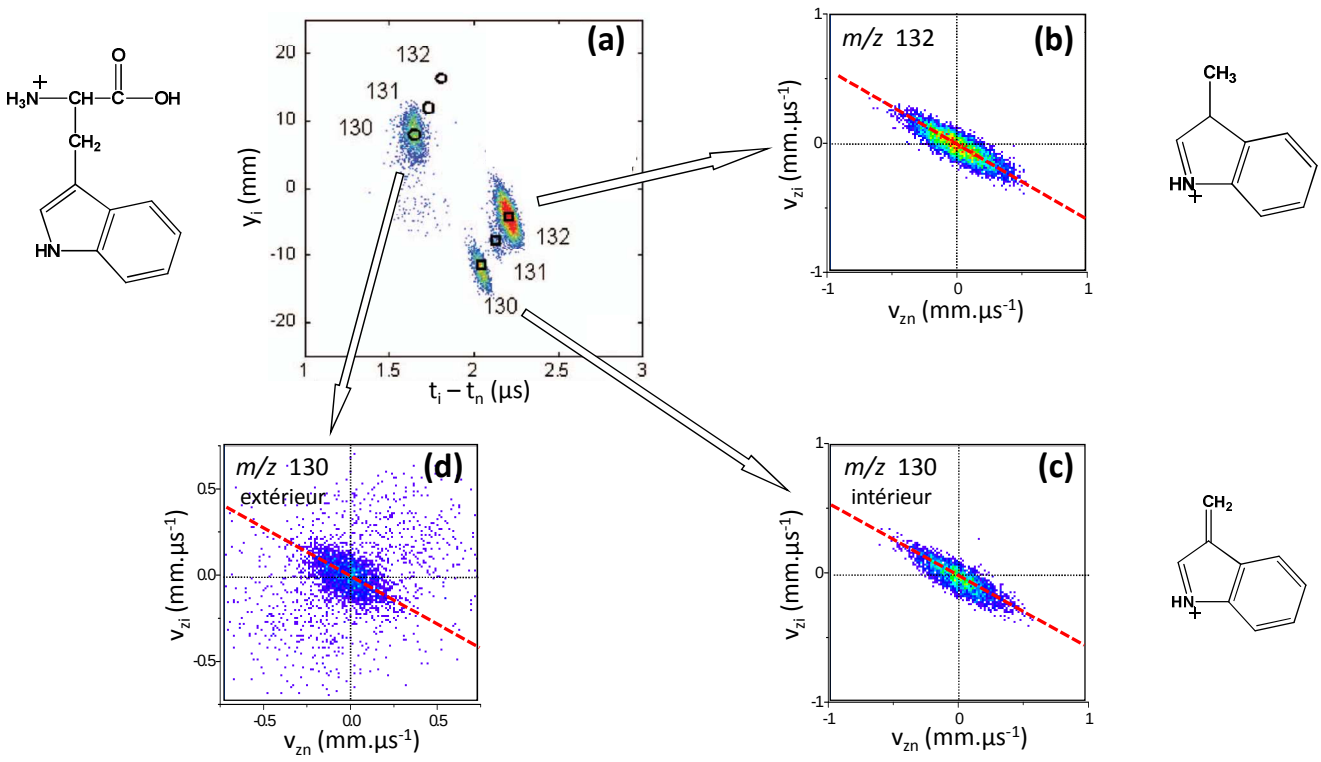


figure III.6 : (a) diagramme N(y_i, $t_i - t_n$) de simple coïncidence enregistré avec un champ de 250 Volts pour les ions m/z 130 et 132 du Trp-H$^+$ (m/z 205). Les fragments produits à l'intérieur de la zone polarisée sont indiqués par des carrés et ceux produits à l'extérieur par des cercles. Diagrammes (b), (c) et (d) : diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) associés aux contributions intérieur de l'ion m/z 132 (b), intérieur de l'ion m/z 130 (c) et extérieur de l'ion m/z 130 (d). Les traits pointillés rouges correspondent aux pentes théoriques attendues pour des mécanismes de fragmentation en une seule étape.

Les trois structures en bas à droite du diagramme N(y_i, $t_i - t_n$) indiquent un mécanisme très rapide de production des ions *m/z* 130, *m/z* 131 et *m/z* 132 (intérieur de la zone polarisée). L'ion *m/z* 131 est observé avec une intensité très faible par rapport aux deux autres. En revanche pour le fragment ionique *m/z* 130, et seulement pour celui-ci, on retrouve une seconde contribution, en haut et à gauche du diagramme N(y_i, $t_i - t_n$) qui correspond à un long temps de fragmentation $\tau > \mu s$ (extérieur de la zone polarisée). La forme des contributions « intérieur » des ions *m/z* 130 et 132 indique que leur temps de fragmentation τ est inférieur ou égal à la limite de résolution de 20 ns. Sur le diagramme N(y_i, $t_i - t_n$), notons qu'il n'y pas de « trace » reliant les deux contributions, lente et rapide, de l'ion *m/z* 130. Comme le mécanisme rapide de production de l'ion fragment *m/z* 130 est terminé en 20 ns, la seconde

contribution, lente, de l'ion *m/z* 130 ne peut qu'être associée à un autre mécanisme de fragmentation, très probablement séquentiel.

Si on suppose que la contribution « extérieure » associée aux ions *m/z* 130 est produite par un mécanisme séquentiel, la position y_i de cette contribution indique que la masse de l'ion doit être très proche de celle de l'ion parent (*m/z* 205). Le premier neutre émis, associé à cette fragmentation séquentielle doit donc être très léger. D'après les résultats du programme de simulation, les positions y_i et (t_i - t_n) sont tout à fait compatibles avec le mécanisme observé par Talbot *et al.* [13] : formation d'un radical cation *m/z* 204 par perte d'hydrogène puis fragmentation sur des temps longs du radical cation pour former l'ion *m/z* 130.

Le diagramme N(v_{zi}, v_{zn}) associé à l'ion *m/z* 132 (figure III.6.b.) présente une structure linéaire de pente $-m_n/m_i$ = -73/132. Ce fragment est donc formé par un mécanisme direct, en une seule étape, contrairement au mécanisme observé dans les expériences CID [12] et UVPD MS^n [13]. Rappelons que dans ces expériences l'ion *m/z* 132 observé est issu de la perte successive de H_2O, CO et HCN. Nous n'observons pas ce mécanisme séquentiel pour l'ion *m/z* 132 qui doit intervenir à des échelles de temps plus longues que notre fenêtre de détection.

Le diagramme N(v_{zi}, v_{zn}) associé au mécanisme rapide de production de l'ion *m/z* 130 (figure III.6.c.) présente également une structure linéaire, de pente -75/130. Il s'agit, là encore, d'un mécanisme en une étape, différent des deux mécanismes observés par Talbot *et al.* [13] où l'ion *m/z* 130 est produit par fragmentation de l'ion *m/z* 204 et de l'ion *m/z* 159.

Le diagramme N(v_{zi}, v_{zn}) associé au mécanisme lent de production de l'ion *m/z* 130 (figure III.6.d.) est brouillé par la présence de collisions avec le gaz résiduel. La contribution centrale de ce diagramme N(v_{zi}, v_{zn}) est trop large pour qu'il s'agisse d'une fragmentation directe mais semble s'aligner sur la droite de pente $-m_n/m_i$ = -75/130. Ceci est cohérent avec un mécanisme séquentiel où la première étape est la perte d'hydrogène.

Les ions m/z 130 et 132 du Trp-H^+ produits en une étape à l'intérieur de la zone polarisée n'ont pas été observés en CID. Ces deux mécanismes directs sont donc des mécanismes spécifiques de l'UVPD. Rappelons que la perte de H (m/z 204) du Trp-H^+ et la production consécutive du fragment m/z 130 sont également spécifiques à l'UVPD.

III.2.2 Rupture de la liaison C_α-C_β du Trp-H^+, de la Tyr-H^+ et de leurs dérivés décarboxylés

Afin de mieux comprendre le mécanisme de rupture de la liaison C_α-C_β conduisant à la production des ions *m/z* 130 et *m/z* 132 du Trp-H^+, une étude comparative a été effectuée avec notre dispositif sur les acides aminés Trp-H^+ et Tyr-H^+ (Tyrosine-H^+) et leurs dérivés décarboxylés (sans groupement –COOH), la Tryptamine-H^+ et la Tyramine-H^+ [30]. Nous avons comparé les ions produits par rupture de la liaison C_α-C_β pour ces quatre molécules. Ces molécules sont représentées sur la figure III.7.

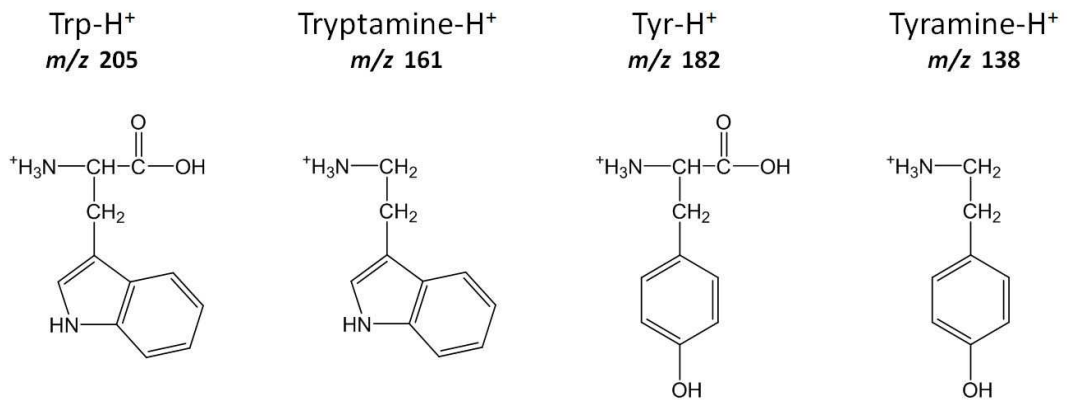


figure III.7 : Molécules de Trp-H^+, Tryptamine-H^+, Tyr-H^+ et Tyramine-H^+

Pour ces quatre molécules, nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus avec le piège électrostatique puis ceux obtenus avec la zone d'interaction polarisée.

III.2.2.1 Rupture C_α-C_β consécutive à la perte de H

Comme nous venons de le voir, l'ion *m/z* 130 peut être formé par un mécanisme en deux étapes dont la seconde étape est lente. Nous avons étudié ce mécanisme, pour le Trp-H^+ et la Tyr-H^+, en photo-excitant ces molécules dans le piège électrostatique. Le piège est plus adapté à l'étude des mécanismes qui ont des longs temps de fragmentation. De plus, pour des raisons techniques, la perte d'hydrogène ne peut pas être étudiée par des expériences en coïncidence (la position d'arrivée de l'ion fragment est trop proche de celle de l'ion parent). Les résultats obtenus avec le piège électrostatique, pour le Trp-H^+ et la Tyr-H^+, sont présentés sur la figure III.8.

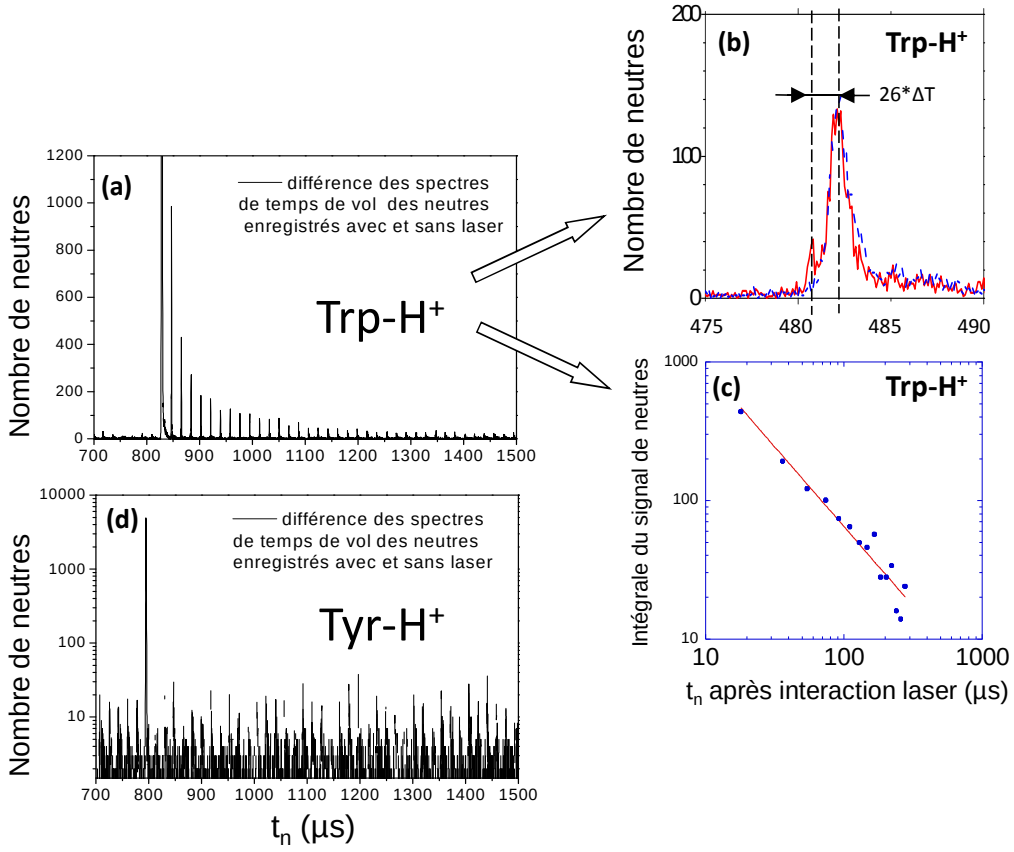


figure III.8 : Résultats obtenus par photofragmentation dans le piège électrostatique. Spectres (a) et (d) : soustraction des spectres de temps de vol des neutres enregistrés avec et sans laser pour le Trp-H$^+$ et la Tyr-H$^+$ respectivement. Spectre (b) : enregistrements avec et sans laser (respectivement en rouge et en bleu) de la 26ème période d'oscillation après interaction laser pour le Trp-H$^+$. Graphique (c) : intégrale des pics du spectre (a) modélisés par une loi en 1/t^{1,15}

La décroissance observée sur le spectre (a) de la figure III.8 ne correspond pas à une désexcitation lente de l'ion parent Trp-H$^+$ mais à un fragment ionique piégé, comme indiqué par le spectre (b). Nous avons identifié ce fragment ionique comme le radical cation Trp$^{\bullet+}$ (*m/z* 204) issu de la perte de H$^\bullet$ du Trp-H$^+$ (cet exemple est traité au chapitre I). Nous avons mesuré un temps de fragmentation de 850 µs pour le Trp$^{\bullet+}$ en modélisant l'intégrale des pics du spectre (a) par une exponentielle décroissante. Cependant, si l'énergie avec laquelle est émis l'atome d'Hydrogène n'est pas définie, le radical cation Trp$^{\bullet+}$ possède une distribution d'énergie interne. Son temps de vie ne peut donc pas être modélisé par une simple exponentielle. Le temps de vie de 850 µs mesuré ne signifie rien. Andersen *et al.* [31, 32] proposent de modéliser par une loi en 1/t, le temps de vie des systèmes dont l'énergie interne est mal définie. En modélisant nos résultats expérimentaux suivant cette méthode, nous

trouvons une loi en $1/t^{1,15}$ (spectre (c) de la figure III.8). Une puissance supérieure à 1 pour ce type de modélisation indique que le système étudié ($Trp^{\bullet+}$) a beaucoup d'énergie interne [31-34].

Dans le cas de Tyr-H^+, le spectre (d) de la figure III.8 indique qu'après interaction laser aucun fragment ionique n'est piégé. Ni la perte de H, ni aucune autre fragmentation consécutive à la perte de H n'est observée pour la Tyr-H^+ photoexcitée avec un laser à 263 nm. Les résultats obtenus pour les dérivés décarboxylés, Tryptamine-H^+ et Tyramine-H^+, étudiés dans le piège électrostatique ne sont pas présentés ici mais sont identiques à ceux de l'acide aminé correspondant. On observe la production d'un radical cation Tryptamine$^{\bullet+}$ à long temps de vie et aucun fragment piégé n'est observé dans le cas de la Tyramine-H^+

Nous avons évoqué l'existence d'un état excité $\pi\sigma^*$ qui conduit à la perte de H pour le Trp-H^+ (figure III.4, page 136). Kang *et al.* [25] ont montré que cet état $\pi\sigma^*$, localisé sur le $-NH_3^+$ et dissociatif le long d'une liaison N-H, existe également pour les trois autres molécules que nous avons étudiées. L'énergie potentielle de cet état excité augmente avec le potentiel d'ionisation (PI) de la molécule neutre correspondante [25]. Comme le PI de la Tyr (8.0 eV) est plus élevé que celui du Trp (7.2 eV) [35], l'état excité $\pi\sigma^*$ de la Tyr-H^+ est donc plus haut en énergie que celui du Trp-H^+ [27]. Il en est de même pour leurs dérivés décarboxylés. Ceci explique pourquoi on n'observe pas la perte de H pour les molécules Tyr-H^+ (figure III.8.d) et Tyramine-H^+ alors que ce mécanisme est observé pour le Trp-H^+ (figure III.8.a) et la Tryptamine-H^+.

III.2.2.2 <u>Expériences effectuées avec la zone polarisée par un champ électrique</u>

La fragmentation de la liaison C_α-C_β a ensuite été étudiée dans la zone d'interaction polarisée pour les quatre molécules Trp-H^+, Tryptamine-H^+, Tyr-H^+ et Tyramine-H^+. La figure III.9 présente les diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ de simple coïncidence enregistrés pour chacune de ces molécules. La fragmentation de la liaison C_α-C_β conduit à la production des ions *m/z* 130, 131 et 132 pour le Trp-H^+ et la Tryptamine-H^+ et des ions *m/z* 107, 108 et 109 pour la Tyr-H^+ et la Tyramine-H^+. Notons que les diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ de la figure III.9 ont été enregistrés avec la zone d'interaction polarisée par un champ électrique qui permet de mesurer les constantes de temps de fragmentation de chaque canal.

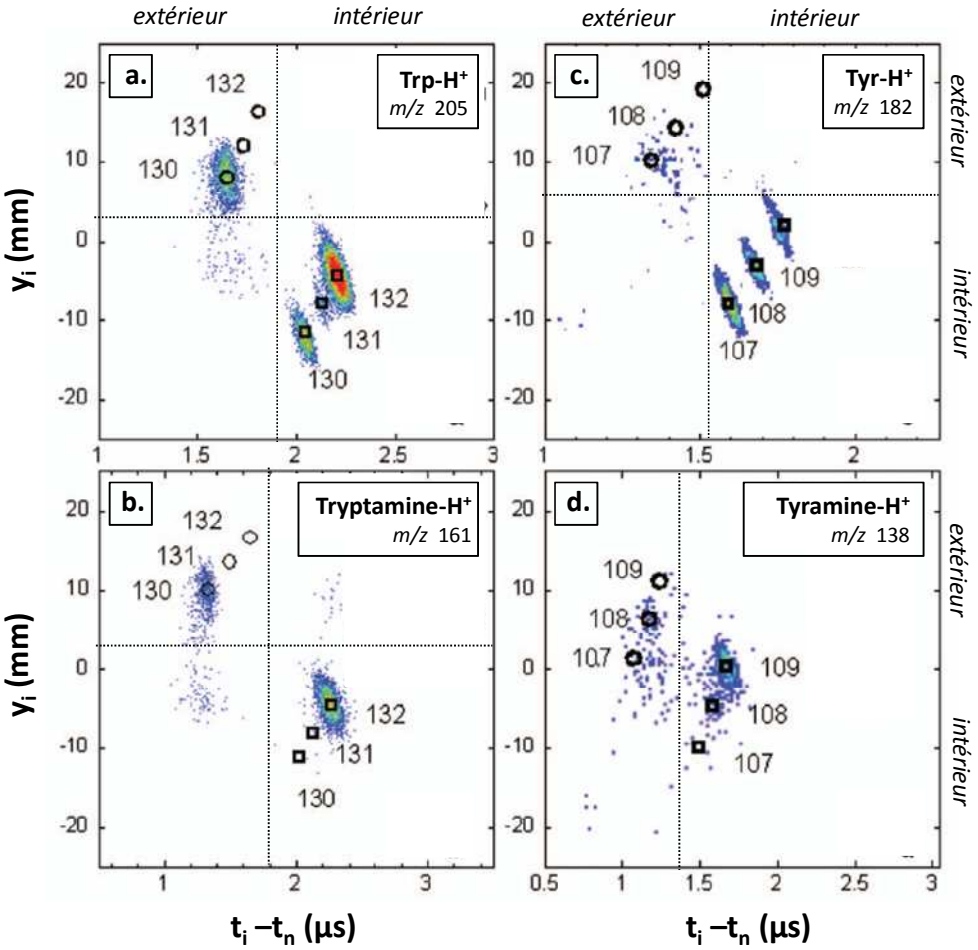


figure III.9 : diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ enregistrés avec la zone d'interaction polarisée par un champ électrique illustrant la fragmentation C_α-C_β pour les molécules : (a) Trp-H$^+$; (b) Tryptamine-H$^+$; (c) Tyr-H$^+$ et (d) Tyramine-H$^+$. Les fragments produits à l'intérieur de la zone polarisée sont indiqués par des carrés et ceux produits à l'extérieur par des cercles.

	Perte de H$^\bullet$	*m/z* 130 ou *m/z* 107 (τ >> 1 µs)	*m/z* 130 ou *m/z* 107 (τ < 20 ns)	*m/z* 132 ou *m/z* 109 (τ < 20 ns)
Trp-H$^+$	×	×	×	×
Tryptamine-H$^+$	×	×		×
Tyr-H$^+$			×	×
Tyramine-H$^+$				×

tableau III.2 : Comparaison des résultats obtenus avec le piège électrostatique à ceux obtenus avec la zone polarisée sur la rupture de la liaison C_α-C_β pour les molécules de Trp-H$^+$, Tyr-H$^+$ et leurs dérivés décarboxylés

Sur la figure III.9, intéressons nous d'abord aux fragmentations produites à l'extérieur de la zone polarisée. Pour le Trp-H^+, le mécanisme lent de production de l'ion *m/z* 130 ($\tau >> 1$ μs) est aussi observé pour la Tryptamine-H^+. Par contre on n'observe pas de mécanisme lent (à l'extérieur) qui produirait des ions *m/z* 107 pour la Tyr-H^+ et la Tyramine-H^+ (diagrammes c. et d. de la figure III.9). Nous avons vu précédemment que la perte de $H^\bullet$ est observée dans le piège électrostatique pour les molécules de Trp-H^+ et Tryptamine-H^+ et non pour la Tyr-H^+ et la Tyramine-H^+. Les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ (non-présentées ici) des contributions *m/z* 130 « extérieur » du Trp-H^+ et de la Tryptamine-H^+ sont en accord avec une fragmentation secondaire à la perte de $H^\bullet$ pour ces évènements sélectionnés. Cette hypothèse est confirmée par les résultats de spectrométrie de masse tandem de Talbot *et al.* [13] (figure III.5). Nous en déduisons que la perte de $H^\bullet$ du Trp-H^+ et de la Tryptamine-H^+ est suivie d'une fragmentation consécutive qui mène à la production d'ions *m/z* 130 avec un long temps de vie (lié à la stabilité du radical cation). Aucune perte de $H^\bullet$ n'a été observée pour la Tyr-H^+ et la Tyramine-H^+ ce qui explique l'absence d'ions *m/z* 107 produits avec un long temps vie pour ces deux molécules (cf figure III.9 et tableau III.2).

En ce qui concerne les mécanismes rapides (contributions « intérieur » de la figure III.9), on constate que le fragment de plus faible *m/z* (*m/z* 130 ou 107) est présent pour les acides aminés, Trp-H^+ et Tyr-H^+ et n'est pas produit pour les deux dérivés décarboxylés. La production rapide (τ < 20ns) des ions *m/z* 130 ou 107 peut être corrélée à la présence du groupe carboxylique –COOH pour les deux acides aminés naturels considérés. Les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ associés à ces contributions indiquent qu'il s'agit d'un mécanisme en une seule étape (non-présenté ici). L'absence d'ions *m/z* 130 et 107 produits à l'intérieur de la zone polarisée pour les dérivés décarboxylés, peut également être corrélée à l'absence du groupement –COOH pour ces deux molécules. Des calculs *ab initio* ont montré qu'un transfert concerté d'électron et de proton sur le carboxyle (-COOH) affaiblit la liaison C_α-C_β du Trp-H^+ [27, 30] et de la Tyr-H^+ [30] et conduit à la production en une étape des ions *m/z* 130 et *m/z* 107 pour ces deux molécules respectivement. Le groupement carboxylique des acides aminés Trp-H^+ et Tyr-H^+ est donc impliqué dans le mécanisme rapide de production des ions *m/z* 130 et 107 en une étape.

Les fragments *m/z* 131 et 108 des molécules de Trp-H^+ et Tyr-H^+ de faible intensité ne sont pas discutés dans la suite. Pour les quatre molécules étudiées, des fragments « di-hydrogéné » *m/z* 132 et *m/z* 109 sont produits à l'intérieur de la zone polarisée. Les

diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) (non présentés ici) associés à ces quatre contributions « intérieur » indiquent, à chaque fois qu'il s'agit d'un mécanisme en une seule étape. Des calculs *ab initio* d'optimisation de géométrie dans l'état excité du Trp-H^+ et de la Tyr-H^+ [27] ont montré qu'un transfert de H^+ du $–NH_3^+$ vers le cycle aromatique suivi d'un réarrangement de ce cycle ont lieu sans barrière pour Trp-H^+ et avec une barrière de 0.2 eV pour Tyr-H^+. Le chemin réactionnel global a uniquement été calculé pour le Trp-H^+ [29]. Le transfert de H^+ vers l'indole est suivi d'une conversion interne lors de laquelle, soit le proton revient sur le $–NH_3^+$ entraînant un retour de la molécule vers sa géométrie initiale, soit il reste localisé sur l'indole et conduit à un affaiblissement de la liaison C_α-C_β [29] Plusieurs minima de la surface d'énergie potentielle de l'état fondamental conduisent ensuite à un transfert de $H^\bullet$ vers le cycle aromatique et à la production d'un ion *m/z* 132 en une étape [29]. La production rapide en une étape des ions *m/z* 132 pour le Trp-H^+ et la Tryptamine-H^+ et des ions *m/z* 109 pour la Tyr-H^+ et la Tyramine-H^+ est liée à la présence, pour ces quatre molécules, d'un cycle aromatique sur lequel il est possible de transférer un H^+ et un $H^\bullet$

Le paragraphe suivant décrit plus précisément les différents états excités dissociatifs du Trp-H^+ accessibles en énergie dans nos expériences. Ces états excités permettent d'expliquer les différents mécanismes de fragmentation de la liaison C_α-C_β observés pour le Trp-H^+ avec notre dispositif expérimental.

III.2.3 Etats excités du Trp-H^+ impliqués dans les mécanismes UVPD

Dans ce paragraphe, nous nous intéressons aux orbitales moléculaires actives des états excités du Trp-H^+ qui induisent des fragmentations spécifiques en UVPD. Grégoire *et al.* ont montré que l'énergie et l'ordre des états excités varient d'un conformère à l'autre [21]. De plus, suivant le conformère considéré, chaque état excité est décrit par une combinaison d'orbitales moléculaires de base. Grégoire *et al.* [21] montrent cependant que les premiers états excités du Trp-H^+ sont construits à partir d'un nombre restreint d'orbitales moléculaires, représentées sur la figure III.10. Notons que, dans nos expériences, les molécules étudiées ont une énergie interne estimée entre 500 et 900 K. On peut donc supposer que les conformères considérés ont des formes étendues. Dans le cas de conformères étendus, les orbitales

moléculaires qui composent chaque état excité sont plus localisées que pour des conformères repliés où les orbitales sont fortement mélangées.

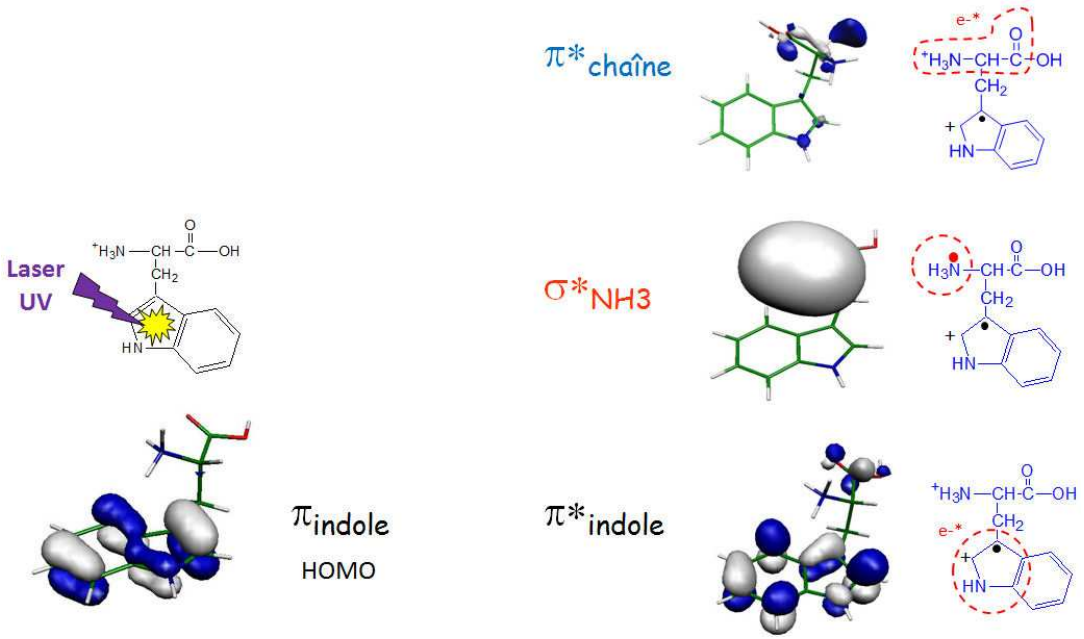


figure III.10 : représentation de l'orbitale HOMO et des orbitales moléculaires actives des états excités du Trp-H$^+$ qui induisent des fragmentations spécifiques UVPD.

L'interaction entre le laser UV et la molécule de Trp-H$^+$ correspond à l'excitation d'un électron de l'orbitale HOMO (orbitale π liante, localisée sur l'indole). L'état excité optiquement actif est un état ππ* où la densité électronique reste localisée sur le cycle aromatique, dans une orbitale anti-liante (π^*_{indole}). La production en une étape de l'ion *m/z* 132 du Trp-H$^+$ est liée à l'état ππ* et nécessite un transfert de H$^+$ dans l'état excité et un transfert de H$^\bullet$ dans l'état fondamental vers le cycle aromatique.

Il existe un état πσ*, proche en énergie de l'état ππ* du Trp-H$^+$ [27], composé d'une orbitale anti-liante au niveau des liaisons N-H de l'ammonium (σ^*_{NH3}). L'interaction au croisement des états ππ* et πσ* permet un transfert de charge π^*_{indole} vers σ^*_{NH3} et le passage d'un état excité à l'autre. La perte de H dans l'état excité est reliée à l'état πσ* et est suivie de la production d'un ion *m/z* 130 avec un long temps de vie ($\tau >> 1$ µs) dans le cas du Trp-H$^+$.

Des expériences pompe-sonde [21] ont montré qu'une perte de NH_3 du Trp-H$^+$ peut avoir lieu dans l'état excité en compétition avec un transfert de H$^+$ sur le –COOH. L'état excité $\pi\pi^*_{chaîne}$ est à l'origine de la compétition entre ces deux fragmentations. Cet état met en jeu une orbitale anti-liante de symétrie π par rapport au plan de la chaîne peptidique qui

s'étend du $-NH_3^+$ au –COOH de la chaîne peptidique ($\pi^*_{chaîne}$). La symétrie de cette orbitale est conservée. Si la densité électronique de cette orbitale est plutôt localisée au niveau du $-NH_3$, cet état évolue vers un état $\pi\pi^*_{C\alpha\text{-}N}$. Si cette densité est plutôt localisée sur le –COOH, cet état évolue en un état $\pi\pi^*_{COOH}$. Tout dépend du conformère considéré. L'état $\pi\pi^*_{chaîne}$, localisé assez haut en énergie, est accessible par transfert de charge via plusieurs croisements de surfaces de potentiel [27]. La production rapide (τ < 20ns) en une étape de l'ion *m/z* 130 du Trp-H^+ est induite par l'état $\pi\pi^*_{COOH}$ et nécessite un transfert de H^+ dans l'état excité sur le groupent –COOH.

Les nombreux croisements entre états électroniques (intersections coniques) permettent non seulement les transitions d'un état excité vers un autre mais aussi le retour vers l'état fondamental par conversion interne.

III.2.4 Modèle de transfert d'électron / transfert de H^+

Les résultats expérimentaux obtenus avec l'expérience ARC-EN-CIEL couplés à des calculs *ab initio* ont permis de construire un modèle de transfert d'électron (éventuellement suivi d'un transfert de proton) pour expliquer les différents mécanismes de fragmentation spécifiques UV du Trp-H^+. Ces mécanismes de fragmentation induits sont présentés sur la figure III.11. Par mesure de simplification, chaque état excité est représenté par l'orbitale moléculaire anti-liante majoritaire qui lui est associée. Ces orbitales moléculaires (cf figure III.10) sont représentées de façon schématique par un cercle rouge qui indique la localisation de la densité électronique anti-liante de chaque état excité considéré.

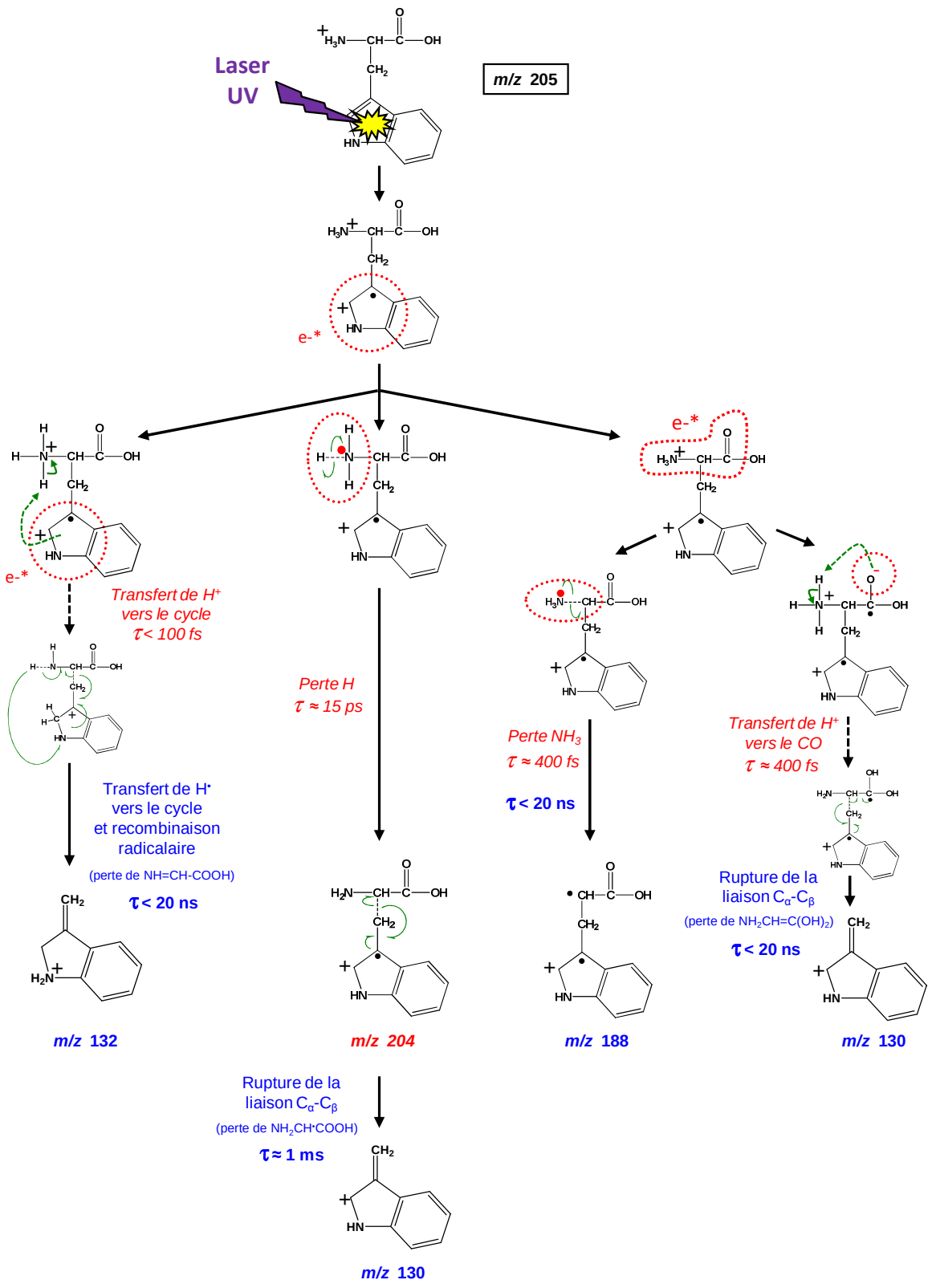


figure III.11 : Représentation schématique des mécanismes de fragmentation spécifique UVPD observées pour le Trp-H$^+$ (m/z 205).

La transition $\pi\pi^*$ correspond à l'excitation d'« un électron » du chromophore (orbitale π) qui est porté dans une orbitale anti-liante localisée sur le chromophore (orbitale π^*). Cet électron "actif" peut ensuite soit :

- rester localisé sur son site (branche de gauche de la figure III.11)
- migrer vers une orbitale σ^*_{NH3} localisée sur l'ammonium (branche centrale)
- migrer vers une orbitale $\pi^*_{chaîne}$ de la chaîne peptidique (branche de droite de la figure III.11) qui le conduit dans une orbitale localisée sur l'un ou l'autre des groupements "electro-attractifs": l'orbitale $\pi^*_{C\alpha\text{-}N}$ ou l'orbitale π^*_{COOH}, respectivement localisée sur la liaison C-NH_3 ou le carboxyle.

Sur la figure III.11, les dynamiques mesurées par les expériences pompe-sonde sont indiquées en rouge et celles mesurées avec l'expérience de coïncidence sont indiquées en bleu.

En parallèle des mécanismes de fragmentation induits dans l'état excité il faut également considérer des mécanismes de fragmentation induits après conversion interne vers l'état fondamental. Ces fragmentations produites après redistribution vibrationnelle dans l'état fondamental sont identiques à celles observées par El Aribi *et al.* [12] en CID sur le Trp-H^+. Il s'agit de la perte de NH_3 (ion *m/z* 188), de la perte séquentielle de H_2O + CO (ion *m/z* 159) et de la production des ions *m/z* 144 et 146 consécutive à la perte de NH_3.

Nous distinguons donc deux mécanismes différents de perte de NH_3 : un mécanisme de fragmentation dans l'état excité (représenté sur la figure III.11) et un mécanisme de fragmentation dans l'état fondamental. La rupture de la liaison C_α-NH_3^+ dans l'état excité nécessite une énergie de 3.5 eV. L'ion fragment *m/z* 188, produit par ce mécanisme, ne possède plus suffisamment d'énergie disponible pour subir d'autres fragmentations. Dans l'état fondamental, la perte de NH_3 a lieu après un réarrangement de la molécule qui implique le passage d'une barrière de 1 eV. L'état de transition calculé par Lioe *et al.* [3] est représenté sur la figure III.12. La perte de NH_3 dans l'état fondamental est le canal de dissociation le plus bas en énergie du Trp-H^+. L'énergie contenue dans l'ion *m/z* 188 produit par conversion interne dans l'état fondamental permet donc d'autres fragmentations consécutives. C'est pourquoi nous pensons que les ions *m/z* 144 et 146, observés en UVPD avec notre dispositif,

produits par un mécanisme séquentiel, sont issus de la perte de NH_3 produite dans l'état fondamental et non pas dan l'état excité.

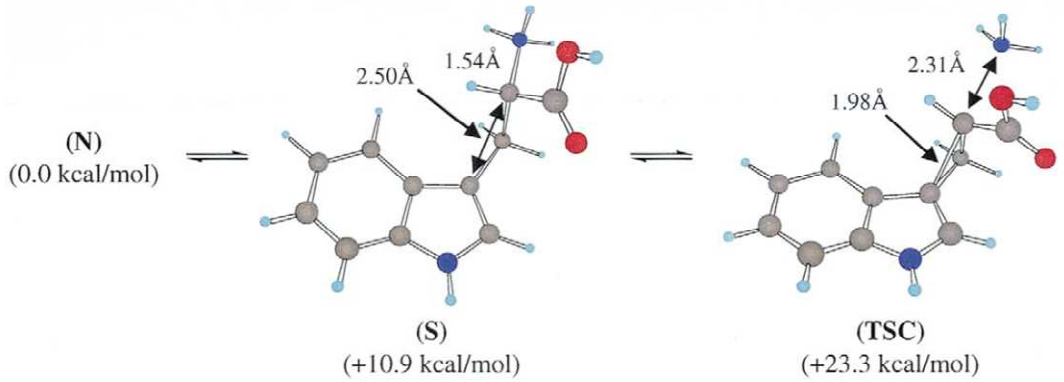


figure III.12 : Mécanisme de perte de NH_3 dans l'état fondamental, calculé par Lioe et al. [3]

Nous avons montré comment a été établi le modèle de transfert d'électron et de proton à l'état excité présenté à la figure III.11, qui propose une explication des mécanismes de photofragmentation du Trp-H^+. Nous avons particulièrement insisté sur les mécanismes photo-induits de transferts localisés d'électron. Dans la partie suivante, nous insistons sur l'importance des transferts de proton mis en jeu dans ces mécanismes à l'état excité.

III.3 Influence d'un éther-couronne sur les mécanismes de transfert de proton

Pour montrer l'importance des transferts de proton dans les mécanismes de fragmentation dans l'état excité du Trp-H^+, nous avons étudié cette molécule solvatée par un éther-couronne. L'éther-couronne que nous avons utilisé est un éther 18-couronne-6 (figure III.13). Cet éther-couronne qui se complexe au niveau du -NH_3^+ du Trp-H^+, devrait bloquer les transferts de H^+ et inhiber des voies de fragmentation à l'état excité.

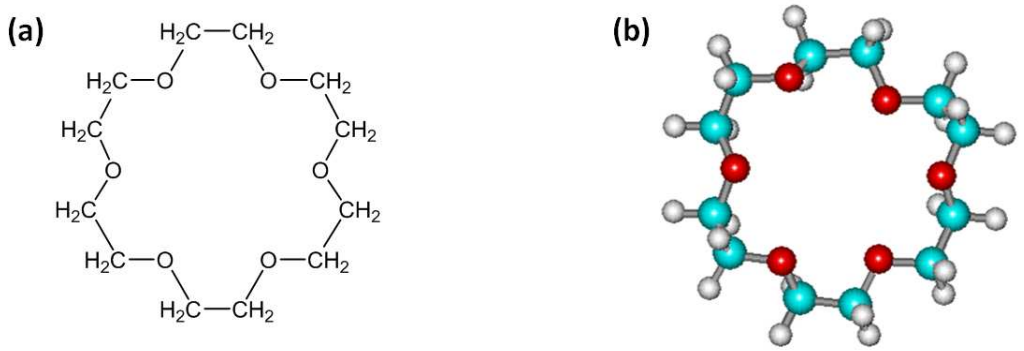


figure III.13 : molécule d'éther 18-couronne-6 : formule semi-développée (a) et représentation 3D (b).

Les éthers-couronnes sont connus pour leur capacité à complexer des cations qui viennent s'insérer, suivant leur taille, au centre du cycle[12] [36]. L'éther 18-couronne-6 se lie facilement au cation potassium mais sa forme lui permet aussi de se complexer au groupement ammonium ($-NH_3^+$) [37, 38]. Des liaisons hydrogène se forment entre les trois atomes d'hydrogène de l'ammonium et trois des six atomes d'oxygène de l'éther-couronne pour donner un complexe très stable. Cette capacité de l'éther 18-couronne-6 de se complexer aux ammoniums trouve un intérêt particulier dans l'étude de peptides protonés[13] [39, 40]. Le site de protonation d'un peptide, auquel se complexe l'éther-couronne est, soit le N-terminal de la chaîne peptidique, soit le N-terminal d'une chaîne latérale basique (Lysine : $-(CH_2)_4-NH_2$, Arginine $-(CH_2)_3-NH-C(NH_2)(NH)$ ou Histidine : $-CH_2-C_3N_2H_3$) [41].

Dans cette partie nous présentons principalement les résultats obtenus sur la photofragmentation des complexes Tryptamine-H^+(CE). Ceux obtenus pour Trp-H^+(CE) sont simplement évoqués. L'éther-couronne, comme nous l'avons vu, est complexé au niveau de l'ammonium de ces molécules (figure III.14).

---

[12] En 1967, Charles Pedersen découvrit de manière fortuite une méthode simple de synthétiser des éthers-couronne. A partir de ces molécules, Cram et Lehn ont ensuite synthétisé d'autres composés plus sophistiqués, de type « molécule-cage », à 3 dimensions, avec différentes formes et permettant de solvater des composés moléculaires ioniques (cations ou anions) ou neutres. Cram synthétisa des composés qui miment la structure fonctionnelle de certaines enzymes et permettent d'engendrer une activité biologique grâce à des interactions non-covalentes (type « clé-serrure »). En 1987, Pedersen, Cram et Lehn reçurent le Prix Nobel de Chimie pour leurs travaux qui ont permit l'émergence de nouvelles spécialités en chimie : la reconnaissance moléculaire et de la chimie supramoléculaire.

[13] Dans la suite nous appelons l'éther 18-couronne-6, simplement « éther-couronne » ou en abrégé « CE » (pour *Crown-Ether*).

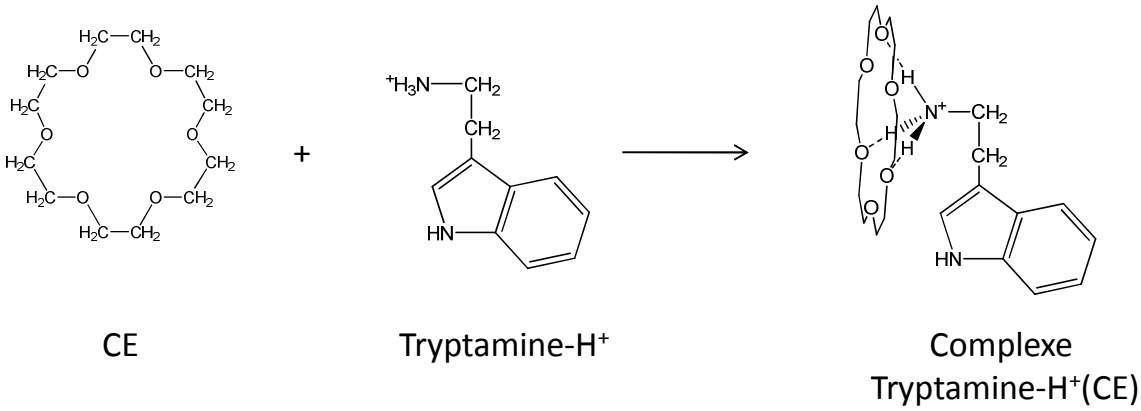


figure III.14 : complexe Tryptamine-H$^+$(CE)

Pour interpréter les résultats des expériences UVPD en coïncidence, notre équipe a effectué des calculs de chimie quantique. Les complexes moléculaires Tryptamine-H$^+$(CE) et Trp-H$^+$(CE) sont des systèmes de grande taille. Un temps de calcul important est nécessaire pour optimiser leur géométrie, calculer les états excités et les chemins de dissociation. C'est pourquoi ces calculs ont uniquement été effectués sur le complexe le plus simple, la Tryptamine-H$^+$(CE). L'absence du groupement –COOH pour la Tryptamine diminue le nombre de conformères possibles par rapport au Tryptophane et permet d'éliminer l'état excité $\pi\pi^*_{\text{chaîne}}$.

III.3.1 Résultats obtenus avec le piège électrostatique

Sur la figure III.15 nous présentons les résultats obtenus par photofragmentation du complexe Tryptamine-H$^+$(CE) dans le piège électrostatique, avec et sans la pompe turbo-moléculaire (notée « P. Turbo ») au niveau de la source electro-spray.

Les résultats obtenus, sont présentés sur la figure III.15. Notons que la pompe turbo-moléculaire (30 L.s^{-1}) placée au niveau de la source d'ions afin de réduire le nombre de collisions entre les ions incidents et le gaz résiduel, permet de réduire l'énergie interne des molécules.

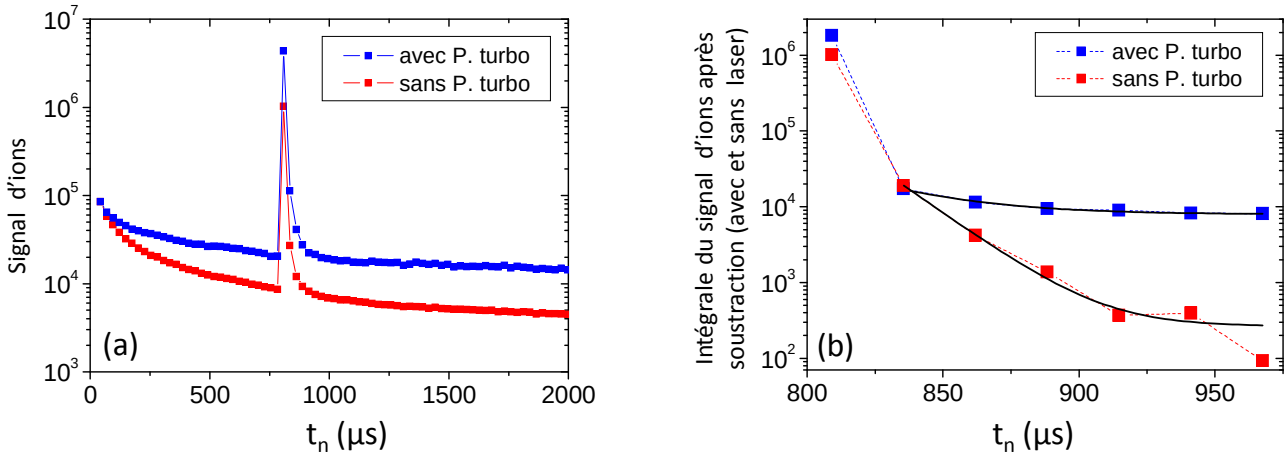


figure III.15 : Photofragmentation du complexe Tryptamine-H$^+$(CE) (m/z 429) dans le piège électrostatique. Intégrale des pics du spectre de temps de vol des neutres enregistré avec laser (a.). Intégrale de la surface des pics après soustraction des spectres avec et sans laser (b) et modélisation par une loi exponentiellement décroissante. Ces expériences ont été effectuées avec et sans la pompe-turbo. La modélisation nous donne des temps de fragmentation de 17 µs (avec P. turbo) et 27 µs (sans P. turbo)

La figure III.15(a) représente, pour une expérience effectuée avec le laser UV, l'intégrale des pics de fragments neutres produits par les ions incidents, tracé en fonction du temps de vol des neutres. Sur cette figure, on observe la contribution, sur plusieurs périodes, de photofragments neutres produits par les ions parents. Entre le spectre enregistré avec la pompe-turbo et celui enregistré sans, on observe un effet important au niveau du fond continu correspondant au signal produit par collisions avec le gaz résiduel. Ces deux spectres sont normalisés par rapport à l'intégrale de leur 1er pic enregistré. Avec l'utilisation de cette pompe-turbo, les molécules fragmentent plus lentement par collision avec le gaz résiduel. Nous avons modélisé le signal de collision par une loi en $e^{-t/\tau}$ qui nous donne un temps de vie τ = 600 µs pour l'expérience avec pompe-turbo et τ = 476 µs pour l'expérience effectuée sans. Les deux expériences ont été effectuées avec les mêmes conditions de source et même énergie incidente. Pour les expériences avec et sans pompe-turbo la diminution du nombre de fragmentations par collision avec le gaz résiduel traduit donc une diminution de l'énergie interne de ces molécules. Sur le spectre de temps de vol avec laser, nous n'avons pas observé de pic produit par un photofragment piégé.

La figure III.15(b) présente l'intégrale des pics obtenus après soustraction des spectres obtenus avec et sans laser (soustraction du fond continu dû aux collisions), pour les

expériences effectuées avec et sans pompe-turbo. Le complexe Tryptamine-H^+(CE) se dissocie avec un temps de vie de 27 µs et de 17 µs pour les expériences avec et sans la pompe-turbo respectivement. Le temps de fragmentation mesuré avec le piège augmente (passage de 17 à 27 µs) lorsque l'énergie interne des molécules étudiées diminue, en accord qualitatif avec la théorie RRKM.

Nous avons déterminé la nature d'un canal de dissociation à long temps de fragmentation. Il s'agit de l'ion *m/z* 161 (Tryptamine-H^+) qui correspond à la dissociation du complexe Tryptamine-H^+(CE) (*m/z* 425). Pour cela, nous avons ouvert le miroir de sortie du piège, une période d'oscillation après l'interaction laser, et ainsi, identifié l'ion fragment avec l'analyseur électrostatique.

Pour la molécule de Trp-H^+(CE), avec le piège électrostatique, nous avons mesuré un temps de vie de l'ion parent de 15 µs.

III.3.2 Résultats obtenus avec la zone polarisée

Dans ce paragraphe nous présentons et expliquons comment sont calculés les rapports de branchements entre les différentes voies de fragmentation des complexes Tryptamine-H^+(CE) et Trp-H^+(CE). Puis nous nous intéressons à la séquence de fragmentation des différents canaux de ces deux complexes, donnée par les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$. Nous montrons les diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ qui nous ont permis de mesurer le temps de fragmentation associé à chaque canal. Nous terminons par un résumé des résultats obtenus avec la zone polarisée, pour les deux complexes, et l'analyse de ces résultats.

III.3.2.1 Rapports de branchements

Avec la zone polarisée, l'étude exhaustive de tous les canaux de fragmentation permet de calculer le rapport de branchement entre ces différentes voies et de reconstituer ainsi un spectre de masse de la molécule. Pour reconstituer un spectre de masse de photofragmentation, on doit s'affranchir des fragments produits par collision avec le gaz résiduel. Pour chaque canal de fragmentation, on soustrait donc au nombre total d'ions détectés sans coïncidences, le nombre de fragments ioniques produits par collisions.

Pour chaque enregistrement effectué, le nombre total de neutres détectés sans coïncidences est proportionnel à l'intensité du faisceau d'ions incidents et du faisceau laser. Après avoir soustrait la composante due aux collisions, pour chaque canal, on normalise le

nombre de photofragments ioniques détectés sans coïncidences au nombre total de neutres détectés sans coïncidences.

Avant de présenter les spectres de masse de photofragmentation obtenus (figure III.16), rappelons d'abord la masse des différentes molécules étudiées :

- M(Tryptamine) : 160 uma
- M(Tryptophane) : 204 uma
- M(CE) : 264 uma
- Tryptamine-H^+(CE) : *m/z* 425
- Tryptophane-H^+(CE) : *m/z* 469

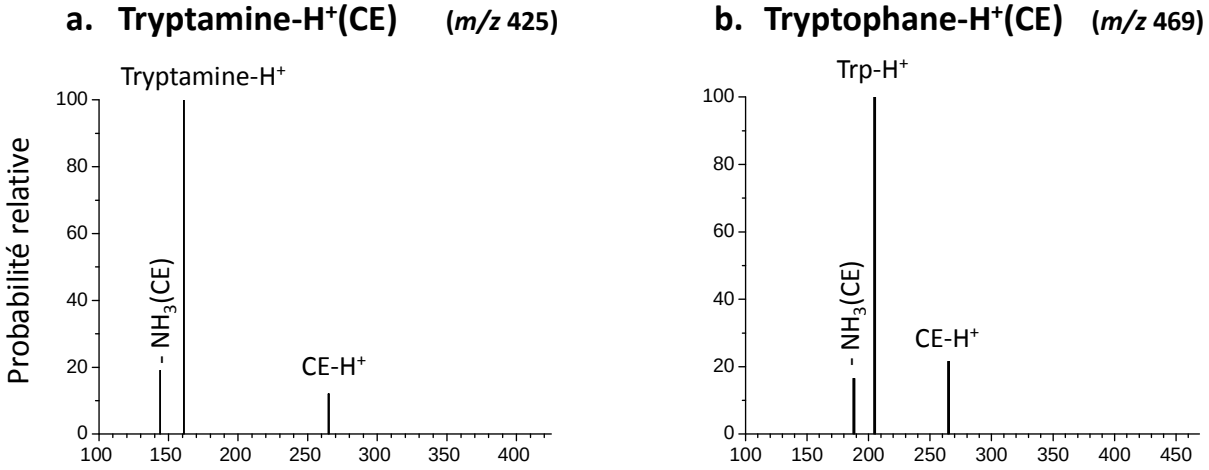


figure III.16 : spectres de masse des complexes Tryptamine-H^+(CE) et Trp-H^+(CE)

Pour le complexe Tryptamine-H^+(CE), spectre (a) de la figure III.16, on observe les fragments *m/z* 144 (perte de NH_3(CE)), *m/z* 161 (Tryptamine-H^+, perte de CE) et *m/z* 265 (CE-H^+, perte de Tryptamine). Le même type de fragmentation est observé pour le complexe Tryptophane-H^+(CE) qui produit les ions *m/z* 188 (perte de NH_3(CE)), *m/z* 205 (Tryptophane-H^+) et *m/z* 265 (CE-H^+). Notons que la perte du CE neutre est la voie de fragmentation la plus importante (100) alors que les deux autres voies de fragmentation ont une intensité relative comprise entre 10 et 20 (figure III.16).

III.3.2.2 Diagrammes N(v_{zi}, v_{zn})

La figure III.17 présente les diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) obtenus pour les trois canaux de fragmentation du complexe Tryptamine-H^+(CE). Sur ces diagrammes, les points expérimentaux s'alignent sur chaque droite de pente (m_i - m_0) / m_i. Ces trois canaux sont donc produits en une seule étape.

La dissociation du complexe moléculaire et la production des ions Tryptamine-H^+ et CE-H^+ se produit en une seule étape, ce qui n'est pas surprenant. En revanche, on attendait un fragment *m/z* 144 produit en deux étapes : perte de CE suivie de la perte de NH_3 par l'ion Tryptamine-H^+. La perte en une étape du fragment neutre NH_3(CE) est donc inattendue. Nous avons cherché et trouvé une explication à ce mécanisme. Ceci est discuté dans la suite.

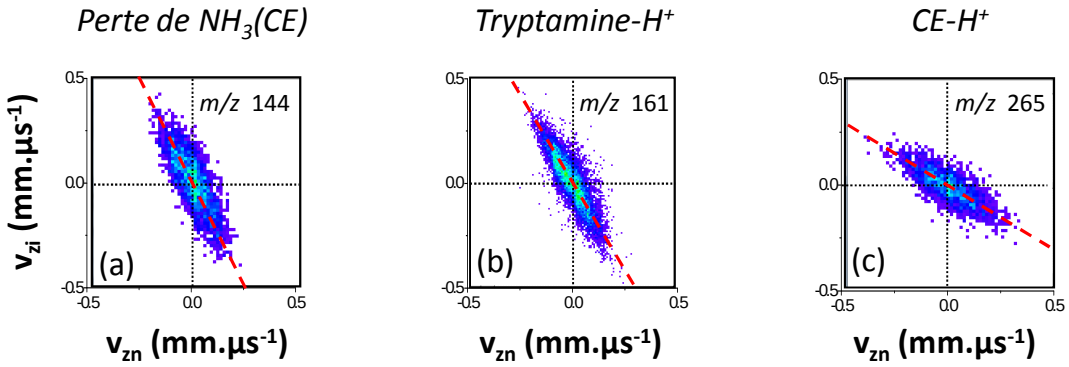


figure III.17 : Diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) obtenus pour les ions m/z 144, 161 et 265 à partir du complexe Tryptamine-H^+(CE) (m/z 425). Les droites en pointillé rouge ont une pente -m_n / m_i qui correspond au rapport des masses obtenues pour une fragmentation binaire.

Les mêmes mécanismes que ceux observés pour le complexe Tryptamine-H^+(CE) ont été observés pour le complexe Trp-H^+(CE) : les trois fragments *m/z* 188, *m/z* 205 et *m/z* 265 sont produits en une seule étape.

III.3.2.3 Mesure des temps de fragmentation : diagrammes N(y_i, t_i – t_n)

Pour les complexes moléculaires Tryptamine-H^+(CE) et Trp-H^+(CE), nous avons mesuré la constante de temps τ associée à chaque canal de fragmentation avec la zone polarisée par un champ électrique pour τ < 500 ns ou par un potentiel si τ > 500 ns. La mesure des temps longs a été effectuée après avoir vérifié que le nombre de fragments produits par

collision à l'extérieur de la zone polarisée est négligeable devant le nombre de photo-fragments. Nous présentons d'abord les résultats obtenus pour le complexe Tryptamine-H^+(CE) puis ceux obtenus pour Trp-H^+(CE) qui sont légèrement différents.

Les diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ permettant de mesurer les constantes de temps associées aux trois canaux de fragmentation du complexe Tryptamine-H^+(CE) sont présentés sur la figure III.18. Pour chaque diagramme, la projection des résultats expérimentaux (en noir) sur l'axe Y_i est superposée à la projection des résultats simulés (en rouge). Nous avons déterminé avec la simulation, par ajustements successifs, la constante de temps τ qui reproduit le mieux les résultats expérimentaux.

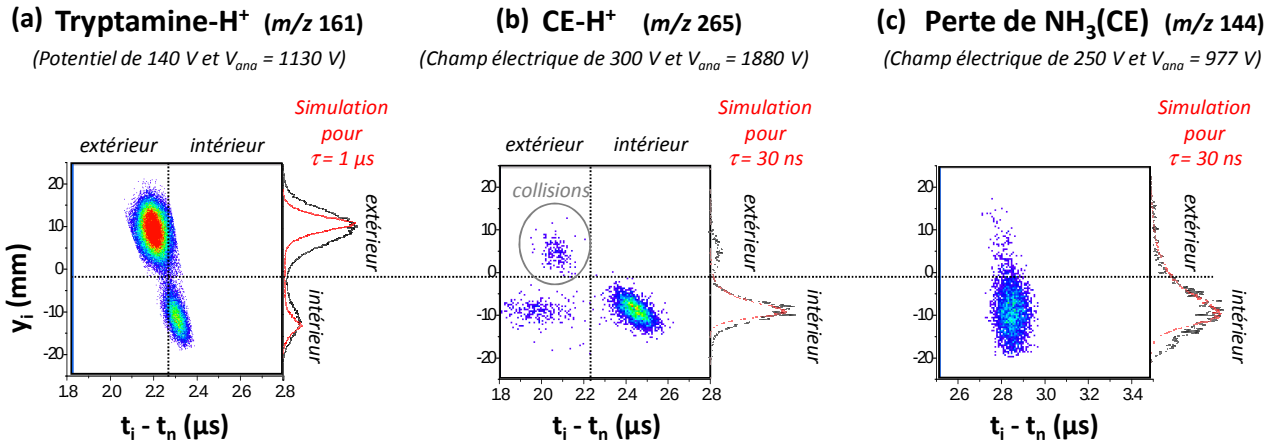


figure III.18 : Diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ obtenus pour les ions m/z 161, 265 et 144 du complexe Tryptamine-H^+(CE) (m/z 425). Projection sur l'axe Y_i : résultats expérimentaux (en noir) et simulation (en rouge).

Le fragment Tryptamine-H^+ (*m/z* 161) est enregistré avec la zone polarisée (figure III.18.a). On détermine un temps de fragmentation $\tau \approx 1$ µs pour ce canal, par comparaison des intensités des contributions intérieures et extérieures. Les diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ relatifs au canal CE-H^+ (*m/z* 265) et à celui de perte de NH_3(CE) (*m/z* 144), diagrammes (b) et (c) de la figure III.18, ont été enregistrés avec la zone polarisée par un champ électrique. Sur ces deux diagrammes, la contribution intérieur est entièrement symétrique, et ne montre aucun effet du champ électrique. La faible contribution extérieure observée sur la figure III.18.b. est due à des collisions. La comparaison avec la simulation de la forme du pic intérieur fournit une constante de fragmentation $\tau = 30$ ns pour ces deux canaux, égale à la limite de résolution que nous pouvons mesurer avec notre dispositif expérimental pour ce système moléculaire.

La figure III.19 présente les diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ enregistrés pour les trois canaux de fragmentation du Trp-H^+(CE). Les diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ associés aux fragments Trp-H^+ (*m/z* 205) et CE-H^+ (*m/z* 265), diagrammes (a) et (b) de la figure III.19, ont été enregistrés avec la zone polarisée par un potentiel. La simulation nous a permis de déterminer un temps de fragmentation $\tau \approx 800$ ns pour l'ion Trp-H^+ et $\tau \approx 1{,}5$ µs pour le CE-H^+. Nous considérons que le temps de fragmentation associé à ces deux canaux est du même ordre de grandeur : $\tau \approx$ 1 µs.

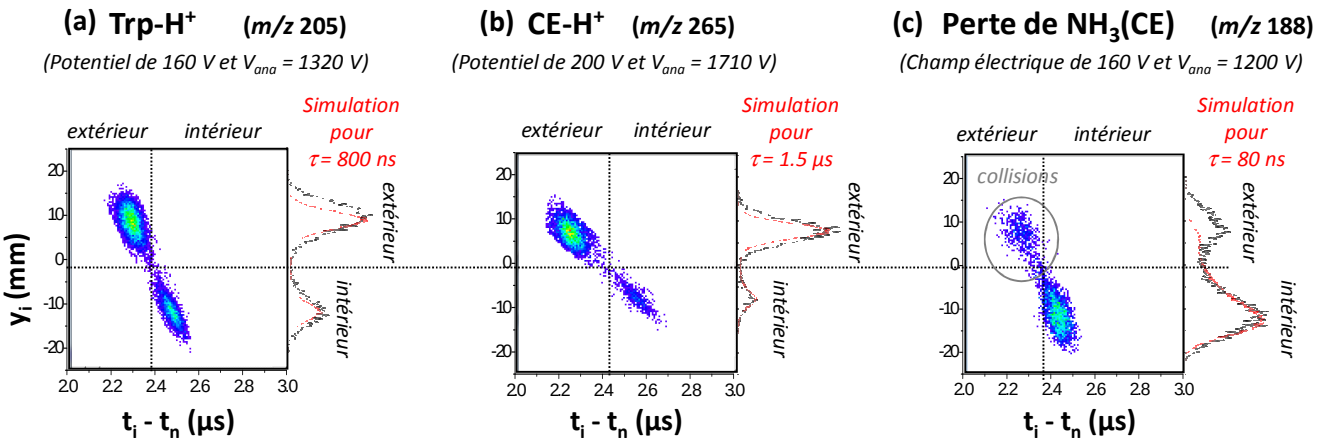


figure III.19 : Diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ obtenus pour les ions m/z 205, 265 et 188 à partir du complexe Trp-H^+(CE) (m/z 469). Projection sur l'axe Y_i : résultats expérimentaux (en noir) et résultats simulés qui reproduisent au mieux les données expérimentales (en rouge).

Le diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ associé au canal de perte de NH_3(CE), diagramme (c) de la figure III.19, a été enregistré avec la zone polarisée par un champ électrique. La comparaison des résultats expérimentaux aux résultats simulés nous donne une constante de temps $\tau \approx 80$ ns associée au canal de perte de NH_3(CE). Une mesure plus précise de cette constante de temps est obtenue en modélisant l'histogramme en y_i, après avoir converti la distribution en Y_i en distribution en temps de vol T_f de l'ion parent Trp-H^+(CE) dans la zone polarisée par un champ électrique (14 V/mm). Le résultat de la modélisation est donné sur la figure III.20.

Sur la figure III.20, la modélisation effectuée indique un temps de fragmentation $\tau \approx 60$ ns pour le canal de perte de NH_3(CE) du complexe Trp-H^+(CE). On retrouve le même ordre de grandeur que le résultat donné par le programme de simulation.

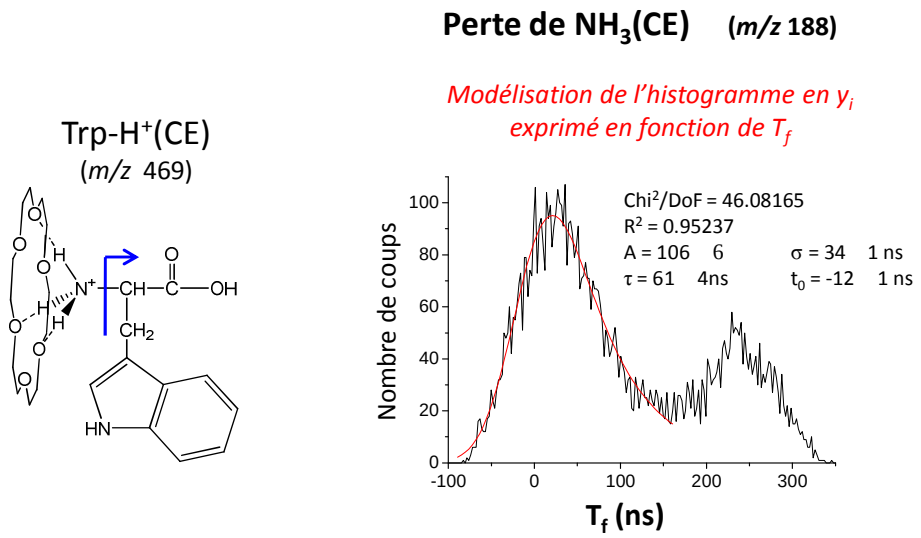


figure III.20: Pour l'ion m/z 188 issu du complexe Tryptophane-H$^+$(CE) (m/z 469) : modélisation de l'histogramme en y_i exprimé en fonction du temps de fragmentation T_f de l'ion parent dans la zone polarisée par un champ électrique de 160 V.

III.3.2.4 Résumé des résultats obtenus avec la zone polarisée et analyse de ces résultats

Les résultats obtenus avec la zone polarisée sont résumés dans le tableau ci-dessous :

		Acide aminé protoné (décarboxylé)	CE-H$^+$	Perte de NH3(CE)
Tryptamine-H$^+$(CE) ***m/z* 425**	fragments ioniques	161$^+$	265$^+$	144$^+$
	nombre d'étapes	1	1	1
	constante de temps	1 µs	**30 ns**	30 ns
	probabilité relative	100	12	19
Trp-H$^+$(CE) ***m/z* 469**	fragments ioniques	205$^+$	265$^+$	188$^+$
	nombre d'étapes	1	1	1
	constante de temps	800 ns	**1,5 µs**	70 ns
	probabilité relative	100	21	16

tableau III.3 : Résumé des résultats obtenus avec la zone polarisée pour les complexes Tryptamine-H$^+$(CE) (m/z 425) et Trp-H$^+$(CE) (m/z 469).

Les temps de fragmentation mesurés pour les différents canaux de fragmentation des complexes Tryptamine-H$^+$(CE) et Trp-H$^+$(CE) présentent deux échelles de temps : des temps courts, proches de la limite inférieure de résolution (≤ 30 ns jusqu'à 70 ns) et des temps plus longs (800 ns à 1,5 µs).

On suppose qu'à chaque échelle de temps est associée un mécanisme de fragmentation. Les deux échelles de temps observées indiquent donc la présence de deux types de mécanisme en compétition : un mécanisme de fragmentation dans l'état excité et un mécanisme de fragmentation dans l'état fondamental. Nous supposons que les temps de fragmentation les plus courts sont associés au mécanisme le plus rapide, de fragmentation dans l'état excité (fragmentations non-statistiques) et que les temps de fragmentation plus longs sont associés au mécanisme de fragmentation dans l'état fondamental (temps de fragmentation statistiques). Suivant cette hypothèse, la photofragmentation des deux complexes étudiés conduit à la production de l'acide aminé (décarboxylé) protoné par un mécanisme statistique ($\tau \approx 1$ µs) et à la perte de NH_3(CE) par un mécanisme non-statistique ($\tau \approx 30$ et 70 ns) (cf tableau III.3). La production de CE-H^+ semble être un mécanisme non-statistique pour le complexe Tryptamine-H^+(CE) ($\tau \leq 30$ ns) et un mécanisme statistique pour le complexe Trp-H^+(CE) ($\tau \approx 1{,}5$ µs). Les temps de fragmentation et les mécanismes associés aux différents canaux de fragmentation des complexes Tryptamine-H^+(CE) et Trp-H^+(CE) sont discutés dans les trois paragraphes suivants.

III.3.3 Discussion sur les temps de fragmentation statistiques observés

Pour le complexe Trp-H^+(CE), on mesure des temps de fragmentation d'environ 1 µs associés aux ions Trp-H^+ et CE-H^+. Le fait que ces deux canaux présentent un temps de fragmentation du même ordre de grandeur est en accord avec l'hypothèse d'un mécanisme statistique. Le temps de fragmentation $\tau \approx 1$ µs mesuré correspond à un temps « global » de fragmentation statistique. Le nombre de degrés de liberté de la molécule[14] associé à un long temps de fragmentation statistique est en accord avec l'hypothèse d'une répartition statistique de l'énergie sur l'ensemble des modes de vibration de la molécule.

Pour le complexe Tryptamine-H^+(CE), l'ion Tryptamine-H^+ est produit avec un temps de fragmentation $\tau \approx 1$ µs dans la zone polarisée. Nous avons identifié que ce même canal est produit dans le piège électrostatique avec un temps de fragmentation $\tau \approx 20$ µs. Dans les deux cas nous considérons qu'il s'agit d'un mécanisme statistique. Mais s'il s'agit du même

[14] 28 atomes pour le Trp-H^+ soit 78 degrés de liberté et 42 atomes pour le CE soit 120 degrés de liberté, ce qui implique un total de 198 degrés de liberté pour le complexe Trp-H^+(CE)

mécanisme pour ce canal de fragmentation, puisque nous mesurons deux constantes de fragmentation différentes ?

Initialement, l'énergie interne de la molécule n'est pas bien définie, nous la noterons ($E_i + \Delta E_i$). Cette incertitude ΔE_i sur l'énergie interne est toujours présente après conversion interne et entraîne l'observation d'une distribution du temps de fragmentation $\Delta\tau$. Les deux temps de fragmentation mesurés pour ce canal ($\tau \approx 1$ µs et $\tau \approx 20$ µs) ont été mesurés avec deux « outils » différents : le piège électrostatique et la zone polarisée, chacun étant adapté à la mesure d'une échelle de temps particulière. La zone polarisée, plus adaptée à la mesure des temps de fragmentation inférieurs à 1 µs permet donc de mesurer les plus petites valeurs de la distribution de temps de fragmentation $\Delta\tau$ ($\tau + \Delta\tau \approx 1$ µs). Le piège électrostatique, plus adapté à la mesure des temps de fragmentation supérieurs à 10 µs permet de mesurer les plus grandes valeurs de cette distribution $\Delta\tau$ ($\tau + \Delta\tau \approx 20$ µs).

Pour l'ion Tryptamine-H^+ issu du complexe Tryptamine-H^+(CE), l'observation de deux temps de fragmentation différents, avec le piège et la zone polarisée, est en accord avec l'hypothèse d'un mécanisme statistique.

III.3.4 Perte de NH_3(CE) dans l'état excité

Dans ce paragraphe nous présentons les calculs *ab initio* effectués sur le complexe Tryptamine-H^+(CE) pour mieux comprendre le processus rapide de perte de NH_3(CE).

La figure III.21 présente le résultat de calculs d'états excités effectués pour le complexe Tryptamine-H^+(CE) avec la méthode TD-DFT/B3LYP pour une base simple SV(P) à l'aide du programme Turbomole [42]. Après avoir optimisé la structure du complexe moléculaire dans l'état fondamental, l'énergie des états excités a été calculée verticalement pour cette géométrie (énergie présentée à la longueur 1,4 Å de la liaison C-N).

Les orbitales de poids prépondérant sur la base desquelles sont construits les états excités sont représentées sur la gauche du schéma de la figure III.21. L'état fondamental S_0 est construit majoritairement sur l'orbitale HOMO (orbitale occupée de plus haute en énergie) et le premier état excité S_1 sur l'orbitale LUMO (orbitale vacante de plus basse énergie). On note LUMO +1, l'orbitale active du deuxième état excité S_2.

Les orbitales HOMO et LUMO du complexe Tryptamine-H^+(CE) sont du même type que celles du Trp-H^+ présentées au § III.2.3 (page 147), de symétrie π. L'état S_1 est accessible verticalement en énergie par absorption d'un photon UV de 263 nm (4.66 eV). Le deuxième état excité S_2 est majoritairement construit avec une orbitale anti-liante à transfert de charge[15], Cet état S_2 est situé trop haut en énergie pour être atteint verticalement par absorption d'un photon de 263 nm.

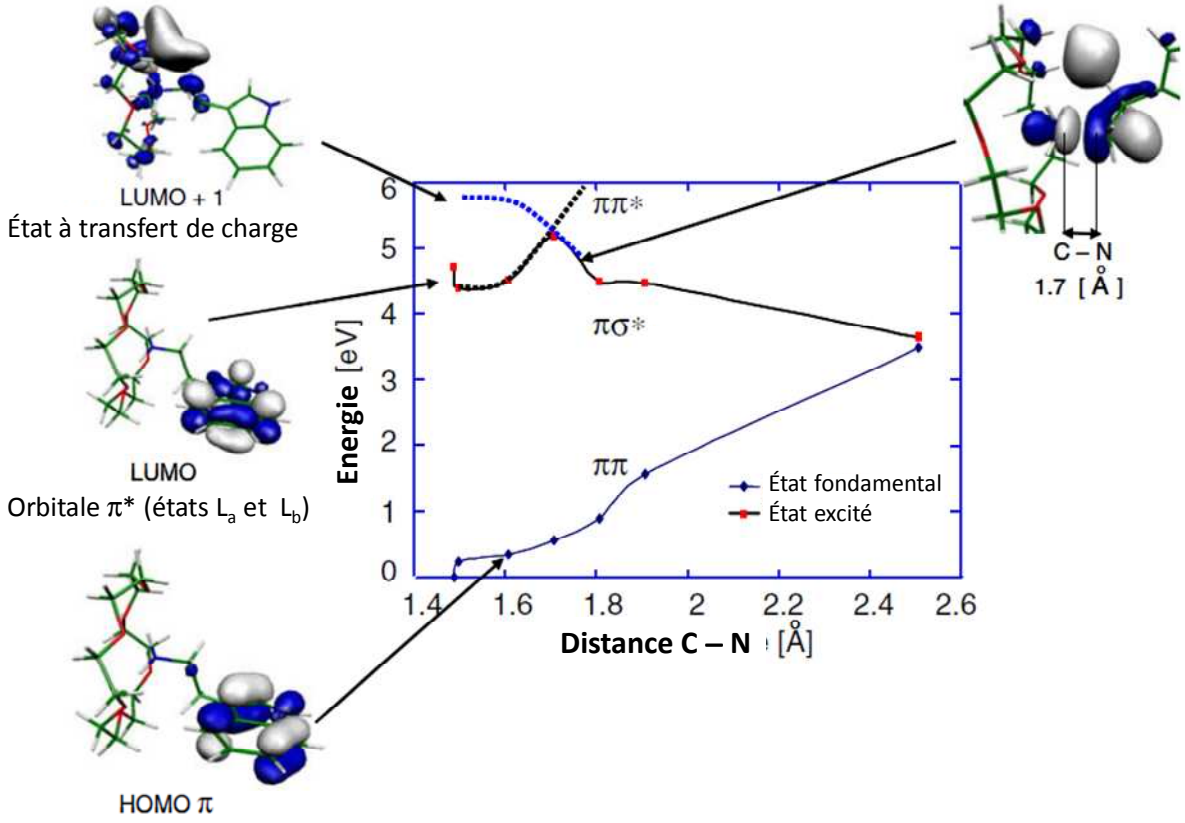


figure III.21 : Calcul du chemin d'énergie minimum conduisant à la dissociation de la liaison C-NH_3^+ du complexe Tryptamine-H^+(CE). Ces calculs ont été effectués en TD-DFT/ B3LYP, avec une base SV(P). Les orbitales HOMO, LUMO et LUMO + 1 associées aux états excités S_0, S_1 et S_2 sont représentées sur le côté gauche de cette figure. Un état excité à transfert de charge est atteint pour une distance C-N de 1,7 Å. Cet état à transfert de charge est représenté sur la droite de la figure.

[15] La méthode TD/DFT est remise en question lorsque l'état excité est un état à transfert de charge. Cependant, dans le cas étudié ici, le transfert de charge consiste à localiser un électron proche de l'endroit où est située la charge positive (-NH_3^+). Dans un tel cas de figure, les résultats du calcul TD-DFT sont très proches de ceux obtenus avec les méthodes MRCI ou ri-CC2, plus adaptées pour calculer des états à transfert de charge mais aussi beaucoup plus coûteuses en temps de calcul.

Le chemin d'énergie potentielle minimum conduisant à la dissociation de la liaison C-NH_3 dans l'état excité a été calculé à partir de l'état S_1. La géométrie de l'état S_1 a d'abord été optimisée pour une longueur de liaison C-N (1,4 Å). Ensuite, nous avons fait varier la longueur de la liaison C-N de 1,4 Å à 1,9 Å par pas de 0,1 Å. A chaque pas de ce calcul, la longueur de la liaison C-N est fixée tandis que tous les autres degrés de liberté sont relaxés et optimisés dans l'état excité. L'énergie des états S_0 et S_1 correspondant à chacune de ces géométries a été reportée sur la figure III.21.

L'état excité S_1 de configuration $\pi\pi^*_{indole}$ est attractif le long de la coordonnée C-N tandis que l'état S_2 de configuration $\pi\sigma^*_{C\text{-}NH3}$ est dissociatif le long de cette coordonnée. Ces deux états excités se croisent à une valeur de 1,7 Å de la liaison C-N. Le caractère attractif de l'état S_1 crée une barrière de potentiel sur le chemin d'énergie minimum qui mène à la dissociation de la liaison C-N. Il faut tenir compte des incertitudes de calcul sur les valeurs des énergies considérées mais la molécule possède *a priori* suffisamment d'énergie pour passer cette barrière.

Lorsqu'on augmente la longueur de la liaison C-N, la géométrie de l'orbitale LUMO de l'état S_1 est modifiée. Plus on augmente cette distance, plus cette orbitale anti-liante se déforme et va se localiser au niveau de la liaison C-N. L'intersection conique entre les états S_1 et S_2 permet ce transfert de charge progressif de l'indole vers la liaison C-N qui devient anti-liante.

Les calculs TD/DFT effectués ont permis d'identifier un état $\pi\sigma^*_{C-NH3}$ localisé dans la région spectrale utilisée pour l'excitation confirmant ainsi l'hypothèse d'une fragmentation non-statistique qui conduit à la perte de NH_3(CE) en une seule étape.

III.3.5 Discussion sur les temps de fragmentation non-statistiques

Des expériences pompe-sonde ont permis de mesurer la dynamique des états excités du Trp-H^+ et de la Tryptamine-H^+ [23, 24]. Ces états excités ont une durée de vie inférieure à quelques picosecondes. Même si ces molécules sont complexées à un éther-couronne, nous nous attendons à une dynamique ultra-rapide associée à la fragmentation dans l'état excité. Pourtant, pour le complexe Trp-H^+(CE), ce canal a un temps de fragmentation τ = 70 ns, beaucoup plus court que les autres temps considérés comme statistique ($\tau \approx 1$ µs) mais supérieur à la limite de résolution que nous pouvons mesurer (20 à 30 ns). Ce temps de

fragmentation considéré comme non-statistique n'est donc pas ultra-rapide. Dans le chapitre suivant, nous verrons d'autres exemples de fragmentations dans l'état excité pour lesquelles le temps de fragmentation est supérieur à la limite de résolution. Nous pensons que l'hypothèse d'un mécanisme non-statistique n'impose pas forcément de mesurer un temps de fragmentation égal à cette limite.

Comment expliquer qu'on n'associe pas forcément un temps de fragmentation ultra-rapide à un mécanisme de dissociation dans l'état excité ? On peut considérer que le système est dissocié du point de vue chimique dans l'état excité mais que les fragments ioniques et neutres produits restent en interaction sous la forme d'un complexe ion-neutre. Les mécanismes de fragmentation dans l'état excité sont associés à un des cas de figure suivant :

- si l'énergie cinétique acquise lors de la dissociation dans l'état excité est grande devant l'interaction intermoléculaire, le système se dissocie complètement dans l'état excité. Les temps de fragmentation mesurés sont alors non-statistiques, inférieurs ou égaux à la limite de résolution.
- si l'énergie cinétique acquise lors de la dissociation dans l'état excité est du même ordre de grandeur que l'énergie d'interaction intermoléculaire du complexe ion-neutre formé, ce système reste piégé sous la forme d'un complexe collisionnel. Ce complexe se dissocie dans l'état fondamental et son temps de fragmentation dépend de l'énergie de cette interaction ion-neutre.

Ceci peut expliquer pourquoi nous mesurons des temps de fragmentation supérieurs à la limite de résolution, pour des fragmentations supposées induites dans l'état excité

Quand on compare les résultats du tableau III.3, la production de CE-H^+ semble être un mécanisme non-statistique pour le complexe Tryptamine-H^+(CE) ($\tau \leq 30$ ns) et un mécanisme statistique pour le complexe Trp-H^+(CE) ($\tau \approx 1{,}5$ µs). Ce résultat est surprenant. Il semblerait qu'un état excité dissociatif conduisant à la perte de CE-H^+ soit mis en jeu dans le cas de la Tryptamine-H^+(CE) et que cet état excité soit absent ou trop haut en énergie dans le cas du Trp-H^+(CE). Cet état excité est *a priori* le même que l'état excité S_2, localisé sur le CE pour le complexe Tryptamine-H^+(CE) et présenté dans les calculs du § III.3.4. Il faudrait vérifier si cet état est dissociatif le long d'une liaison N-H de l'ammonium et conduit à la production de CE-H^+ dans l'état excité pour le complexe Tryptamine-H^+(CE).

Pourquoi le temps de fragmentation associé au canal CE-H^+ est-il beaucoup plus long ($\tau \approx 1{,}5$ µs) dans le cas du Trp-H^+(CE) que dans le cas de la Tryptamine-H^+(CE) ($\tau \leq 30$ ns) ? Notons aussi qu'on observe une augmentation du temps de fragmentation associé au canal de perte de NH_3(CE) quand on passe de la Tryptamine-H^+(CE) ($\tau \leq 30$ ns) au Trp-H^+(CE) ($\tau = 70$ ns).

On peut supposer que l'état excité à transfert de charge, initialement localisé sur CE, conduit à ces deux canaux de fragmentation. Cet état excité est du même type que l'état $\pi\sigma^*_{NH3}$ du Trp-H^+ et de la Tryptamine-H^+. L'état $\pi\sigma^*$ de la Tryptamine-H^+ est situé quelques dixièmes d'eV *en-dessous* de l'état $\pi\pi^*$ tandis que l'état que $\pi\sigma^*$ du Trp-H^+ est situé quelques dixièmes d'eV *au-dessus* de l'état $\pi\pi^*$. Cette différence d'énergie entre états excités se retrouve *a priori* sur les molécules complexées à un éther-couronne. Des calculs ont montré que l'éther-couronne entraîne une déstabilisation de la molécule à laquelle il est complexé[16]. Nous avons vu que l'état excité $\pi\sigma^*$ de la Tryptamine-H^+(CE), localisé à + 1,5 eV par rapport à l'énergie adiabatique de l'état $\pi\pi^*$, peut être atteint par transfert de charge. Cet état excité est *a priori* situé encore plus haut en énergie dans le cas du Trp-H^+(CE) ce qui pourrait expliquer la perte de NH_3(CE) dans l'état excité en 70 ns pour ce complexe. De même, le temps long de 1 µs observé pour le fragment CE-H^+ du Trp-H^+ pourrait s'expliquer, soit par un mécanisme dans l'état fondamental (fragmentation statistique), soit par un mécanisme dans l'état excité où le complexe ion-neutre produit reste (très) longtemps en interaction avant de se dissocier.

III.4 Comparaison avec les expériences effectuées à Aarhus

III.4.1 Principe des expériences réalisées à Aarhus

L'équipe d'Aarhus au Danemark a étudié la photofragmentation des complexes moléculaires Tryptamine-H^+(CE) et Trp-H^+(CE) [34, 43], avec un laser à 266 nm, dans l'anneau de stockage ELISA. Cet anneau fonctionne comme notre piège électrostatique et

[16] Cette énergie de déstabilisation est de l'ordre de 2,5 eV pour la molécule de CH_3-NH_3^+(CE) comparée à CH_3-NH_3^+

permet d'obtenir le même type de résultats (spectre de temps de vol des neutres issus de la métastabilité de l'ion parent piégé).

Une modification effectuée sur l'anneau ELISA permet de changer rapidement l'ensemble des tensions de l'anneau afin de ne plus piéger l'ion parent mais un ion fragment (qui a une énergie différente) [44]. Juste après l'interaction laser, il est donc possible de sélectionner un photo-fragment ionique, quelle que soit sa masse et de mesurer sa métastabilité. Cette expérience est répétée pour chaque fragment ionique. Le spectre de masse de photo-fragmentation est ensuite reconstitué.

III.4.2 Comparaison des résultats obtenus

Sur les molécules de Trp-H^+ et Tryptamine-H^+, l'équipe d'Aarhus a obtenu les mêmes résultats que nous [28, 34, 43]. La seule différence vient d'un ion *m/z* 188 (perte de NH_3) qu'ils ont observé pour le Trp-H^+, avec un très long temps de vie (> 50 µs) [43]. Kadhane *et al.* [43] suggèrent qu'après photoexcitation, la molécule reste piégée dans un état triplet. Cet état à longue durée de vie se désexcite par fluorescence. Après avoir fluorescé, la molécule alors présente dans l'état fondamental vibrationnellement excité fragmente pour donner l'ion *m/z* 188 (canal de plus basse énergie dans l'état fondamental) avec un très long temps de vie.

Nous proposons une autre explication en suggérant que cet ion *m/z* 188 du Trp-H^+ est produit par rupture de la liaison C-NH_3^+ dans l'état excité. Cette dissociation est assez coûteuse en énergie (3,5 eV). Après fragmentation dans l'état excité, l'énergie de l'ion *m/z* 188 est fortement diminuée. Cet ion ainsi produit peut mettre longtemps à se réarranger avant de former les fragments *m/z* 144 et 146 [3]. Cela pourrait expliquer le long temps de vie mesuré par Kadhane *et al.* [43] pour ce fragment.

A Aarhus, un temps de photo-fragmentation de 310 µs a été mesuré pour le complexe Tryptamine-H^+(CE) et de 219 µs pour Trp-H^+(CE)[17]. Ces temps sont beaucoup plus grands que ceux mesurés avec notre piège électrostatique : 27 µs pour Tryptamine-H^+(CE) et 15 µs pour Trp-H^+(CE). Ces résultats laissent supposer que les molécules étudiées avec le dispositif

[17] On remarque que ces expériences donnent un temps plus petit pour Trp-H^+(CE) que pour la Tryptamine-H^+(CE) alors que le nombre de degrés de liberté diminue.

Arc-En-Ciel à Orsay possèdent beaucoup plus d'énergie interne que celles étudiées avec le dispositif ELISA à Aarhus.

Deux spectres de masse reconstitués du complexe Tryptamine-H^+(CE) issu des expériences d'Aarhus sont présentés sur la figure III.24. Le spectre (a) a été enregistré entre 0 et 28 µs après photoexcitation et le spectre (b) entre 42 et 69 µs après photoexcitation. Pour le complexe Tryptamine-H^+(CE) (*m/z* 425), les canaux de fragmentation identifiés à Aarhus sont très différents de ceux observés avec notre dispositif : CE-H^+ (*m/z* 265), $^{\bullet}NH_3^+$(CE) (*m/z* 281) et Tryptamine-H^+ (*m/z* 161). Tous ces fragments ioniques observés sur la figure III.22 contiennent le CE.

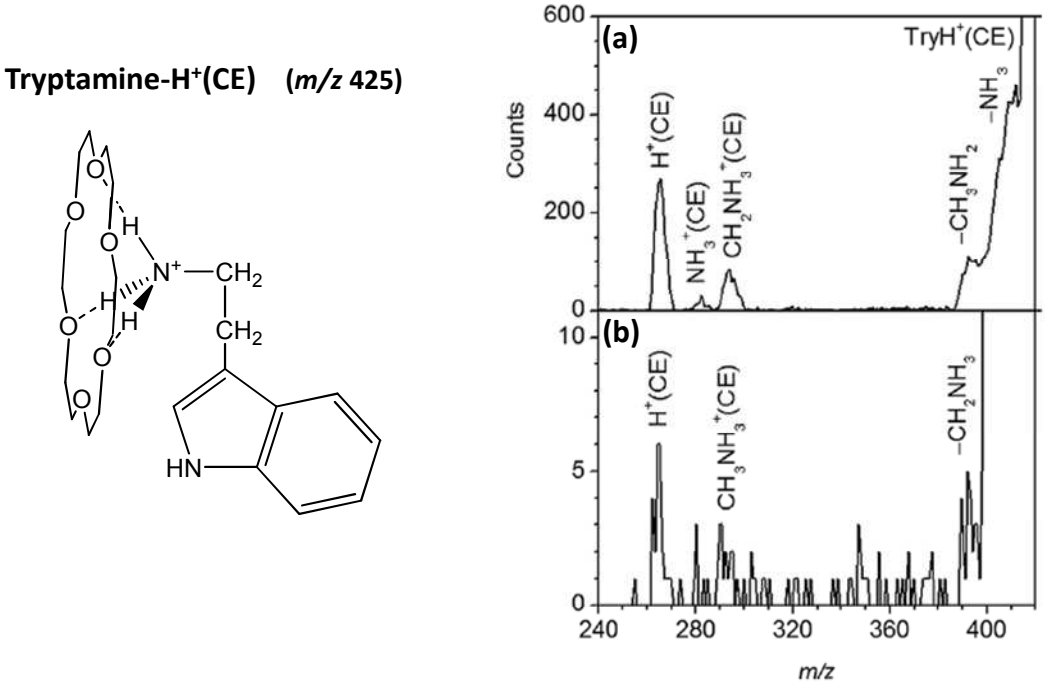


figure III.22 : Spectre UVPD (266 nm) de la Tryptamine-H^+(CE) enregistré à Aarhus [34].
Spectre (a) : fragments ioniques produits jusqu'à 28 µs après photoexcitation.
Spectre (b) : fragments ioniques produits entre 42 et 69 µs après photoexcitation

Dans les expérience d'Aarhus, l'ion CE-H^+ est observé comme avec notre dispositif, ainsi que la perte de NH_3 (sans le CE par rapport à nos expériences). Ces canaux sont les plus intenses. La dissociation de la liaison C-NH_3 conduit également à un ion $^{\bullet}NH_3^+$(CE) avec la charge ionique localisé du côté du NH_3 et non du côté de la Tryptamine comme nous avons pu l'observer. Deux autres fragments correspondant à la rupture de la liaison C_α-C_β sont également présents le CE étant, soit complexé à l'indole (perte de $^{\bullet}CH_2$-NH_2), soit complexé

au N-terminal (ion $^{\bullet}CH_2$-NH_3^+(CE)). L'observation des fragments de perte de NH_3 et de perte de $^{\bullet}CH_2$-NH_2 laisse supposer, soit la présence d'un deuxième conformère formé initialement avec le CE complexé sur l'indole, soit un mouvement du CE avant qu'il y ait fragmentation.

La question se pose quant au mécanisme de fragmentation de la liaison C_α-C_β observé dans ces expériences. Ce mécanisme peut être similaire à celui que nous avons proposé pour la production de l'ion *m/z* 132 de la Tryptamine-H^+, qui met en jeu un transfert de H^+ du NH_3^+ vers l'indole. Dans ce cas, un transfert concerté du CE et d'un H^+ vers l'indole est nécessaire pour casser la liaison C_α-C_β et éliminer $^{\bullet}CH_2$-NH_2 uniquement. L'ion $^{\bullet}CH_2$-NH_3^+(CE) serait formé suivant ce mécanisme et après un retour du CE-H^+ sur la chaîne peptidique. Des expériences réalisées avec des dendrimères auxquels sont complexés des éthers-couronne ont montré que l'éther-couronne peut migrer d'un site aminé à l'autre avec un des H^+ auquel il est lié [45]. Le fait que le CE puisse rester complexé à l'indole paraît cependant étrange car ce conformère est haut en énergie (1,43 eV) [43]

Remarquons que l'ion Tryptamine-H^+ n'est pas observé dans les expériences effectuées à Aarhus. Ceci est étrange car la perte de CE est le fragment le plus couramment observé en CID dans les études de complexes CE-peptides protonés [39].

III.4.3 Différence entre les deux dispositifs expérimentaux d'Aarhus et d'Orsay

Au vu des temps de vie mesurés à l'aide du dispositif d'Aarhus par rapport à ceux mesurés avec notre dispositif, nous en avons déduit que les molécules que nous étudions doivent avoir beaucoup plus d'énergie interne que celles étudiées à Aarhus.

Ces deux dispositifs utilisent une source électrospray. Dans notre dispositif, on utilise un gaz chaud à 200°C pour désolvater les molécules qui entraîne une première augmentation de l'énergie interne des molécules. Les molécules subissent ensuite de nombreuses collisions lorsqu'elles sont stockées pendant 1 ms dans l'hexapole dues à la pression présente dans cette enceinte (10^{-3} Torr). Nous avons observé que l'amélioration de la pression au niveau de l'ESI permet de diminuer légèrement l'énergie interne des ions parents (légère augmentation du temps de vie).

A Aarhus, les molécules sont désolvatées en utilisant un capillaire métallique qui est chauffé à 200°C (à la place du capillaire en verre). A la sortie de l'électrospray, les molécules sont thermalisées dans un piège de Paul rempli d'Helium à 300 K pendant 20 ms avant d'être

injectées dans l'anneau de stockage dans lequel elles sont stockées pendant 43 ms avant d'être photo-excitées.

En augmentant le temps de piégeage avant photoexcitation, jusqu'à 10 ms, nous n'avons pas mesuré d'augmentation significative du temps de fragmentation. L'absence de thermalisation dans notre dispositif et le stockage des ions pendant 1 ms dans une enceinte pompée à 10^{-3} Torr est probablement la cause de cette différence d'énergie interne entre nos deux dispositifs. De plus la pression résiduelle dans l'anneau ELISA est légèrement inférieure (10^{-11} Torr) à la pression du piège électrostatique que nous utilisons (10^{-9} Torr).

Cela peut expliquer la différence observée sur les temps de vie mais cela ne justifie pas une telle différence observée sur les canaux de photofragmentation des complexes Trp-H^+(CE) et de Tryptamine-H^+(CE) entre nos deux dispositifs. D'autant plus que nous observons le même type de fragmentations pour les molécules protonées isolées. Il est possible que la source électrospray d'Aarhus favorise des conformations que nous n'observons pas sur notre dispositif, pour les complexes avec l'éther-couronne.

III.5 Evaluation de l'énergie interne des molécules étudiées avec notre dispositif

Nous avons effectué un calcul RRKM pour déterminer l'énergie interne des molécules produites par notre dispositif en comparant les temps de vie que nous avons mesurés pour le Tryptophane-H^+(CE) à ceux mesurés à Aarhus

III.5.1 Rappels sur la théorie RRKM

Considérons une molécule A et un de ses produits de fragmentation P qui nécessite le passage d'une barrière de potentiel d'énergie E_{barr}. La molécule A est dite activée et notée A* si elle a suffisamment d'énergie vibrationnelle pour passer la barrière de potentiel d'énergie E_{barr}. La théorie RRKM considère que, pour former les produits de la réaction, les molécules activées A* doivent passer par une configuration critique $A^{\neq}$ telle que :

$$A^* \xrightarrow{k} A^{\neq} \xrightarrow{k^{\neq}} P$$

Les constantes de vitesse k et $k^{\neq}$ dépendent de l'énergie interne E_i du système et sont calculées en tenant compte de tous les degrés de liberté de A* et de $A^{\neq}$, respectivement. La molécule est traitée de façon quantique, comme un ensemble d'oscillateurs harmoniques et les modes de vibration sont considérés comme indépendants les uns des autres. L'énergie est répartie de manière statistique sur tous ces oscillateurs qui échangent librement de l'énergie. La coordonnée de réaction q_1 est traitée séparément des autres degrés de liberté de la molécule. Le produit P n'est formé que si l'énergie présente dans l'oscillateur qui correspond à la coordonnée de réaction q_1 est supérieure à E_{barr}.

III.5.2 Calcul effectué

On utilise un programme qui reprend les équations de la théorie RRKM et nous permet de calculer, la constante de vitesse statistique le long d'une coordonnée de réaction particulière, pour un système donné. On effectue une optimisation de géométrie du système en question avec le logiciel Hyperchem (AM1). Puis on calcule, pour cette géométrie d'énergie minimum, toutes les fréquences de vibration du système, à l'aide du même logiciel. On choisit la vibration de la molécule qui correspond à la coordonnée de réaction que l'on souhaite étudier. On définit l'énergie de la barrière de dissociation le long de cette coordonnée de réaction. Toutes les fréquences de vibration de la molécule sont introduites dans notre programme et permettent de calculer la densité d'état à l'aide d'un algorithme de Beyer-Swinehart. Le calcul des constantes de vitesse (et de temps) de fragmentation statistique est effectué pour différentes valeurs d'énergie contenues par les molécules après interaction laser : $E_{h\nu}$ (4.66 eV) + énergie interne initiale. Par ailleurs un autre calcul est effectué pour connaître la correspondance entre la température vibrationnelle d'une molécule et son énergie interne.

III.5.3 Résultats obtenus

Des calculs ont été effectués, suivant la méthode décrite ci-dessus, pour le complexe Trp-H^+(CE), en comparant différents temps de fragmentation obtenus expérimentalement à Orsay et Aarhus. Nous avons utilisé les temps de fragmentation associés aux canaux de dissociation de la liaison C-NH_3 (perte de NH_3 ou de NH_3(CE)) et de la production du fragment Trp-H^+. Pour les expériences d'Orsay, nous avons considéré les temps de

fragmentation mesurés avec la zone polarisée pour ces deux fragments, soit 70 ns pour la perte de NH_3(CE) et environ 1 µs pour Trp-H^+. Dans les expériences effectuées à Aarhus, le fragment correspondant à la perte de NH_3 est observé jusqu'à 107 µs après photoexcitation. Le temps de vie de 219 µs mesuré pour le complexe Trp-H^+(CE) est associé *a priori* à ce canal de fragmentation. Comme le fragment Trp-H^+ n'a pas été observé dans les expériences d'Aarhus, nous considérons qu'il possède un temps de fragmentation trop long pour pouvoir être détecté. Les ions sont piégés pendant 100 ms dans l'anneau ELISA. On suppose donc que si le temps de fragmentation d'un ion est proche de 100 ms, celui-ci n'est pas détecté (ou très peu). Les temps de fragmentation utilisés pour notre calcul sont résumés dans le tableau III.4.

	Aarhus	Orsay
CE-H^+	219 µs	60 ns
Trp-H^+	≈ 100 ms	≈ 1 µs

tableau III.4 : Temps de fragmentation des fragments CE-H^+ et Trp-H^+ mesurés sur les dispositifs d'Aarhus et Orsay pour le complexe Trp-H^+(CE)

Nous sommes partis de l'hypothèse que la température vibrationnelle des molécules étudiées à Aarhus est de 300 K, les ions étant thermalisés pendant 20 ms à cette température avant d'être injectés dans l'anneau. L'énergie interne qui correspond à cette température vibrationnelle est de 0,8 eV pour le complexe Trp-H^+(CE). En considérant une énergie de 4,6 eV apportée par le photon UV, l'énergie totale présente dans le système est de 5,4 eV après conversion interne. Connaissant l'énergie interne associée aux deux temps de fragmentation mesurés à Aarhus pour les ions CE-H^+ et Trp-H^+ du complexe Trp-H^+(CE) (tableau III.4), nous avons ainsi pu estimer par un calcul de type RRKM, la barrière de dissociation pour ces deux canaux de fragmentation. A partir de ces deux énergies de barrière de dissociation, notées E_a et E_b dans le tableau III.5 pour les fragments CE-H^+ et Trp-H^+ respectivement et connaissant les temps de fragmentation de ces deux fragments mesurés dans la zone polarisée pour notre dispositif à Orsay nous avons pu en déduire leur énergie totale après conversion interne, à l'origine de ces temps statistiques[18], notée X dans le tableau III.5. Pour calculer l'énergie interne initiale des molécules étudiées à Orsay il suffit de soustraire l'énergie du

[18] On considère que la production du fragment CE-H^+ est un mécanisme initié dans l'état excité mais que le temps de fragmentation mesuré correspond à la dissociation statistique d'un complexe ion-neutre dans l'état fondamental.

photon (4,6 eV) à cette énergie X. On peut ainsi estimer la température vibrationnelle des molécules étudiées dans la zone polarisée sur notre dispositif.

		Aarhus		Orsay		
		Anneau ELISA		Zone polarisée		piège
Energie (eV)	initiale	0,8		*X - 4,6*		*Y - 4,6*
	totale (+ hν)	5,4		*X*		*Y*
Canaux de fragmentation		***CE-H⁺***	***Trp-H⁺***	***CE-H⁺***	***Trp-H⁺***	***Trp-H⁺***
E_{barr} (eV)		E_a	E_b	E_a	E_b	E_b
τ (s)		$2{,}2.10^{-4}$	$\approx 10^{-1}$	6.10^{-8}	$\approx 10^{-6}$	$\approx 1{,}5^{-5}$

tableau III.5 : Données utilisées dans le calcul RRKM effectué

Par la même méthode nous avons également cherché quelle était la température vibrationnelle associée aux temps de vie mesurés dans le piège électrostatique (τ = 15 µs pour Trp-H$^+$(CE)).

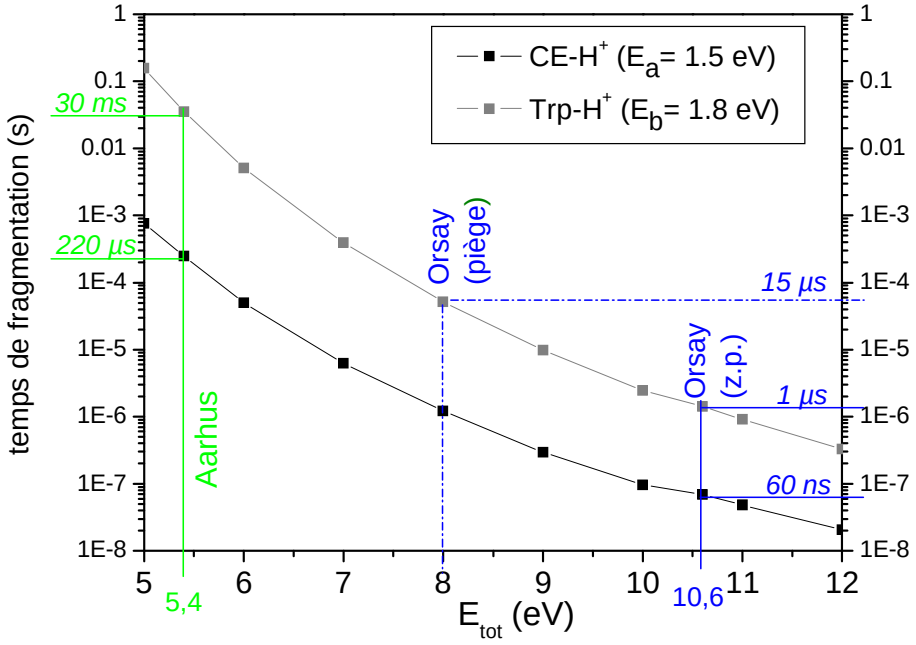


figure III.23 : Résultats du calcul RRKM effectué sur un mode de vibration parapluie du -NH$_3^+$ du complexe Trp-H$^+$(CE) à 1647 cm^{-1} (défini par le logiciel Hyperchem). Comparaison avec les temps de fragmentations mesurés expérimentalement (tableau III.4). Sur cette figure, la notation « z p » est utilisée pour « zone polarisée »

Les résultats obtenus sont résumés sur la figure III.23. Nous avons déterminé une barrière de dissociation[19] E_a = 1,5 eV conduisant à la production de l'ion CE-H^+ et une barrière E_b = 1,8 eV pour la production de Trp-H^+. L'éther-couronne a une affinité protonique plus élevée que celle du Trp (967,0 kJ/mol et 948,9 kJ/mol respectivement). Cela explique pourquoi la barrière de dissociation est faible si le H^+ reste attaché au CE. A partir de ces énergies de dissociation et des temps de fragmentation mesurés sur notre dispositif, nous avons pu calculer l'énergie des molécules après conversion interne (figure III.23). On trouve une énergie de 10,6 eV pour les expériences avec la zone polarisée et de 8 eV pour les expériences avec le piège électrostatique, à l'origine des temps de fragmentation statistiques mesurés sur notre dispositif.

De ces résultats nous déduisons l'énergie interne des molécules avant photofragmentation (soustraction de l'énergie du photon de 4,6 eV). La figure III.24 indique l'énergie présente avant et après photofragmentation ainsi que la température vibrationnelle correspondant à l'énergie initiale de la molécule Trp-H^+(CE). On détermine alors une température vibrationnelle de 650 K pour les expériences effectuées avec le piège électrostatique et de 900 K pour les expériences réalisées avec la zone polarisée.

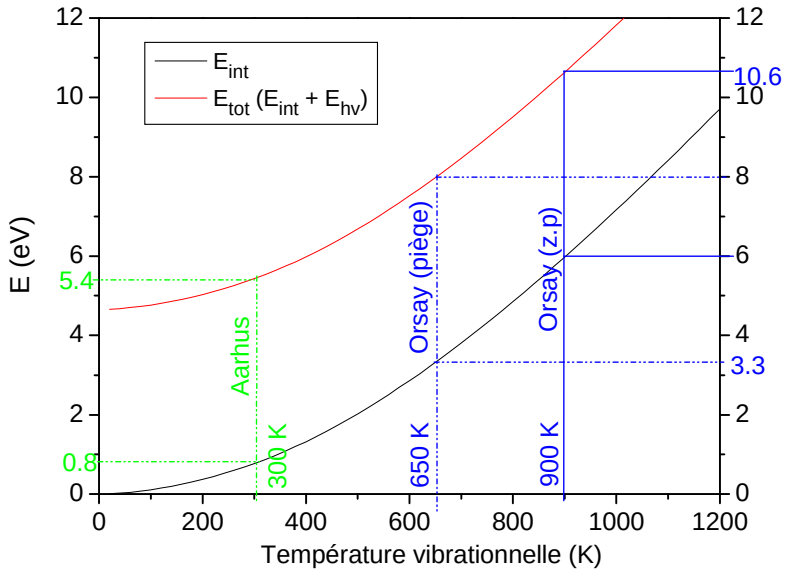


figure III.24 : Correspondance entre l'énergie des molécules après photoexcitation, l'énergie interne initiale et la température vibrationnelle des molécules dont nous avons considéré la fragmentation statistique.

[19] L'énergie de dissociation du complexe CH_3-NH_3^+(CE) est de 1,9 eV. Les calculs effectués nous donnent donc le bon ordre de grandeur pour ces énergies de dissociation.

Nous avons pu estimer une température vibrationnelle comprise entre 650 K et 900 K pour les molécules étudiées avec notre dispositif expérimental. Connaissant la température vibrationnelle des molécules produites par notre source électrospray, nous pouvons en déduire l'énergie interne des systèmes étudiés.

L'énergie interne des molécules étudiées avec notre dispositif est très importante par rapport à celle des molécules étudiées avec l'anneau ELISA. Cela peut expliquer la production de conformères différents qui induirait des canaux de fragmentation différents.

III.6 Conclusion

Dans ce chapitre, après avoir rappelé les précédentes études effectuées sur le Trp-H^+ en phase gazeuse, nous avons présenté les apports de notre technique expérimentale, sur les mécanismes de photofragmentation UV à l'état excité de cette molécule. L'échelle temporelle d'observation ($t < \mu s$) utilisée dans notre dispositif et les informations obtenues sur les séquences de fragmentation nous ont permis de mettre en évidence des fragmentations très rapides ($\tau < 20$ ns), non-statistiques, produites dans l'état excité, non-détectées par les expériences de spectrométrie de masse traditionnelles. Ces résultats expérimentaux associés à des calculs *ab initio* et aux résultats d'expériences pompe-sonde femto-seconde [22-27], effectués par d'autres membres du groupe, nous ont permis d'établir un modèle de transfert d'électron dans l'état excité qui permet d'expliquer les mécanismes UVPD du Trp-H^+. Ces résultats, utilisés dans le chapitre suivant pour de petits peptides protonés contenant le Trp, sont rappelés ci-dessous. Dans le cas du Trp-H^+, après photoexcitation d'un électron de l'indole par le laser UV (263 nm), cet électron de type Rydberg peut être localisé :

- dans une orbitale $\pi\sigma^*(NH_3)$ et conduit à la perte de H
- dans une orbitale $\pi\pi^*$(indole) et conduit à la rupture de la liaison C_α-C_β après transfert de H^+ et $H^\bullet$ sur l'indole (ion *m/z* 132).
- dans une orbitale $\pi\pi^*$(chaîne peptidique) et conduit, soit à la perte de NH_3, soit à la dissociation de la liaison C_α-C_β après transfert de H^+ sur le carbonyle (ion *m/z* 130)

La localisation de cet électron de Rydberg sur les différents sites de la molécule régit la compétition entre les canaux de fragmentation à l'état excité. Ces mécanismes impliquent,

dans certains cas, un transfert de H^+ nécessaire à la fragmentation. Nous avons montré que l'éther 18-couronne-6 qui se complexe au niveau du site de protonation du Trp-H^+ inhibe les mécanismes de transfert d'électron dans l'état fondamental et excité. On observe la disparition de nombreuses voies de fragmentation mais également une modification de la spectroscopie de la molécule de Trp-H^+ (augmentation de l'énergie du $\pi\sigma^*$ de 2 eV) dû à la complexation avec un éther-couronne. Des effets statistiques et non-statistiques ont été observés sur les temps de fragmentation mesurés. L'explication des mécanismes en compétition n'est pas simple. Ce sujet qui a déjà fait l'objet de plusieurs articles, concernant l'étude de petits peptides protonés en phase gazeuse, n'est pas encore bien compris [46-48].

Les complexes Trp-H^+(CE) étudiés avec notre dispositif présentent des temps de fragmentations beaucoup plus courts et des voies de photodissociations différentes de celles observées avec le dispositif ELISA à Aarhus. Ces molécules étudiées avec notre dispositif contiennent plus d'énergie interne et présentent vraisemblablement des conformations différentes de celles étudiées à Aarhus. Notons qu'en photofragmentation VUV, des expériences récentes ont montré des résultats très différents, pour un même système étudié sur différents dispositifs [49].

En comparant les temps de fragmentation statistiques mesurés pour le complexe Trp-H^+(CE) avec notre dispositif et celui d'Aarhus, nous avons pu estimer une température vibrationnelle comprise entre 660 à 900 K pour les molécules étudiées avec notre dispositif (en considérant une température de 300 K pour les expériences d'Aarhus). L'énergie interne présente dans les systèmes que nous étudions n'est donc pas négligeable et doit être prise en considération lors de l'interprétation de nos expériences.

Bibliographie

1. J.R. Lakowicz, *Principles fluorescence spectroscopy*. 2nd ed. 1999, New York: Kluwer Academic/Plenum.
2. http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/AA1n2.html, Web page.
3. H. Lioe, R.A.J. O'Hair, G.E. Reid, *Gas-phase reactions of protonated tryptophan.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2004. **15**(1): p. 65-76.
4. Z.B. Maksic, B. Kovacevic, *Towards the absolute proton affinities of 20 [alpha]-amino acids.* Chemical Physics Letters, 1999. **307**(5-6): p. 497-504.
5. D. Nolting, C. Marian, R. Weinkauf, *Protonation effect on the electronic spectrum of tryptophan in the gas phase.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2004. **6**(10): p. 2633-2640.
6. N. Grossman, E. Ilovitz, O. Chaims, A. Salman, R. Jagannathan, S. Mark, B. Cohen, J. Gopas, S. Mordechai, *Fluorescence spectroscopy for detection malignancy: H-ras overexpressing fibroblasts as a model.* J. Biochemical and Biophysical Methods, 2001. **50**(1): p. 53-63.
7. G.M. Palmer, P.J. Keely, T.M. Breslin, N. Ramanujam, *Autofluorescence spectroscopy normal and malignant human breast cell lines.* Photochemistry and Photobiology, 2003. **78**(5): p. 462-469.
8. M. Anidjar, D. Ettori, O. Cussenot, P. Meria, F. Desgrandchamps, A. Cortesse, P. Teillac, A.L. Duc, S. Avrillier, *laser induced autofluorescence diagnosis balddr tumors.* J.Urology, 1996. **156**: p. 1590.
9. H. Shizuka, M. Serizawa, T. Shimo, I. Saito, T. Matsuura, *Fluorescence-Quenching Mechanism of Tryptophan - Remarkably Efficient Internal Proton-Induced Quenching and Charge-Transfer Quenching.* Journal of the American Chemical Society, 1988. **110**(6): p. 1930-1934.
10. N.N. Dookeran, T. Yalcin, A.G. Harrison, *Fragmentation reactions of protonated alpha-amino acids.* Journal of Mass Spectrometry, 1996. **31**(5): p. 500-508.
11. F. Rogalewicz, Y. Hoppilliard, G. Ohanessian, *Fragmentation mechanisms of [alpha]-amino acids protonated under electrospray ionization: a collisional activation and ab initio theoretical study.* International Journal of Mass Spectrometry, 2000. **195-196**: p. 565-590.
12. H. El Aribi, G. Orlova, A.C. Hopkinson, K.W.M. Siu, *Gas-phase fragmentation reactions of protonated aromatic amino acids: concomitant and consecutive neutral eliminations and radical cation formations.* Journal of Physical Chemistry A, 2004. **108**(17): p. 3844-3853.
13. F.O. Talbot, T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, *Photodissociation spectroscopy of trapped protonated tryptophan.* The Journal of Chemical Physics, 2005. **122**(7): p. 074310-5.
14. O.V. Boyarkin, S.R. Mercier, A. Kamariotis, T.R. Rizzo, *Electronic spectroscopy of cold, protonated tryptophan and tyrosine.* Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(9): p. 2816-2817.

15. T.R. Rizzo, Y.D. Park, L. Peteanu, D.H. Levy, *Electronic spectrum of the amino acid tryptophan cooled in a supersonic molecular beam.* The Journal of Chemical Physics, 1985. **83**(9): p. 4819-4820.

16. T.R. Rizzo, Y.D. Park, L.A. Peteanu, D.H. Levy, *The electronic spectrum of the amino acid tryptophan in the gas phase.* The Journal of Chemical Physics, 1986. **84**(5): p. 2534-2541.

17. T.R. Rizzo, Y.D. Park, D.H. Levy, *Dispersed fluorescence of jet-cooled tryptophan: Excited state conformers and intramolecular exciplex formation.* The Journal of Chemical Physics, 1986. **85**(12): p. 6945-6951.

18. F. Piuzzi, I. Dimicoli, M. Mons, B. Tardivel, Q. Zhao, *A simple laser vaporization source for thermally fragile molecules coupled to a supersonic expansion: application to the spectroscopy of tryptophan.* Chemical Physics Letters, 2000. **320**(3-4): p. 282-288.

19. L.C. Snoek, R.T. Kroemer, M.R. Hockridge, J.P. Simons, *Conformational landscapes of aromatic amino acids in the gas phase: Infrared and ultraviolet ion dip spectroscopy of tryptophan.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2001. **3**(10): p. 1819-1826.

20. F. Piuzzi, I. Dimicoli, M. Mons, B. Tardivel, Q.C. Zhao, *A simple laser vaporization source for thermally fragile molecules coupled to a supersonic expansion: application to the spectroscopy of tryptophan.* Chemical Physics Letters, 2000. **320**(3-4): p. 282-288.

21. G. Gregoire, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, *UV photoinduced dynamics in protonated aromatic amino acid.* European Physical Journal D, 2009. **51**(1): p. 109-116.

22. H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Photo-induced dissociation of protonated tryptophan TrpH(+): A direct dissociation channel in the excited states controls the hydrogen atom loss.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2004. **6**(10): p. 2628-2632.

23. H. Kang, C. Jouvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, C. Charriere, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Photoinduced processes in protonated tryptamine.* Journal of Chemical Physics, 2005. **122**(8): p. 7.

24. H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Control of bond-cleaving reactions of free protonated tryptophan ion by femtosecond laser pulses.* Journal of Physical Chemistry A, 2005. **109**(11): p. 2417-2420.

25. H. Kang, C. Jouvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Ultrafast deactivation mechanisms of protonated aromatic amino acids following UV excitation.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2005. **7**(2): p. 394-398.

26. G. Gregoire, C. Jouvet, C. Dedonder, A.L. Sobolewski, *On the role of dissociative pi sigma* states in the photochemistry of protonated tryptamine and tryptophan: An ab initio study.* Chemical Physics, 2006. **324**(2-3): p. 398-404.

27. G. Gregoire, C. Jouvet, C. Dedonder, A.L. Sobolewski, *Ab initio study of the excited-state deactivation pathways of protonated tryptophan and tyrosine.* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(19): p. 6223-6231.

28. V. Lepere, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, V.J. Picard, C. Jouvet, P. Carcabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, A. Fujii, *Comprehensive characterization of the photodissociation pathways of protonated tryptophan.* J Chem Phys, 2007. **127**(13): p. 134313.

29. V. Lepere, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, Y.J. Picard, C. Jouvet, P. Carcabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, A. Fujii, *Characterization of neutral fragments issued from the photodissociation of protonated tryptophane.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2007. **9**(39): p. 5330-5334.

30. B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, M. Perot, C. Jouvet, G. Gregoire, S. Brondsted Nielsen, *Mechanisms of photoinduced Calpha[Single Bond]Cbeta bond breakage in protonated aromatic amino acids.* J Chem Phys, 2008. **128**(16): p. 164302.

31. J.U. Andersen, H. Cederquist, J.S. Forster, B.A. Huber, P. Hvelplund, J. Jensen, B. Liu, B. Manil, L. Maunoury, S.B. Nielsen, U.V. Pedersen, J. Rangama, H.T. Schmidt, S. Tomita, H. Zettergren, *Photodissociation protonated amino acids and peptides in an ion storage ring. Determination Arrhenius parameters in the high-temperature limit.* Phys. Chem. Chem. Phys., 2004. **6**(10): p. 2676-2681.

32. J.U. Andersen, H. Cederquist, J.S. Forster, B.A. Huber, P. Hvelplund, J. Jensen, B. Liu, B. Manil, L. Maunoury, S.B. Nielsen, U.V. Pedersen, H.T. Schmidt, S. Tomita, H. Zettergren, *Power-law decay of collisionally excited amino acids and quenching by radiative cooling.* European Physical Journal D, 2003. **25**(2): p. 139-148.

33. M.B. Nielsen, T.J.D. Jorgensen, J.S. Forster, G. Bojesen, S.B. Nielsen, *Photoexcitation of tetrathiafulvalene radical cations in a storage ring: Kinetics and energetics of the dissociation process.* International Journal of Mass Spectrometry, 2006. **248**(1-2): p. 47-55.

34. U. Kadhane, M. Pérot, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Jouvet, A. Ehlerding, M.B.S. Kirketerp, S.B. Nielsen, J.A. Wyer, H. Zettergren, *Photodissociation of protonated tryptamine and its supramolecular complex with 18-crown-6 ether: Dissociation times and channels, absorption spectra, and excited states calculations.* Chemical Physics Letters, 2009. **480**(1-3): p. 57-61.

35. http://webbook.nist.gov/chemistry/, Web page.

36. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1987/press.html, web page.

37. O.A. Raevsky, V.P. Solov'ev, A.F. Solotnov, H.-J. Schneider, V. Rudiger, *Conformation of 18-Crown-5 and Its Influence on Complexation with Alkali and Ammonium Cations: Why 18-Crown-5 Binds More Than 1000 Times Weaker Than 18C6.* The Journal of Organic Chemistry, 1996. **61**(23): p. 8113-8116.

38. S.-W. Lee, H.-N. Lee, H.S. Kim, J.L. Beauchamp, *Selective Binding of Crown Ethers to Protonated Peptides Can Be Used To Probe Mechanisms of H/D Exchange and Collision-Induced Dissociation Reactions in the Gas Phase.* Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(23): p. 5800-5805.

39. R.R. Julian, J.L. Beauchamp, *Site specific sequestering and stabilization of charge in peptides by supramolecular adduct formation with 18-crown-6 ether by way of*

electrospray ionization. International Journal of Mass Spectrometry, 2001. **210-211**: p. 613-623.

40. T. Ly, R.R. Julian, *Using ESI-MS to Probe Protein Structure by Site-Specific Noncovalent Attachment of 18-Crown-6.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(9): p. 1209-1215.

41. M.C. Crowe, J.S. Brodbelt, *Evaluation of noncovalent interactions between peptides and polyether compounds via energy-variable collisionally activated dissociation.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(10): p. 1148-1157.

42. R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, C. Kölmel, *Electronic-Structure Calculations on Workstation Computers - the Program System Turbomole.* Chem. Phys. Lett., 1989. **162**(3): p. 165-169.

43. U. Kadhane, J.U. Andersen, A. Ehlerding, P. Hvelplund, M.-B.S. Kirketerp, M.K. Lykkegaard, S.B. Nielsen, S. Panja, J.A. Wyer, H. Zettergren, *Photodissociation of protonated tryptophan and alteration of dissociation pathways by complexation with crown ether.* The Journal of Chemical Physics, 2008. **129**(18): p. 184304-5.

44. K. Stochkel, U. Kadhane, J.U. Andersen, A.I.S. Holm, P. Hvelplund, M.B.S. Kirketerp, M.K. Larsen, M.K. Lykkegaard, S.B. Nielsen, S. Panja, H. Zettergren, *A new technique for time-resolved daughter ion mass spectrometry on the microsecond to millisecond time scale using an electrostatic ion storage ring.* Review of Scientific Instruments, 2008. **79**(2): p. 6.

45. H.D.F. Winkler, D.P. Weimann, A. Springer, C.A. Schalley, *Dynamic Motion in Crown Ether Dendrimer Complexes: A "Spacewalk" on the Molecular Scale.* Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(39): p. 7246-7250.

46. W. Cui, Y. Hu, C. Lifshitz, *Time resolved photo dissociation small peptideions - Combining laser desorptionwith ion trap/reflectron TOF mass spectromerty.* European Phys. J. D, 2002. **20**(3): p. 565-571.

47. E.W. Schlag, H.L. Selzle, P. Schanen, R. Weinkauf, R.D. Levine, *Dissociation kinetics peptide ions.* J. Phys. Chem. A, 2006. **110**(27): p. 8497-8500.

48. R. Weinkauf, E.W. Schlag, T.J. Martinez, R.D. Levine, *Nonstationary electronic states and site-selective reactivity.* Journal of Physical Chemistry A, 1997. **101**(42): p. 7702-7710.

49. M.S. Thompson, W.D. Cui, J.P. Reilly, *Factors that impact the nacuum ultraviolet photofragmentation of peptide ions.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. **18**(8): p. 1439-1452.

CHAPITRE IV

Etude des mécanismes de photofragmentation de dipeptides protonés contenant le Tryptophane

CHAPITRE IV. ETUDE DES MECANISMES DE PHOTOFRAGMENTATION DE DIPEPTIDES PROTONES CONTENANT LE TRYPTOPHANE 185

IV.1 Généralités 185
IV.1.1 Peptide et liaison peptidique 185
IV.1.2 Fragmentation d'un peptide 186
IV.1.3 Molécules étudiées 186

IV.2 Récapitulatif des résultats expérimentaux 188

IV.3 Résultats obtenus avec le piège électrostatique 191
IV.3.1 Résultats expérimentaux 192
IV.3.2 Analyse des résultats obtenus avec le piège 193
IV.3.3 Fragmentations secondaires à la perte de H observées avec la zone polarisée 195
IV.3.4 Conclusion sur les fragmentations observées aux longs temps 199

IV.4 Fragmentations initiées dans l'état excité 200
IV.4.1 Fragmentations initiées dans l'état excité pour les dipeptides $[WX +H]^+$ 201
IV.4.2 Fragmentations initiées dans l'état excité pour les dipeptides $[XW +H]^+$ 203
IV.4.3 Conclusion sur les mécanismes de fragmentations initiées dans l'état excité 211

IV.5 Fragmentations induites après conversion interne 212
IV.5.1 Fragment *m/z* 144 213
IV.5.2 Perte de H_2O et CO 215
IV.5.3 Fragmentations $a_1 - y_1$ 216
IV.5.4 Autres fragmentations produites par conversion interne 224

IV.6 Temps de fragmentation déterminé par interaction ion-laser dans un champ électrique .. 230

IV.7 Comparaison à des peptides contenant la Tyrosine 233

IV.8 Conclusion 237

Bibliographie 239

CHAPITRE IV. Etude des mécanismes de photofragmentation de dipeptides protonés contenant le tryptophane

Il nous a semblé intéressant de voir si le modèle de transfert d'électron – transfert de proton [1-3] établi pour expliquer les mécanismes de photo-fragmentation du tryptophane protoné pouvait être étendu à des petits peptides contenant le tryptophane. Pour cela nous avons étudié la dynamique de photo-fragmentation de quelques dipeptides et d'un tripeptide contenant le tryptophane [4].

IV.1 Généralités

IV.1.1 Peptide et liaison peptidique

Un di- (ou tri-)peptide est composé de deux (ou trois) acides aminés reliés entre eux par une liaison covalente appelée liaison peptidique. La liaison peptidique correspond à une fonction amide –(CO)(NH). Elle est formée par réaction entre le groupe acide –COOH d'un acide aminé et le groupe amine $–NH_2$ d'un autre acide aminé (figure IV.1)

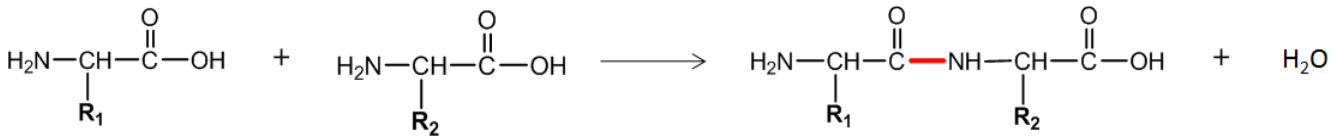


figure IV.1 : Réaction de déshydratation conduisant à la formation d'un dipeptide à partir de deux acides aminés. La liaison peptidique est représentée en rouge sur le dipeptide.

La liaison peptidique est stabilisée par mésomérie. Cette résonance implique la planéité de la chaîne peptidique. Il en découle que, dans une représentation tridimensionnelle d'un peptide, les groupements R des deux acides aminés reliés par la liaison peptidique sont alternés de part et d'autre de cette liaison. Une liaison peptidique mesure 1,32 Å [5], elle est plus courte qu'une liaison simple ordinaire mais plus longue qu'une liaison double avec une énergie de liaison de 2 à 4 kcal/mol [6].

L'ordre des acides aminés qui composent la chaîne peptidique a son importance. En effet, une des extrémités de cette chaîne est porteuse d'un groupe amine libre ($–NH_2$), on l'appelle le côté N-terminal. L'autre extrémité qui présente un groupe carboxyle (-COOH) est

le côté C-terminal (cf figure IV.1). Par convention, on représente toujours un peptide de gauche à droite, en commençant par le côté N-terminal.

IV.1.2 Fragmentation d'un peptide

En spectrométrie de masse, on utilise une nomenclature [7, 8], illustrée figure IV.2, pour désigner les fragments ioniques d'un peptide chargé. Les fragments dont la charge ionique est située du côté N-terminal sont appelés a, b et c, et ceux qui présentent une charge ionique côté C-terminal sont appelés x, y et z. Ces fragments sont numérotés à partir de 1 en commençant du côté N-terminal pour les fragments a, b et c, et en commençant du côté C-terminal pour les fragments x, y et z.

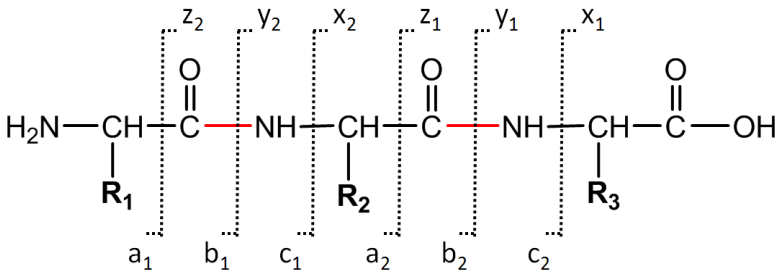


figure IV.2 : Nomenclature utilisée pour désigner les fragments ioniques produits à partir d'un tripeptide chargé

IV.1.3 Molécules étudiées

Nous nous sommes intéressés à l'étude de dipeptides contenant le Tryptophane. Nous avons voulu mettre en évidence l'influence de la position du Trp (côté N- ou C-terminal) sur les mécanismes de photofragmentation de ces dipeptides. Nous avons vu dans le chapitre précédent que les transferts de proton jouent un rôle prédominant dans la dynamique de photofragmentation du Trp-H^+. Nous allons voir dans ce chapitre que, pour des dipeptides contenant le Trp, si on fait varier la position du Trp par rapport au site de protonation, les mécanismes de photofragmentation sont modifiés.

Nous avons étudié six dipeptides pour lesquels le Trp est associé à :

- la Glycine, notée G ou Gly. C'est le plus simple des acides aminés, sa chaîne latérale étant uniquement composée d'un –H ;

- la Leucine, notée L ou Leu, dont la chaîne latérale est composée d'une chaîne alkyle ramifiée à 4 centres carbonés ;
- la Lysine, notée K ou Lys, possède pour chaîne latérale, une chaîne alkyle linéaire à 4 carbones, terminée par un groupement amine. Ce groupement, noté ε-amine, est plus basique que le groupement α-amine (N-terminal de la chaîne peptidique) [9].

Ces dipeptides ne présentent pas tous le même site de protonation. En effet, les dipeptides contenant la Lysine, $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$, sont protonés au niveau de la chaîne latérale de la Lysine, sur le groupement ε-amine [9], tandis que les autres dipeptides étudiés sont protonés sur le groupement α-amine de la chaîne peptidique, plus basique que l'azote de l'indole du Trp [10].

Nous avons également étudié le tripeptide Glycine-Tryptophane-Glycine (GWG), protoné sur le groupement α-amine. Toutes les molécules étudiées sont représentées sur la figure IV.3 avec leur site de protonation indiqué en rouge.

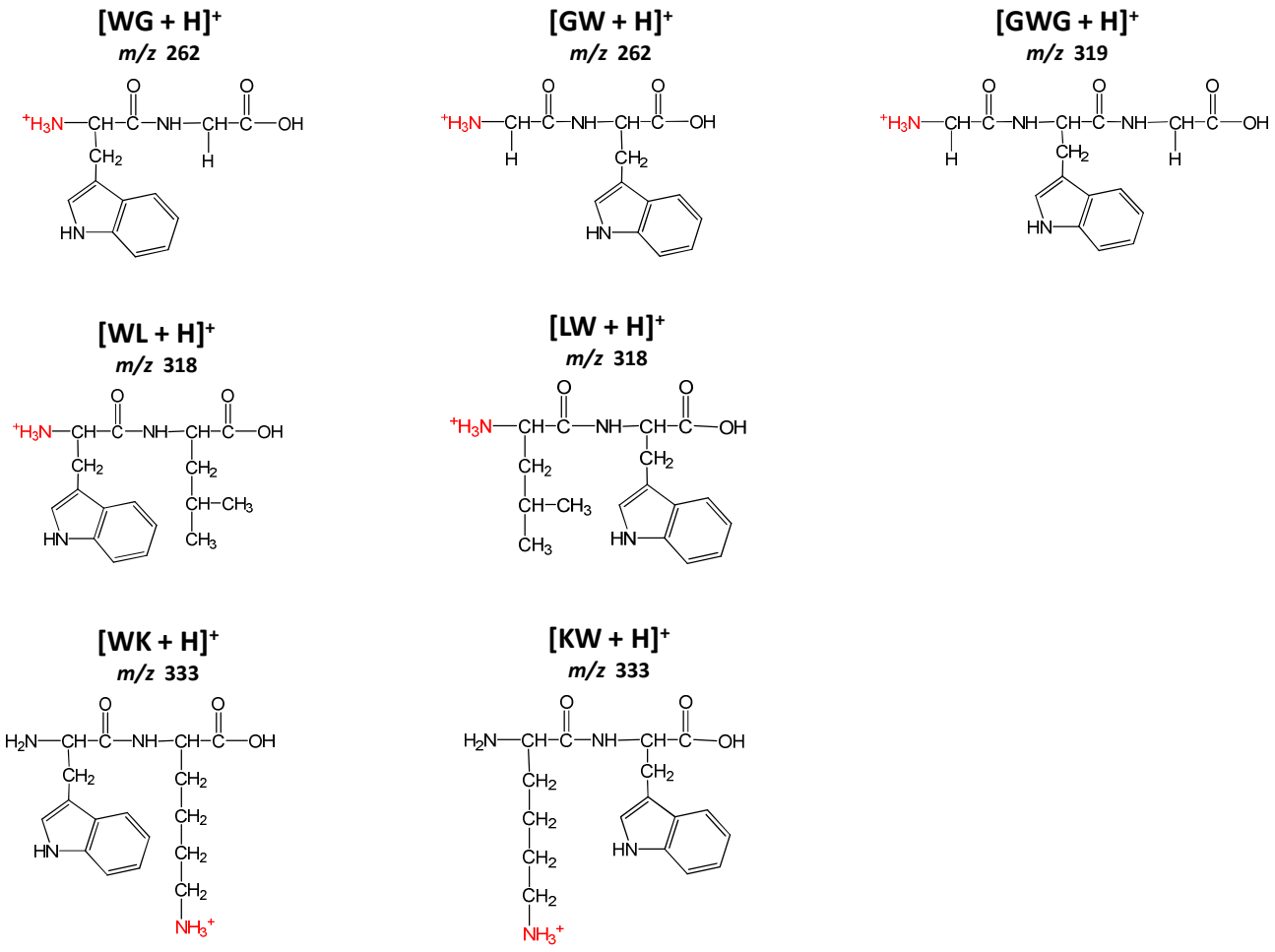


figure IV.3 : Dipeptides et tripeptide étudiés.

IV.2 Récapitulatif des résultats expérimentaux

Tous les canaux de fragmentation des molécules de la figure IV.3 ont été étudiés de façon exhaustive avec la zone polarisée. Nous avons résumé dans deux tableaux (tableau IV.1 et tableau IV.2) les différentes voies de photofragmentation de ces molécules ainsi que le nombre d'étapes de fragmentation associées, le temps de fragmentation τ mesuré et l'intensité relative de chaque canal de fragmentation.

Les résultats obtenus pour les molécules $[W + H]^+$, $[WG + H]^+$, $[WL + H]^+$, $[GW + H]^+$, $[LW + H]^+$ et $[GWG + H]^+$ sont présentés dans le tableau IV.1. Dans ce tableau, on observe des voies de photofragmentation similaires à celles du $[W + H]^+$ [2] comme le clivage de la liaison C_α-C_β donnant les fragments *m/z* 130 (temps court et temps long) et *m/z* 132 ainsi que la perte de NH_3, suivie de la production de l'ion *m/z* 144. D'autres fragmentations, différentes de celles du $[W + H]^+$ apparaissent également. Il s'agit de ruptures de la chaîne peptidique conduisant à la production d'ions de type « a », « y » et « z » (cf § IV.1.2).

On observe des fragmentations caractéristiques de la position du Tryptophane dans la chaîne peptidique. La présence du Tryptophane côté N-terminal induit spécifiquement la perte de NH_3, la fragmentation a_1 et la formation au temps long des ions *m/z* 130 et 144 ; tandis que la présence du Tryptophane côté C-terminal induit des fragmentations y_1 et z_1. Pour la molécule $[GWG + H]^+$, le Tryptophane occupe une position centrale et nous observons les fragments ioniques a_2, y_2 et z_2 qui correspondent à des fragmentations de part et d'autre du chromophore.

Notons que la rupture de la liaison C_α-C_β au temps court (formation des ions *m/z* 130 et 132) n'est pas spécifique de la position du Tryptophane. On observe cependant, pour le fragment *m/z* 132, des mécanismes directs et séquentiels qui semblent spécifiquement liés à la position du Tryptophane : côté N-terminal pour le mécanisme direct et côté C-terminal pour le mécanisme séquentiel.

Nous remarquons que tous les fragments ioniques du tableau IV.1 ont une masse supérieure ou égale à *m/z* 130. Ils contiennent tous la chaîne latérale du Tryptophane. Le potentiel d'ionisation du Tryptophane ($\leq$ 7,87 eV) [11] est plus faible que celui de Glycine ($\approx$ 9 eV) [12] et que celui de la Leucine. C'est pourquoi, pour les dipeptides et le tripeptide étudiés contenant ces acides aminés, la charge ionique est toujours présente du côté du Tryptophane.

		Rupture C_α-C_β	Rupture C_α-C_β	Perte de NH_3	Fragm. «z »	Fragm. « a »	Fragm. « y »	Perte de H_2O + CO	Fragmentations aux temps longs		
[W + H]$^+$	fragments ioniques	130$^+$	132$^+$	188$^+$				159$^+$	130$^+$	146$^+$ - 144$^+$	
***m/z* 205**	nombre d'étapes	1	1	1				2	2	2	
	constante de temps	≤ 20 ns	≤ 20 ns	≤ 20 ns				≤ 20 ns	>> 1 µs	> 1 µs	
	probabilité relative	5%	15%	13%				10%	15%	42%	
[WG + H]$^+$	fragments ioniques	130$^+$	132$^+$	245$^+$		159$^+$			130$^+$	144$^+$	244$^+$
***m/z* 262**	nombre d'étapes	1	1	1		2			2	2	2
	constante de temps	45 ns	25 ns	≤ 20 ns		30 ns			> 1 µs	> 1 µs	> 1 µs
	probabilité relative	3%	7%	8%		48%			7%	21%	6%
[WL + H]$^+$	fragments ioniques	130$^+$	132$^+$	301$^+$		159$^+$			130$^+$	144$^+$	
***m/z* 318**	nombre d'étapes	1	1	1		2			2	2	
	constante de temps	50 ns	85 ns	110 ns		130 ns			> 1 µs	> 1 µs	
	probabilité relative	2%	6%	53%		34%				5%	
[GW + H]$^+$	fragments ioniques	130$^+$	132$^+$		188$^+$		205$^+$	216$^+$			188$^+$
***m/z* 262**	nombre d'étapes	1	≥ 2		1		2	2			3
	constante de temps	50 ns	> 200 ns		70 ns		60 ns	60 ns			> 1 µs
	probabilité relative	6%	11%		18%		15%	14%			36%
[LW + H]$^+$	fragments ioniques				188$^+$		205$^+$				188$^+$
***m/z* 318**	nombre d'étapes				≥ 2		2				3
	constante de temps						> 200 ns				> 1 µs
	probabilité relative				5%		90%				5%
[GWG + H]$^+$	fragments ioniques	130$^+$	132$^+$		245$^+$	216$^+$	262$^+$				
***m/z* 319**	nombre d'étapes	1	≥ 2		1	2	2				
	constante de temps	150 ns	> 200 ns		70 ns	100 ns	50 ns				
	probabilité relative	2%	5%		21%	49%	23%				

tableau IV.1: Tableau résumant les voies de photofragmentation observées pour les molécules [W + H]$^+$, [WG + H]$^+$, [WL + H]$^+$, [GW + H]$^+$, [LW + H]$^+$ et [GWG + H]$^+$, ainsi que le temps, le nombre d'étape et l'intensité relative de chaque canal.

Les molécules $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$ ont des voies de photofragmentation différentes des autres molécules étudiées, dû à la forte basicité du N-terminal de la Lysine [9] qui modifie leur site de protonation. C'est pourquoi nous avons présenté séparément les résultats obtenus pour ces deux molécules.

		Fragmentations aux temps longs				
		Fragm. « b »	**Fragm. « a »**	**Fragm. « y »**	**Fragm. « z »**	**autres**
$[WK + H]^+$	fragments ioniques		159^+	147^+	129^+	
***m/z* 333**	nombre d'étapes		≥ 2	≥ 2	≥ 2	
	constante de temps		> 1 µs	> 1 µs	> 1 µs	
$[KW + H]^+$	fragments ioniques	**129^+**	101^+			84^+
***m/z* 333**	nombre d'étapes	**1**	≥ 2			≥ 2
	constante de temps	> 1 µs	> 1 µs			> 1 µs

tableau IV.2: Tableau résumant les voies de photofragmentation observées pour les molécules $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$, ainsi que le temps, le nombre d'étape de chaque voie.

Les fragmentations observées pour les molécules $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$, présentées dans le tableau IV.2, ont toutes une constante de temps supérieure à 1 µs. Seul le fragment *m/z* 129 de la molécule $[KW + H]^+$ est produit en une seule étape, toutes les autres voies de fragmentation mettent en jeu des mécanismes séquentiels, en plusieurs étapes. Parmi les canaux de fragmentation observés pour $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$, contrairement aux résultats présentés dans le tableau IV.1, on ne retrouve aucune des fragmentations du $[W + H]^+$. Après analyse des masses, on s'aperçoit que tous les fragments du tableau IV.2 contiennent la chaîne latérale de Lysine[20] et ne contiennent pas celle du Tryptophane, excepté le canal *m/z* 159 dans le cas de la molécule $[WK + H]^+$ (fragmentation a_1 contenant le Trp). Comme l'affinité protonique de la Lysine (237 kcal/mol) est plus importante que celle du Tryptophane (220 kcal/mol) [9], pour les dipeptides $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$, la charge ionique est préférentiellement située du côté de la Lysine.

[20] $m(-(CH_2)_4-NH_3^+) = 73$ uma; $m(\text{lysine-}H^+) = 147$ uma

Dans la suite nous notons de manière générale $[WX + H]^+$ les dipeptides étudiés pour lesquels le W est situé du côté N-terminal, l'acide aminé X pouvant être remplacé par G, L ou K. De même pour parler des trois dipeptides étudiés pour lesquels le W est situé du côté C-terminal, nous utilisons la notation $[XW + H]^+$.

Dans la suite de ce chapitre, nous présentons d'abord les résultats obtenus avec le piège électrostatique ainsi que les fragmentations consécutives à la perte de H, produites à l'extérieur de la zone polarisée (τ > 1 μs) (§ IV.3). Puis nous proposons différents mécanismes pour expliquer les fragmentations directes qui ont lieu en moins de 200 ns, considérées comme produites dans l'état excité (§ IV.4). Nous présentons l'analyse des différentes fragmentations séquentielles observées avec la zone polarisée, produites après conversion interne (§ IV.5). Les temps de fragmentation mesurés sont analysés et commentés (§ IV.6). Enfin, ce chapitre se termine en comparant les canaux de photofragmentations observés à ceux de dipeptides qui contiennent la Tyrosine (§ IV.7)

IV.3 Résultats obtenus avec le piège électrostatique

Le piège électrostatique nous permet de mettre en évidence la perte d'un fragment neutre de petite masse ($m_n \leq 5\%$ de m_0) et de mesurer le temps de vie de l'ion fragment produit. La perte d'un atome d'hydrogène a été observée pour la molécule de $Trp\text{-}H^+$ [13]. Dans le chapitre précédent, nous avons vu que le radical cation $Trp^{\bullet+}$ produit après perte de H est métastable et à un très long temps de vie [2]. La fragmentation de ce radical cation produit l'ion *m/z* 130 que nous avons pu détecter à l'extérieur de la zone polarisée.

Dans ce paragraphe, nous présentons, pour les dipeptides[21] *et le tripeptide étudiés, les résultats expérimentaux obtenus avec le piège électrostatique, l'analyse des masses et temps de vie des fragments ioniques piégés et l'analyse des fragments produits à l'extérieur de la zone polarisée qui pourraient être issus de la perte de H.*

[21] Les expériences effectuées avec le piège électrostatique pour les dipeptides $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$ ne sont pas présentées car les résultats obtenus n'ont pas été entièrement compris.

IV.3.1 Résultats expérimentaux

La figure IV.4 présente les résultats obtenus par photoexcitation dans le piège électrostatique pour les molécules $[WG + H]^+$, $[WL + H]^+$, $[GW + H]^+$, $[LW + H]^+$ et $[GWG + H]^+$. Nous montrons les spectres de temps de vol des fragments neutres obtenus, deux périodes d'oscillation (soit environ 40 µs) après l'interaction laser. On remarque sur cette figure que les molécules de même masse ont la même période d'oscillation T_0, cette période augmentant avec la masse incidente piégée ($T_0 \propto \sqrt{m_0}$, cf chapitre I).

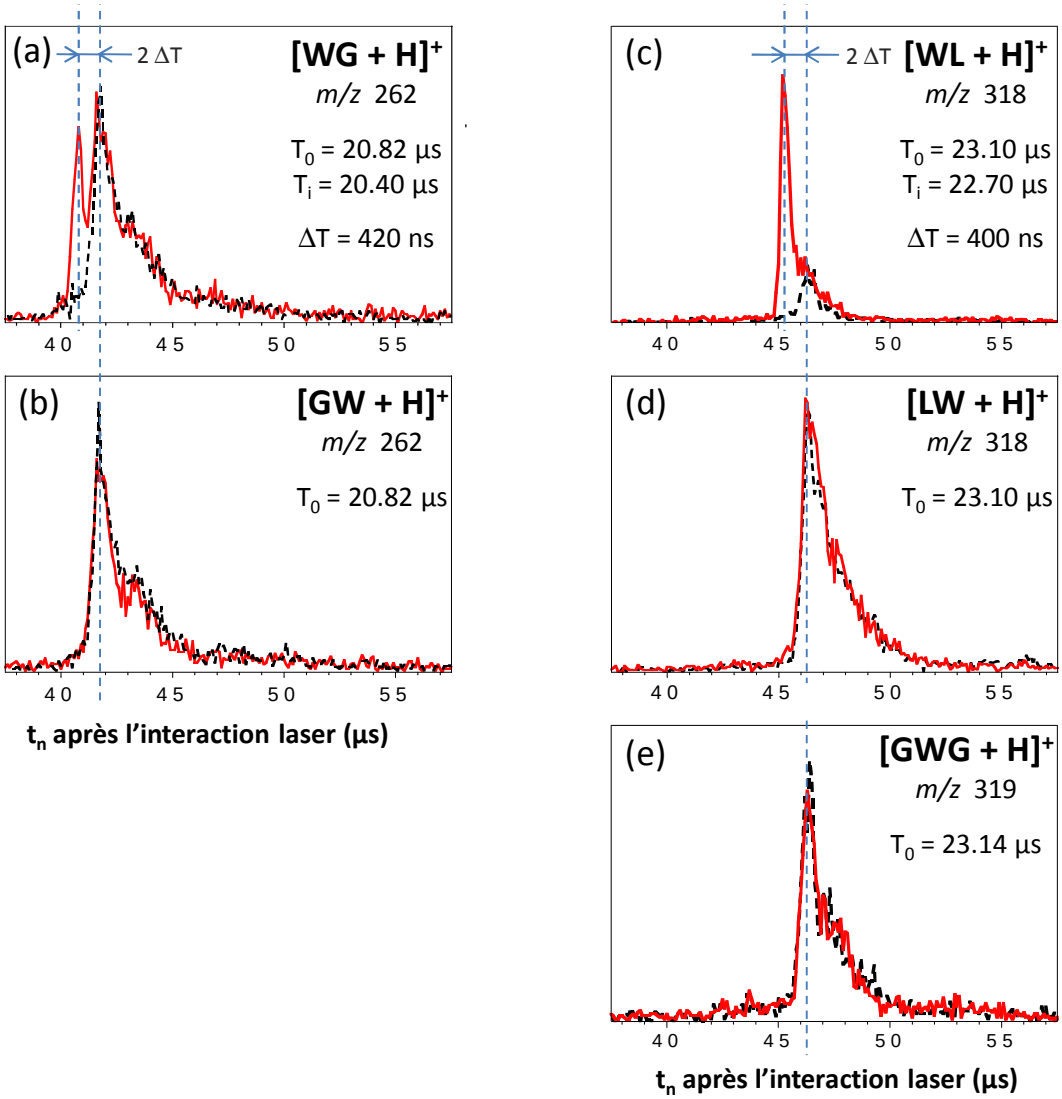


figure IV.4 : Résultats obtenus dans le piège électrostatique pour les molécules $[WG + H]^+$, $[WL + H]^+$, $[GW + H]^+$, $[LW + H]^+$ et $[GWG + H]^+$, deux périodes d'oscillation après l'interaction laser. En trait plein rouge : signal enregistré avec le laser allumé (signal de photofragmentation + signal de collision) ; en trait pointillé noir : signal enregistré sans le laser (signal de collision uniquement)

Sur la figure IV.4, le pic relatif aux fragments neutres issus de la dissociation des ions parents piégés est indiqué par un trait pointillé sur les spectres de temps de vol de la figure IV.4. Pour toutes les molécules étudiées, le signal enregistré avec laser se superpose parfaitement au signal enregistré sans laser. Toutes les molécules incidentes excitées ont donc fragmenté en moins de 40 à 45 µs.

Sur les spectres de temps de vol des neutres des molécules $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$ (figure IV.4.a. et c.) nous observons un pic supplémentaire qui correspond à la présence d'un photofragment ionique piégé.

IV.3.2 Analyse des résultats obtenus avec le piège

Pour $[WG + H]^+$ (figure IV.4.a), le photofragment ionique qu'on observe est piégé durant 4 oscillations avec l'ion parent. Pour cet ion fragment, nous avons mesuré un temps de vie $\tau \approx 20$ +/- 10 µs (figure IV.5.a). Pour $[WL + H]^+$ (figure IV.4.c), un photofragment ionique est piégé avec l'ion parent pendant 18 oscillations. Le temps de vie que nous avons mesuré pour ce fragment est de $\tau \approx 45$ +/- 5 µs (figure IV.5.b).

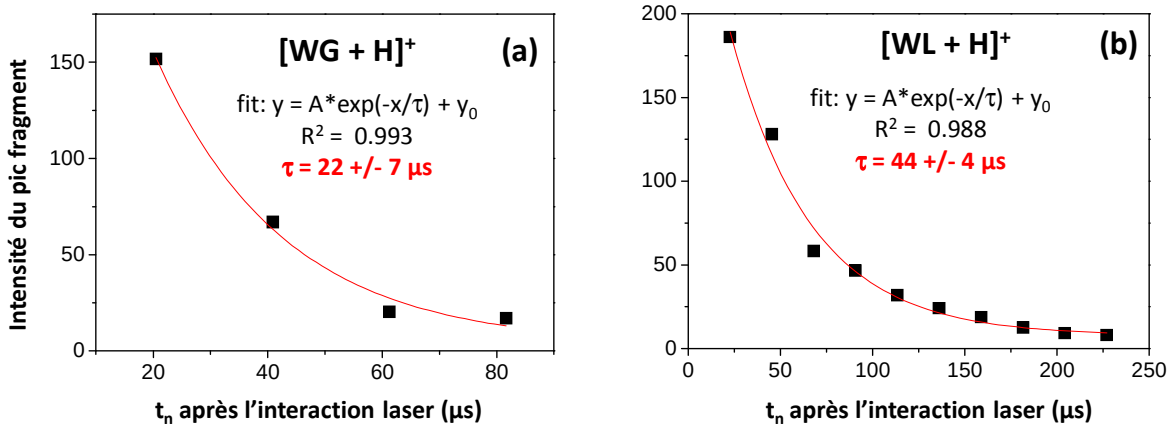


figure IV.5 : modélisation du temps de vie de l'ion fragment piégé avec les molécules $[WG + H]^+$ (graphe a.) et $[WL + H]^+$ (graphe b.).

Connaissant sa période d'oscillation, nous pouvons calculer la masse du fragment ionique piégé de deux manières, en utilisant, soit une expression analytique, soit une modélisation effectuée avec le logiciel SIMION. Les résultats obtenus par ces deux méthodes, pour estimer la masse du fragment ionique piégé avec $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$, sont présentés sur la figure IV.6.

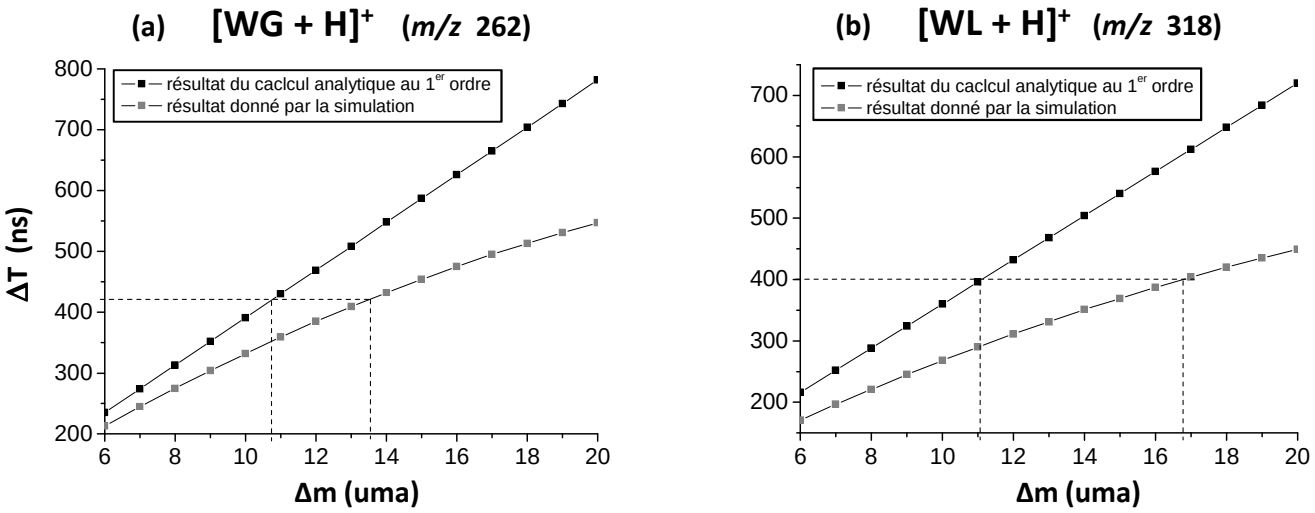


figure IV.6 : Calcul du décalage de période d'oscillation $\Delta T = (T_0 - T_i)$ entre l'ion fragment piégé (m_i) et l'ion incident (m_0), en fonction de leur différence de masse $\Delta m = (m_0 - m_i)$, pour les molécules incidentes $[WG + H]^+$ (graphe a.) et $[WL + H]^+$ (graphe b.). La valeur expérimentale obtenue pour ΔT est indiquée en trait pointillé ainsi que le Δm correspondant, calculé avec l'expression analytique et donné par la simulation SIMION. Graphe a : ΔT_{exp} = 420 ns pour $[WG + H]^+$; graphe b : ΔT_{exp} = 400 ns pour $[WL+ H]^+$

D'après l'expression analytique, on obtient $\Delta m \approx 11$ uma pour $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$. En utilisant la modélisation établie avec le programme SIMION, on obtient $\Delta m \approx 13.5$ uma pour $[WG + H]^+$ et $\Delta m \approx 17$ uma pour $[WL + H]^+$. La masse Δm = 17 ou 18 uma est la masse la plus proche de celle calculée, pouvant correspondre à une molécule neutre éjectée. On conclut donc que le fragment ionique piégé avec les molécules $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$ est issu de l'éjection d'une molécule NH_3 ou H_2O (ou $H + NH_3$). Pour préciser plus finement la nature de ces fragments ioniques, nous utilisons les résultats des expériences en coïncidence.

IV.3.2.1 <u>Piégeage du radical cation $[m_0 - 1]^{+\bullet}$ issu de la perte de H ?</u>

L'équipe d'Aarhus a également étudié les molécules $[WG + H]^+$ et $[GW + H]^+$ en UVPD (263 nm) dans l'anneau de stockage ELISA [14]. Les spectres d'action enregistrés entre 220 et 360 nm pour ces deux molécules présentent deux profils différents qui indiquent que la perte de H est présente pour $[GW + H]^+$ (radical cation $[GW]^{\bullet+}$ piégé avec l'ion parent) et absente pour $[WG + H]^+$.

A partir de ces observations, nous avons analysé plus en détail les résultats obtenus avec le piège électrostatique (figure IV.4) afin de voir si la perte de H était présente, même en faible intensité, pour l'une ou l'autre des molécules étudiées.

Nous rappelons ici l'expression analytique au premier ordre, qui relie le décalage de période ΔT et la différence de masse Δm, entre la molécule incidente et le fragment ionique piégé :

$$\text{(IV.1)} \qquad \Delta T = \left(T_0 - \ell_p \sqrt{\frac{2m_0}{E_0}}\right)\frac{\Delta m}{m_0}$$

avec ℓ_p, la longueur de vol libre sans champ du piège électrostatique (ℓ_p = 226 mm) et E_0 l'énergie des ions incidents à l'entrée du piège (E_0 = 2500 eV).

A partir de l'expression (IV.1), pour Δm = 1 uma, on calcule ΔT = 39 ns pour les molécules $[WG + H]^+$ et $[GW + H]^+$ de masse m_0 = 262 uma dont la période d'oscillation est T_0 = 20.82 µs. Pour les molécules $[WL + H]^+$ et $[LW + H]^+$ de masse m_0 = 318 uma et de période d'oscillation T_0 = 23.10 µs, on calcule ΔT = 36 ns pour Δm = 1 uma. Après deux périodes d'oscillations, un radical cation piégé produirait des fragments neutres décalés d'environ 80 ns par rapport aux neutres issus des ions parents. Ces fragments neutres seraient quasiment superposés à ceux issus des ions parents.

Pour toutes les molécules étudiées, présentées sur la figure IV.4, il n'y a aucune contribution induite par le laser au niveau du pic parent. Pour ces molécules, on ne piège donc pas le radical cation $[m_0 - 1]^{\bullet+}$. Si ce canal existe, le radical cation a un temps de vie inférieur à la dizaine de microseconde.

IV.3.3 Fragmentations secondaires à la perte de H observées avec la zone polarisée

Avec la zone polarisée, il n'est pas possible de mettre directement en évidence le canal de perte de H. On ne peut donc pas étudier les ions issus de la perte de H par des expériences en coïncidence. Nous pouvons cependant mettre en évidence des fragmentations consécutives à la perte de H, avec la zone polarisée. Citons l'exemple de la production lente (τ > µs) de l'ion *m/z* 130 issu de $Trp^{\bullet+}$, observée à l'extérieur de la zone polarisée (cf chapitre III).

Le radical cation $[m_0 - 1]^{\bullet+}$, issu de la perte de H des dipeptides étudiés, n'a pas été observé dans le piège. S'il existe, il a un temps de vie inférieur à 10 µs. Dans ce paragraphe

nous avons essayé de mettre en évidence des fragmentations secondaires produites après perte de H, qui se produisent en moins de 10 µs, à l'extérieur de la zone polarisée

IV.3.3.1 Fragments *m/z* 130 (extérieur) pour $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$

La figure IV.7 compare pour un même temps d'acquisition, un enregistrement avec et sans laser effectué pour les ions *m/z* 130 et 132 de $[WG + H]^+$. Sur le diagramme avec laser (b), malgré la polarisation en champ électrique, les contributions intérieures et extérieures de l'ion *m/z* 130 sont parfaitement séparées. Ceci indique la présence de deux mécanismes différents pour le canal *m/z* 130, comme ce qui a été observé pour le $[W + H]^+$. Pour $[WG + H]^+$, nous avons vérifié que la composante extérieure de l'ion *m/z* 130 n'est pas due uniquement à des collisions. Un traitement sans coïncidences, tel celui effectué sur la figure IV.7, permet de comparer les deux enregistrements effectués. On estime l'intensité des photofragments par rapport à celle des fragments produits par collision en superposant sur l'axe y_i la projection des enregistrements avec et sans laser (figure IV.7).

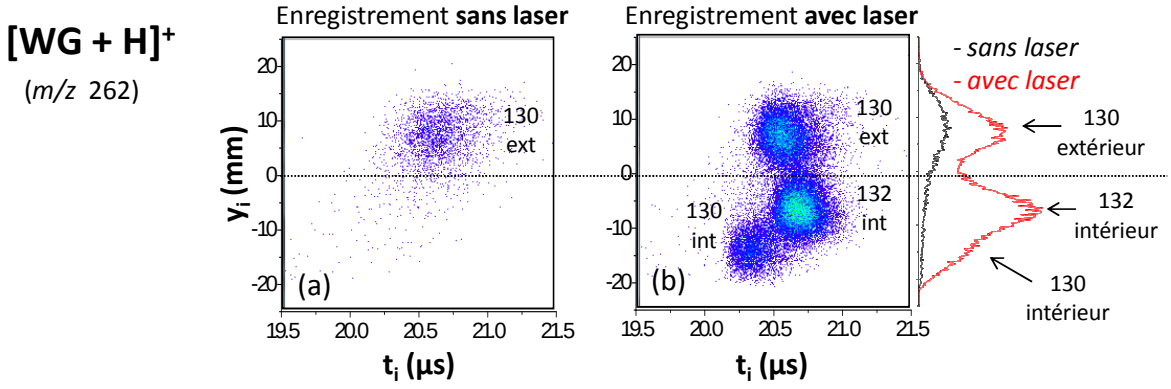


figure IV.7 : Diagrammes $N(y_i, t_i)$ traités sans coïncidence, enregistrés pendant un même temps d'acquisition, avec la zone polarisée par un champ électrique de 250 V, pour les ions m/z 130 et 132 de $[WG + H]^+$, sans laser (a) et avec laser (b). La projection sur l'axe y_i est représentée en noir pour l'enregistrement sans laser et en rouge pour celui avec laser.

A l'extérieur de la zone polarisée, pour le canal *m/z* 130 de $[WG + H]^+$, on observe 1/3 de fragments produits par collision avec le gaz résiduel pour 2/3 de photofragments détectés. On suppose que ces photofragments *m/z* 130 produits avec un long temps sont formés après perte de H, suivant le même mécanisme que pour $[W + H]^+$.

Le diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ de la figure IV.8(a) a été effectué à partir des mêmes évènements que ceux de la figure IV.7, traités cette fois en coïncidence. Le diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ associé à la contribution extérieure de l'ion *m/z* 130 de $[WG + H]^+$ est donné sur la figure

IV.8(b). Sur ce diagramme, malgré le « bruit » créé par les collisions, une contribution centrale plus intense est présente. Cette contribution, bien qu'un peu large, semble s'aligner sur la droite de pente -132/130. Ceci justifie le mécanisme séquentiel proposé : perte rapide de H suivie de la fragmentation lente de la liaison C_α-C_β. Pour $[WL + H]^+$, on observe le même type de résultats que ceux observés pour $[WG + H]^+$ (figure IV.8.c. et d.)

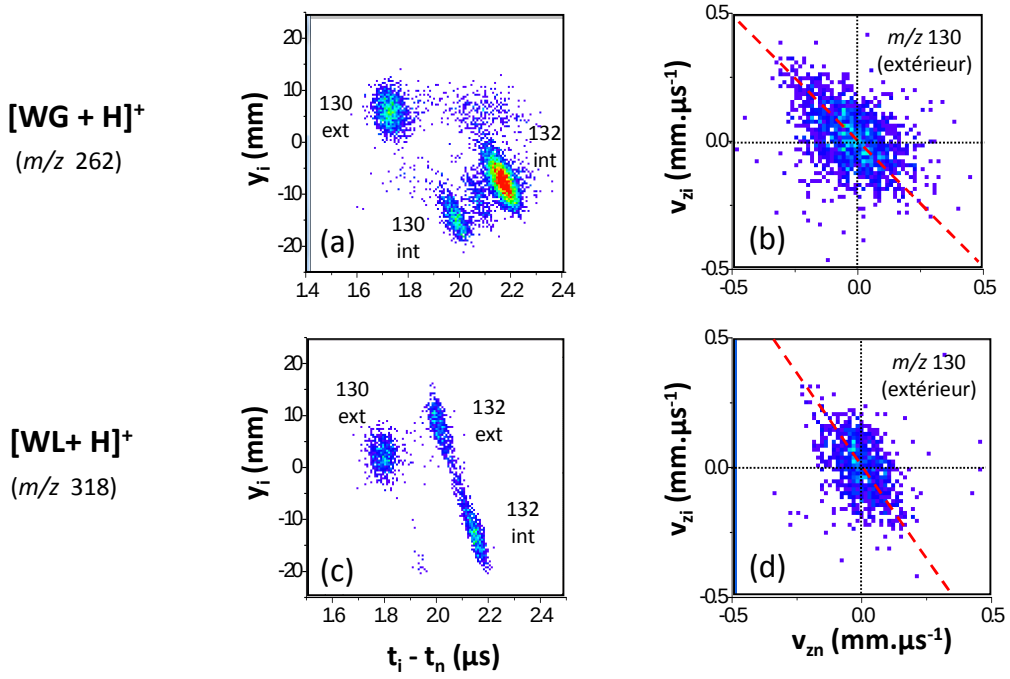


figure IV.8 : Diagrammes $N(y_i, t_i - t_n)$ traités en coïncidence, enregistrés pour les ions m/z 130 et 132 de $[WG + H]^+$ (a) et $[WL + H]^+$ (c). Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ associés aux contributions extérieures des ions m/z 130 pour $[WG + H]^+$ (b) et $[WL + H]^+$ (d).

Si on suppose que le mécanisme lent de production des ions *m/z* 130 pour $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$ est le même que celui de $[W + H]^+$, cela signifie que les radicaux cations $[WG]^{\bullet+}$ et $[WL]^{\bullet+}$ sont beaucoup moins stables que $[W]^{\bullet+}$ car on n'a pas pu les mettre en évidence dans le piège électrostatique. Contrairement aux résultats obtenus à Aarhus [14], nous pensons qu'un radical cation $[WG]^{\bullet+}$ est mis en jeu dans les expériences que nous avons effectuées.

IV.3.3.2 Fragment *m/z* 244 (extérieur) de $[WG + H]^+$

Un autre fragment a été observé, présent uniquement à l'extérieur de la zone polarisée. La figure IV.9 compare pour un même temps d'acquisition, un enregistrement sans et avec

laser, effectués pour l'ion *m/z* 245 de $[WG + H]^+$. Les évènements de la figure IV.9 sont traités sans coïncidence. Sur l'enregistrement avec laser, figure IV.9(b), la composante intérieure correspond à l'ion *m/z* 245 (perte de NH_3) produit avec un temps de fragmentation τ = 20 ns. Cet enregistrement a été effectué avec la zone polarisée par un champ électrique. La séparation des contributions intérieures et extérieures, sur la figure IV.9(b), indique qu'il s'agit de deux mécanismes. En comparant les projections sur l'axe y_i des enregistrements avec et sans laser, on met en évidence la présence de photofragments à l'extérieur de la zone polarisée.

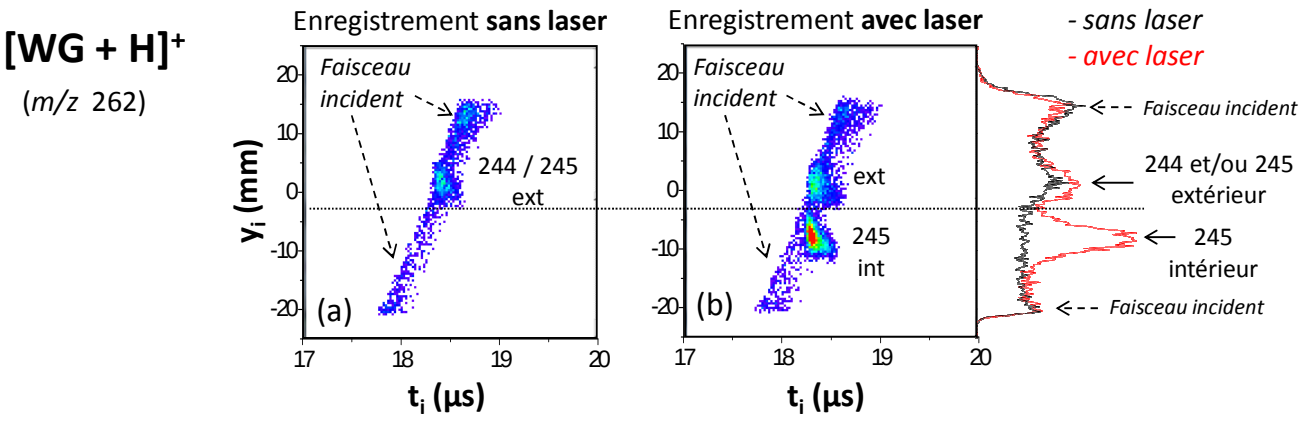


figure IV.9 : Diagramme enregistré (sans coïncidence) avec et sans laser correspondant aux fragments 244 et 245 du système $[WG + H]^+$. La traînée oblique correspond au « bruit » provenant du faisceau incident

Il est difficile de déterminer avec la simulation si les photofragments produits à l'extérieur correspondent à un ion *m/z* 244 ou *m/z* 245 (figure IV.9.b). Pour expliquer ce photofragment produit avec un long temps de fragmentation (τ > µs), nous nous sommes appuyés sur le travail de Bagheri-Majdi *et al* [15], sur la fragmentation CID de radicaux $[m_0 - 1]^{\bullet+}$. Pour le radical cation $[WG]^{\bullet+}$ (*m/z* 261), le principal fragment qu'ils observent est l'ion *m/z* 244 qui correspond à la perte de NH_3. D'après ces résultats, nous pensons que les photofragments produits à l'extérieur de la zone polarisée (figure IV.9.b) correspondent à des ions *m/z* 244 issus de la perte consécutive de H puis de NH_3.

IV.3.4 Conclusion sur les fragmentations observées aux longs temps

A l'extérieur de la zone polarisée, nous avons mis en évidence plusieurs fragmentations probablement produites après la perte d'un atome H :

- les ions *m/z* 130 et 244 pour $[WG + H]^+$
- les ions *m/z* 130 pour $[WL + H]^+$

Nous n'avons pas observé de photofragments ioniques *m/z* 300 produits à l'extérieur de la zone polarisée pour $[WL + H]^+$ (*m/z* 318). La perte de H + NH_3 présente pour $[WG + H]^+$ est donc absente pour $[WL + H]^+$.

Notons que, dans les expériences de Bagheri-Majdi *et al.* [15], après perte de H, le fragment *m/z* 130 n'est pas observé alors que nous l'observons accompagné de l'ion *m/z* 244 en UVPD. Il est possible que le radical cation $[WG]^{\bullet+}$ formé par UVPD n'ait pas la même structure qu'un radical cation produit par CID sur des complexes $[Cu^{II}(dien)M]^{\bullet 2+}$. La différence d'énergie interne entre les molécules étudiées par Bagheri-Majdi *et al.* [15] et celles que nous avons étudiées peut également être à l'origine de l'absence de cet ion *m/z* 130 dans leurs expériences. Notons cependant que l'ion *m/z* 130 semble être une fragmentation plus privilégiée en UVPD qu'avec d'autres techniques de fragmentation.

Pour $[GW + H]^+$, nous n'avons pas vu de fragmentations secondaires se produisant, après la perte de H, à l'extérieur de la zone polarisée. Contrairement aux expériences effectuées à Aarhus [14] où la perte de H est observée pour $[GW + H]^+$ et absente pour $[WG + H]^+$, nous supposons que la perte de H est présente pour les molécules $[WG + H]^+$ et absente pour $[GW + H]^+$. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, cette différence peut s'expliquer par une différence d'énergie interne et de conformations des molécules étudiées.

Molécule	T_0 (µs)	T_i (µs)	ΔT (ns)	$m_{i\ piégé}$	τ (µs)
[WG+ H]⁺ m/z 262	20.82	22.4	420	244⁺ ou 245⁺	20
[WL + H]⁺ m/z 318	23.10	22.7	400	300⁺ ou 301⁺	40
[GW + H]⁺ m/z 262	20.82	-	-	-	
[LW + H]⁺ m/z 318	23.10	-	-	-	
[GWG + H]⁺ m/z 319	23.14	-	-	-	

tableau IV.3 : Résumé des résultats obtenus avec le piège électrostatique pour les dipeptides et le tripeptide étudiés

Nous rappelons dans le tableau IV.3 les résultats obtenus avec le piège électrostatique pour les dipeptides étudiés. Pour la molécule $[WG + H]^+$, l'ion piégé peut correspondre au fragment *m/z* 244 produit après perte de H. Dans ce cas, le fragment ionique piégé avec $[WL + H]^+$ n'est pas issu du même mécanisme (pas de photofragments *m/z* 300 observé)

Pour les deux molécules $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$, nous avons observé le canal *m/z* 144 produit après perte de NH_3. La perte de NH_3 a lieu en moins de 100 ns et le temps de fragmentation mesuré pour l'ion *m/z* 144 est supérieur à 1 µs (tableau IV.1, page 189). Le photofragment ionique piégé avec l'ion parent peut donc être l'ion *m/z* 245 pour $[WG + H]^+$ et l'ion *m/z* 301 pour $[WL + H]^+$ qui fragmentent avec un temps $\tau > 1$ µs à l'échelle de la zone polarisée ou un temps de vie $\tau \approx 20$ µs et 40 µs respectivement, à l'échelle du piège.

Bien qu'aucun radical cation $[m_0 - 1]^{\bullet +}$ n'ait été observé avec le piège électrostatique, nous pensons que la perte de H est présente pour les molécules $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$.

IV.4 Fragmentations initiées dans l'état excité

Dans cette partie nous nous intéressons aux fragmentations binaires qui se produisent en moins de 200 ns. Les molécules $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$ ne présentent que des temps de fragmentation $\tau >$ µs (tableau IV.2). Les canaux de fragmentations de ces molécules ne sont donc pas analysés dans cette partie. Sur la base du même mécanisme de transfert d'électron et de proton à l'état excité que celui présenté pour le Trp-H^+ au chapitre précédent, nous pouvons expliquer les différentes fragmentations binaires observées comme des fragmentations issues de l'état excité.

Nous nous intéresserons d'abord aux molécules pour lesquelles le Tryptophane est situé côté N-terminal puis celles pour lesquelles il est situé côté C-terminal.

IV.4.1 Fragmentations initiées dans l'état excité pour les dipeptides [WX +H]$^+$

Cette partie présente les fragmentations binaires des molécules [WG + H]$^+$ et [WL + H]$^+$, qui se produisent en moins de 200 ns, ainsi que le mécanisme proposé pour expliquer ces fragmentations.

IV.4.1.1 Résultats expérimentaux

Pour les molécules [WG + H]$^+$ et [WL + H]$^+$, les ions *m/z* 130 et 132 (rupture de la liaison C_α-C_β) et la perte de NH_3 sont produits en une seule étape (cf tableau IV.1). Les diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) de ces trois canaux de fragmentation sont présentés sur la figure IV.10, pour les molécules [WG + H]$^+$ et [WL + H]$^+$. Sur chaque diagramme, les points expérimentaux sont alignés sur la droite de pente (m_0 - m_i)/m_i. Il s'agit donc de mécanismes produits en une étape.

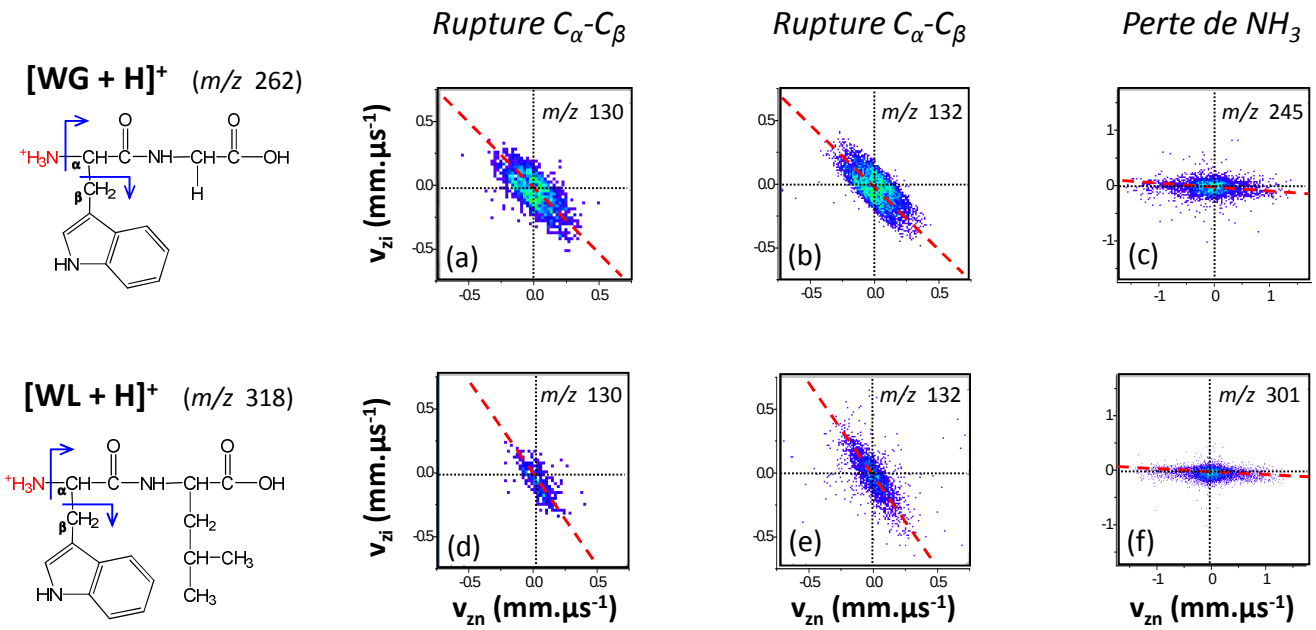


figure IV.10 : Diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) illustrant les fragmentations directes observées pour les molécules [WG + H]$^+$ et [WL + H]$^+$. La pente des droites en trait rouge pointillé est égale au rapport de masses m_n / m_i pour chaque canal de fragmentation.

Les fragments *m/z* 245 et *m/z* 301 correspondent à une perte de NH_3 pour les molécules [WG + H]$^+$ (*m/z* 262) et [WL + H]$^+$ (*m/z* 318) respectivement. Les trois canaux de fragmentation de [WG + H]$^+$ et [WL + H]$^+$ présentés sur la figure IV.10 sont des fragmentations produites en une étape, à l'intérieur de la zone polarisée (τ < 200 ns) comme pour [W + H]$^+$ (cf tableau IV.1, page 189).

IV.4.1.2 Modèle de transfert d'électron / transfert de proton

Pour le $[W + H]^+$ nous expliquons la perte de NH_3 et production des ions *m/z* 130 et 132 par un modèle de transfert d'électron et de proton dans l'état excité [2] (cf chapitre III). Nous avons décliné ce modèle et l'avons appliqué aux molécules $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$. Ce modèle permet ainsi d'expliquer les fragmentations directes, *m/z* 130, *m/z* 132 et la perte de NH_3 observées pour ces deux molécules (cf figure IV.10).

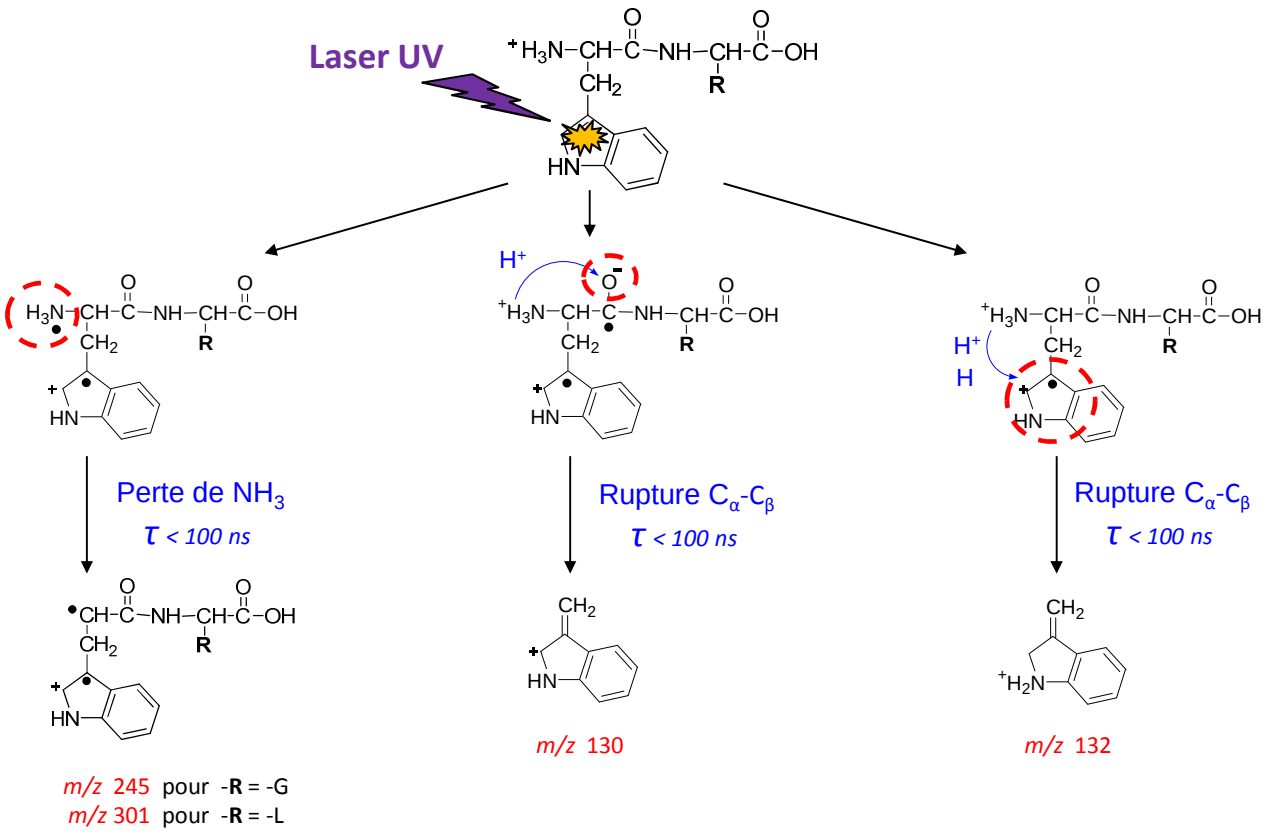


figure IV.11 : Modèle de transfert local d'électron suivi d'un transfert de proton, appliqué aux dipeptides $[WX + H]^+$ protonés sur le N-terminal.

Nous suggérons un mécanisme tel celui présenté sur la figure IV.11 pour expliquer les fragmentations directes de $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$. Après photo-excitation d'un électron de l'indole par le laser UV, nous considérons pour ces molécules les trois mêmes sites de transfert de l'électron actif, que ceux impliqués dans la photo-fragmentation de $[W + H]^+$ (cf chapitre III). Suivant cette hypothèse, l'électron photo-excité est transféré, soit sur le N-terminal, soit sur le carbonyle central ou reste localisé au niveau du chromophore. Un transfert d'électron sur le N-terminal affaiblit la liaison N_{term}-C_α et conduit à la perte du NH_3

de la chaîne peptidique [16] (branche de gauche de la figure IV.11). Un transfert d'électron suivi d'un transfert de proton sur le carbonyle affaiblit la liaison C_α-C_β et conduit à la formation d'un ion *m/z* 130 en une étape [16] (branche centrale de la figure IV.11). La production de l'ion *m/z* 132 en une étape est induite par un transfert de proton dans l'état excité sur le cycle aromatique, suivi d'un transfert d'hydrogène sur le cycle [17] (branche de droite de la figure IV.11).

D'après le mécanisme proposé sur la figure IV.11, pour $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$, les trois canaux *m/z* 130, *m/z* 132 et la perte de NH_3 sont produits dans l'état excité comme pour $[W + H]^+$. D'après ce mécanisme, par rapport au $[W + H]^+$, l'ajout d'une Glycine ou d'une Leucine, côté C-terminal du W, pour former un dipeptide, ne modifie pas les fragmentations dans l'état excité. Contrairement aux dipeptides $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$ qui ne comportent qu'un seul groupement amine, le dipeptide $[WK + H]^+$ en comporte deux dont un, situé sur la chaîne latérale de la Lysine. L'ajout d'une Lysine, côté C-terminal du Trp, modifie le site de protonation par rapport à $[W + H]^+$. On constate que toutes les fragmentations qui pourraient être produites dans l'état excité sont inhibées. Nous supposons que la forte affinité protonique de la Lysine empêche les transferts de proton à l'état excité et donc la production des ions *m/z* 130 et 132 (figure IV.11). La perte de NH_3 n'est pas observée pour le dipeptide $[WK + H]^+$. L'état excité qui conduit à cette fragmentation est donc trop haut en énergie pour être atteint pour la molécule $[WK + H]^+$.

Comme les deux molécules $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$ vérifient le schéma de fragmentation proposé sur la figure IV.11, on peut supposer que ce schéma est encore valable pour d'autres dipeptides protonés sur le N-terminal de la chaîne peptidique et contenant le W côté N-terminal. En revanche, ce schéma ne s'applique pas à des dipeptides protonés sur leur chaîne latérale, tels $[WK + H]^+$, qui contiennent, en plus du W, un acide aminé d'affinité protonique supérieure à celle de W.

IV.4.2 Fragmentations initiées dans l'état excité pour les dipeptides $[XW + H]^+$

Dans cette partie nous présentons les fragmentations directes observées ou attendues pour les molécules $[GW + H]^+$ et $[LW + H]^+$ puis le mécanisme proposé pour expliquer les fragmentations directes de $[GW + H]^+$.

IV.4.2.1 Résultats expérimentaux

La figure IV.12 représente les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ des fragmentations directes observées pour les molécules $[GW + H]^+$ et $[LW + H]^+$ (cf tableau IV.1, page 189).

Pour $[GW + H]^+$, les ions *m/z* 130 et *m/z* 188 sont produits de façon binaire. Sur les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$, (a) et (c) de la figure IV.12, associés à ces deux canaux de fragmentation, nous avons tracé une droite de pente $(m_0 - m_i)/m_i$ qui confirme que ces mécanismes se font en une étape. Pour l'ion *m/z* 132 de la molécule $[GW + H]^+$, diagramme (b) de la figure IV.12, on s'attendait à observer un mécanisme direct comme pour l'ion *m/z* 132 de la molécule $[WG + H]^+$ (figure IV.10.b.). Cependant, le diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ associé à l'ion *m/z* 132 de $[GW + H]^+$ présente une forme différente de projection plus circulaire qui suggère un mécanisme de fragmentation séquentiel rapide.

Pour $[GW + H]^+$ et $[LW + H]^+$, les ions *m/z* 188 correspondent à la fragmentation z_1 de la chaîne peptidique, c'est-à-dire à une rupture de la liaison N-C_α, la charge ionique restant localisée du côté du Tryptophane (côté C-terminal). Le diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ associé à l'ion *m/z* 188 de $[LW + H]^+$, diagramme (d) de la figure IV.12, présente une forme circulaire qui suggère un mécanisme séquentiel. D'après les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$, (c) et (d), La fragmentation z conduit donc à deux mécanismes différents pour les molécules $[GW + H]^+$ et $[LW + H]^+$.

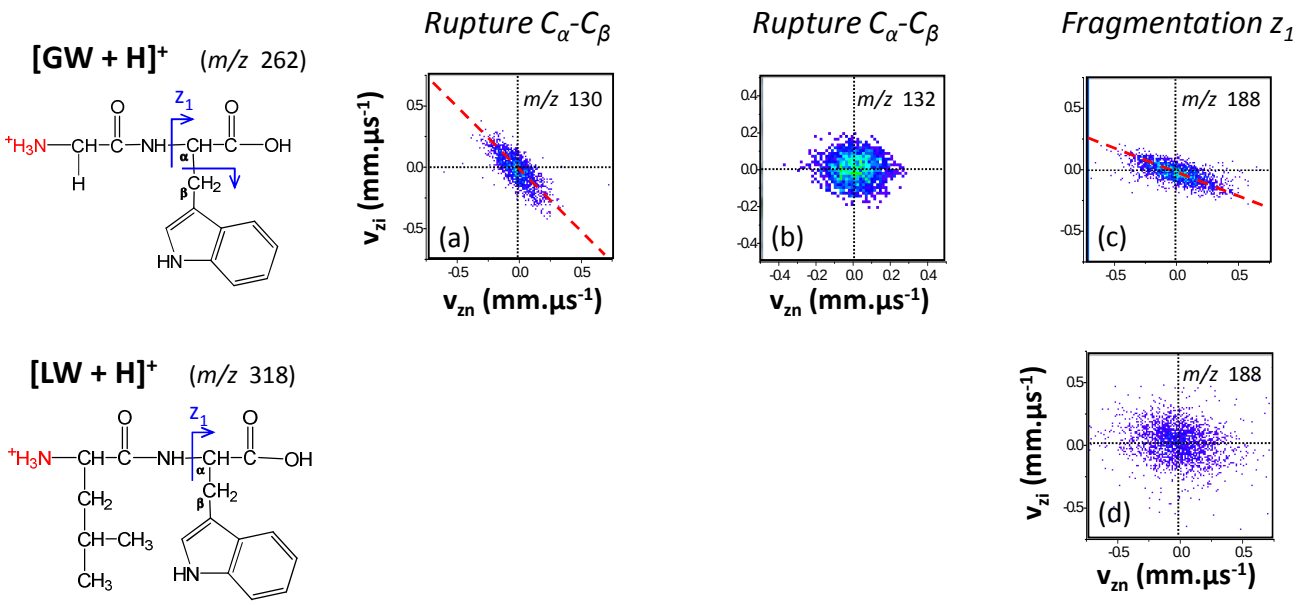


figure IV.12 : Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ illustrant les fragmentations directes observées ou attendues pour les molécules $[GW + H]^+$ et $[LW + H]^+$. Les droites en trait rouge pointillé représentent le rapport de masses m_n / m_i.

Pour les canaux de fragmentation *m/z* 132 de $[GW + H]^+$ et *m/z* 188 de $[LW + H]^+$, associés à des mécanismes séquentiels, plusieurs fragments neutres sont détectés en coïncidences avec le fragment ionique final. Ces fragments neutres n'ont pas pu être séparés temporellement. Comme les diagrammes (b) et (d) ont une forme complètement circulaire, il n'est pas possible non plus de séparer et d'identifier les fragments neutres émis, suivant leurs déviations relatives. On ne peut donc pas expliquer ces deux mécanismes.

IV.4.2.2 Spécificité de la fragmentation z

Les fragmentations c et z (rupture de la liaison $N\text{-}C_\alpha$) sont les principales fragmentations observées en ECD [18], dissociation par capture d'électron de faible énergie, et en ETD [19], dissociation par transfert d'électron. Les premières expériences d'ECD ont été réalisées en 1998 [18]. Depuis, comme nous allons le présenter ci-dessous, de nombreux mécanismes ont été suggérés pour expliquer les fragmentations c et z observées

En ECD, la rupture de la liaison $N\text{-}C_\alpha$ de la chaîne peptidique conduit à la production d'un fragment c à couche électronique complète et d'un radical $z^\bullet$ à couche électronique ouverte schématisée sur la figure IV.13. D'après le mécanisme de Cornell, proposé par McLafferty [18], mécanisme (a) sur la figure IV.13, l'attachement électronique a lieu au niveau du site de protonation ($-NH_3^+$) et entraîne la formation d'une espèce hypervalente instable ($-NH_3^\bullet$) qui conduit à l'éjection d'un atome d'Hydrogène. Si ce site de protonation est relié à un carbonyle par une liaison hydrogène intramoléculaire, l'atome d'hydrogène éjecté est transféré sur ce carbonyle qui devient radicalaire. La liaison $N\text{-}C_\alpha$ associée au carbonyle est alors affaiblie et se dissocie.

Un autre type de mécanisme implique une capture électronique dans une orbitale de Rydberg (π^*) du carbonyle conduisant à la formation d'un radical anion. Dans le mécanisme de Turecek [20], mécanisme (b_1) de la figure IV.13, cette espèce se comporte comme une superbase et permet le rapprochement d'un site de protonation. Si un transfert de proton a lieu vers cette « superbase », il induit la rupture de la liaison $N\text{-}C_\alpha$. Une variante de ce mécanisme est le mécanisme Utah-Washington [20-22], mécanisme (b_2) qui considère que la liaison $N\text{-}C_\alpha$ est rompue immédiatement après capture d'un électron par le carbonyle, avant qu'un transfert de H^+ ait lieu. On notera que ces différents mécanismes ECD se produisent en une seule étape de fragmentation.

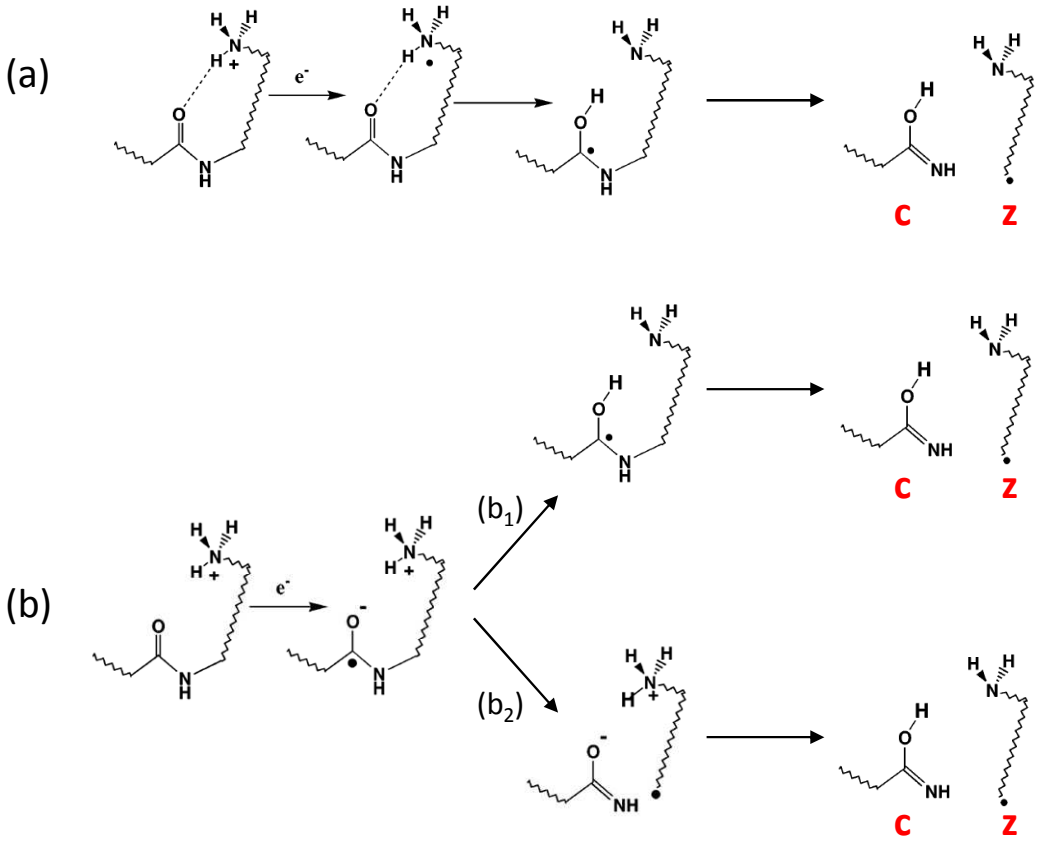


figure IV.13 : Mécanismes ECD : (a) mécanisme Cornell ; (b_1) mécanisme Turecek ; (b_2) mécanisme Utah-Washington.

En UVPD, nous avons observé le fragment z_1 produit en une seul étape pour la molécule $[GW + H]^+$ (cf figure IV.12.c). Après photoexcitation d'un électron de l'indole, si cet « électron actif » est transféré dans l'état excité où la densité électronique est majoritairement localisée sur le carbonyle, cela revient à localiser un électron dans une orbitale de Rydberg du carbonyle, comme dans les mécanisme de Turecek ou Utah-Washington (figure IV.13.b). Nous ne pouvons pas dire si le transfert de H^+ précède ou suit la rupture de la liaison N-C_α.

Contrairement aux fragments obtenus par ECD, pour la molécule $[GW + H]^+$ étudiée en UVPD, nous observons la production d'un fragment ionique z_1 à couche fermée et non pas d'un radical $z^\bullet$ à couche électronique ouverte. Pour expliquer la formation de cet ion z_1, nous proposons un mécanisme de recombinaison radicalaire, illustré sur la figure IV.14, dérivé de celui de Turecek.

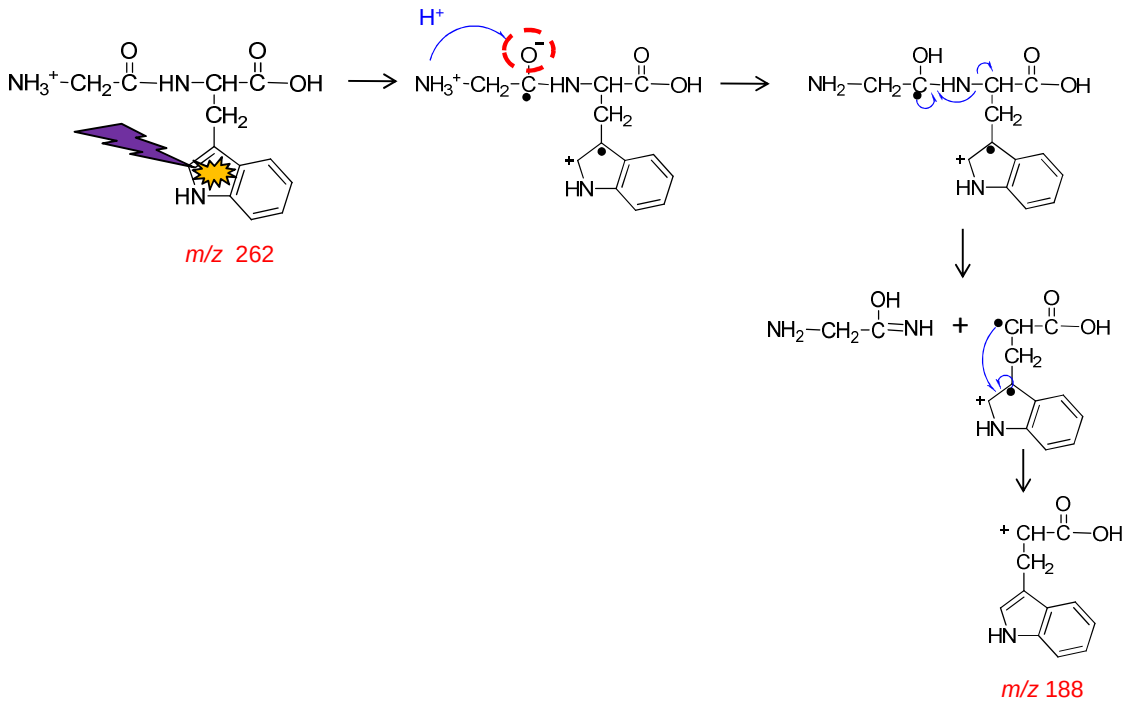


figure IV.14 : Mécanisme de recombinaison radicalaire proposé pour expliquer la production en une étape du fragment z_1 (m/z 188) observé après photoexcitation UV de la molécule $[GW + H]^+$ (m/z 262).

Le mécanisme de la figure IV.14 ne s'applique pas à tous les dipeptides $[XW + H]^+$ protonés sur le N-terminal. En effet, pour la molécule $[LW + H]^+$, on observe un fragment z_1 produit de façon séquentielle (figure IV.12.d) qui implique un autre type de mécanisme.

IV.4.2.3 <u>Modèle de transfert d'électron / transfert de proton</u>

Pour la molécule $[GW + H]^+$, deux canaux de fragmentation, *m/z* 130 (rupture C_α-C_β) et *m/z* 188 (fragment z_1), sont produits en une étape et en moins de 200 ns (cf tableau IV.1). Le modèle de transfert d'électron et de proton dans l'état excité utilisé pour le $[W + H]^+$ et appliqué aux dipeptides $[WX + H]^+$ protonés sur le N-terminal (page 202) est de nouveau décliné ici. Avec ce modèle nous proposons un mécanisme de fragmentation dans l'état excité pour expliquer les deux fragmentations directes de la molécule $[GW + H]^+$. L'utilisation de ce modèle nous impose également de justifier l'absence d'un mécanisme direct pour l'ion *m/z* 132 de $[GW + H]^+$.

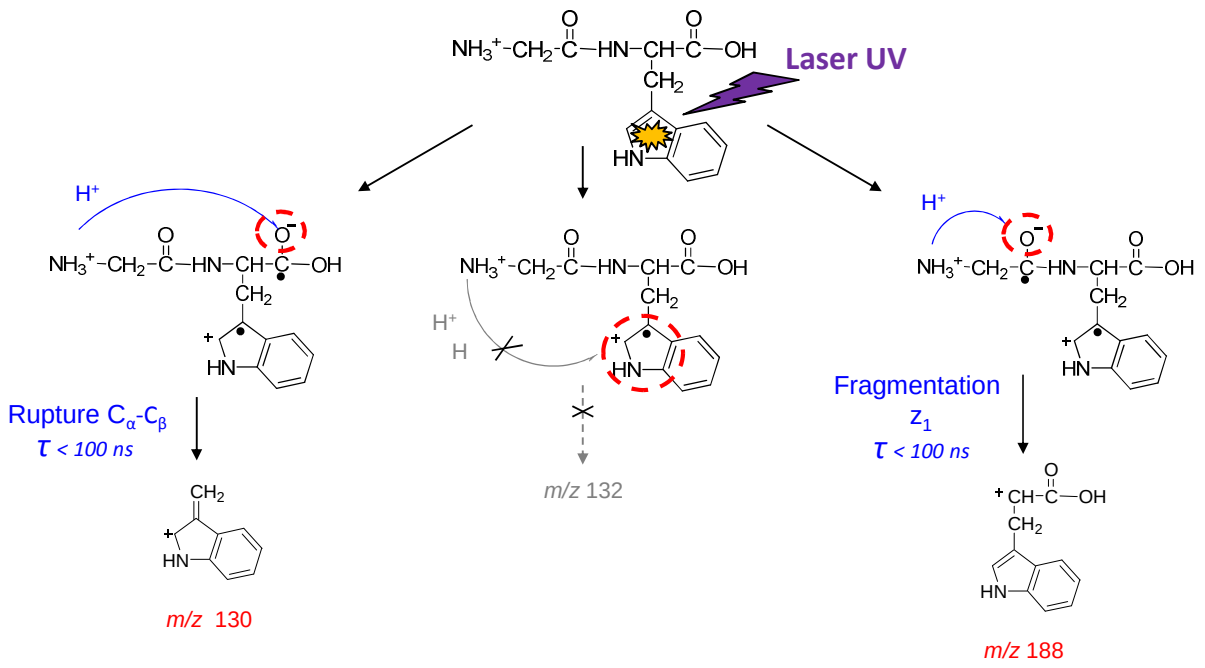


figure IV.15 : Modèle de transfert local d'électron suivi d'un transfert de proton appliqué au dipeptide [GW + H]$^+$

Comme nous l'avons proposé précédemment pour les dipeptides de type [WX + H]$^+$, nous suggérons ici un mécanisme qui met en jeu trois sites de localisationde l'électron photo-excité, autour du Trp. L'« électron actif » reste localisé sur le chromophore ou est transféré dans des orbitales de Rydberg localisées sur le carbonyle ou sur le carboxyle.

Ici, le carboxyle (-COOH) de [GW + H]$^+$ joue un rôle comparable au carboxyle de [W + H]$^+$ et au carbonyle (-CO-) situé au centre du dipeptide [WG + H]$^+$. Dans les trois cas, il s'agit d'un groupement CO adjacent au W et situé côté C-terminal par rapport au W. Un transfert dans l'état excité, d'un électron et d'un H$^+$ sur un CO de ce type, nous permet d'explique le mécanisme direct de production de l'ion *m/z* 130 pour ces trois molécules.

Nous avons vu que la fragmentation z_1 de [GW + H]$^+$ peut s'expliquer comme un mécanisme de type ECD (Turecek ou Utah-Washington) (figure IV.13.b). Ce mécanisme implique un transfert de l'électron photo-excité sur le carbonyle situé au centre du dipeptide. Pour conduire à la fragmentation z_1 de [GW + H]$^+$, on suppose que l'« électron actif » doit être transféré sur le CO adjacent au W, situé côté N-terminal du W, d'après le mécanisme proposé sur la figure IV.15.

Comparons le mécanisme de la figure IV.15 proposé pour [GW + H]$^+$ avec celui de la figure IV.11 (page 202) proposé pour [WG + H]$^+$. Pour ces mécanismes, un transfert

d'électron suivi d'un transfert de H^+ au niveau du carbonyle central conduit à deux fragmentations différentes dans l'état excité : la rupture de la liaison C_α-C_β (production de l'ion *m/z* 130) dans le cas de $[WG + H]^+$ et la fragmentation z_1 dans le cas de $[GW + H]^+$.

Si on compare les fragmentations directes obtenues pour les dipeptides $[GW + H]^+$ et $[WG + H]^+$, d'après les mécanismes proposés, un transfert d'électron suivi d'un transfert de H^+ au niveau du carbonyle central conduit à deux mécanismes types différents de fragmentation dans l'état excité : la rupture de la liaison C_α-C_β (production de l'ion *m/z* 130) dans le cas de $[WG + H]^+$ et la fragmentation z_1 dans le cas de $[GW + H]^+$.

Pourquoi n'observe-t-on pas la fragmentation c/z pour $[WG + H]^+$, comme en ECD ? On peut l'expliquer par un mécanisme de recombinaison radicalaire se produisant après transfert d'électron et de proton sur le CO adjacent au Trp, situé côté N-terminal du Trp. Ce mécanisme de recombinaison radicalaire, qui serait spécifique de l'UVPD, explique pourquoi la fragmentation de la liaison C_α-C_β est privilégiée par rapport à la fragmentation c ou z (figure IV.16).

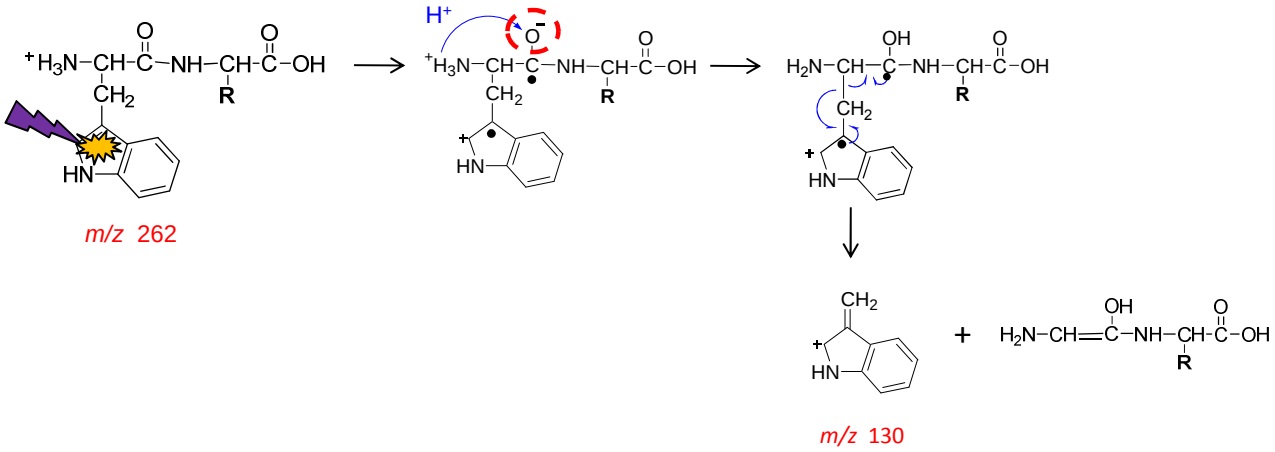


figure IV.16 : Mécanisme de recombinaison radicalaire proposé pour expliquer l'absence de fragmentation z_1 au profit d'une fragmentation C_α-C_β pour $[WG + H]^+$

Pour la plupart des molécules contenant le W, l'orbitale où la densité électronique est majoritairement localisée sur le cycle aromatique constitue l'orbitale LUMO et est impliquée dans les états excités L_a et/ou L_b accessibles en énergie avec un laser à 266 nm. La molécule $[GW + H]^+$ ne fait donc pas exception. Pour les molécules $[W + H]^+$, $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$, nous avons observé l'ion *m/z* 132 produit en une étape. D'après notre modèle, cet ion est

formé quand « l'électron actif » reste localisé sur l'indole et est suivi d'un transfert dans l'état excité de H^+ et de $H^\bullet$ sur l'indole. Le canal de fragmentation *m/z* 132 est produit par un mécanisme séquentiel pour la molécule $[GW + H]^+$ (figure IV.12.b.). Il ne s'agit donc pas d'un mécanisme produit dans l'état excité. On suppose donc que, pour la molécule $[GW + H]^+$, le transfert de proton suivi d'un transfert d'hydrogène vers l'indole est peu probable (figure IV.15). Fujihara *et al.* [23, 24] ont montré qu'à basse température le NH_3 terminal de la chaîne peptidique est en interaction avec le chromophore. Avec notre dispositif, les molécules étudiées ont beaucoup d'énergie interne ce qui implique un dépliement du dipeptide et un éloignement du $-NH_3^+$ par rapport à la chaîne latérale du Tryptophane. Il serait intéressant de montrer que l'énergie interne contenue dans la molécule $[GW + H]^+$ a un effet sur le mécanisme de formation de l'ion *m/z* 132.

Pour la molécule $[LW + H]^+$, on n'observe aucune fragmentation directe, donc aucun mécanisme qui pourrait être initié dans l'état excité. Le fait de remplacer la Glycine par la Leucine dans un dipeptide de type $[XW + H]^+$ ne devrait pas (*a priori*) entraîner de modification importante ni de l'énergie, ni de la nature des états excités. Nous supposons que la Leucine, due à sa taille, crée un encombrement stérique qui empêche les transferts de proton à l'état excité. Rappelons que d'après le modèle proposé (figure IV.15), un transfert de proton est nécessaire après le transfert d'électron sur le carbonyle ou carboxyle, pour induire en une étape la fragmentation z_1 ou la fragmentation C_α-C_β (*m/z* 130) d'un dipeptide $[XW + H]^+$.

Les chaînes latérales des acides aminés A, Alanine ($-CH_3$), et V, Valine ($-CH(CH_3)_2$), sont des chaînes alkyles qui présentent un encombrement stérique plus faible que la Leucine. Il serait intéressant de voir si le modèle de la figure IV.15 peut s'appliquer aux dipeptides $[AW + H]^+$ et $[VW + H]^+$.

Notons par ailleurs que le modèle de la figure IV.15 ne s'applique pas aux molécules telles $[WK + H]^+$, protonées sur leur chaîne latérale.

IV.4.2.4 <u>Application de ce mécanisme au tripeptide $[GWG + H]^+$</u>

Pour le tripeptide $[GWG + H]^+$, nous observons des fragmentations directes similaires à ceux observés pour $[GW + H]^+$: la rupture de la liaison C_α-C_β conduisant à la production de l'ion *m/z* 130 et une fragmentation z_2 (ion *m/z* 245). Sur les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ associés à

ces deux canaux (figure IV.17.a. et c.), les points expérimentaux s'alignent sur la droite de pente $(m_0 - m_i)/m_i$. Nous confirmons ainsi que ces mécanismes sont directs. La forme circulaire du diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ associé à l'ion *m/z* 132 de $[GWG + H]^+$ (figure IV.17.b.) indique qu'il est produit par un mécanisme séquentiel, comme l'ion *m/z* 132 de $[GW + H]^+$.

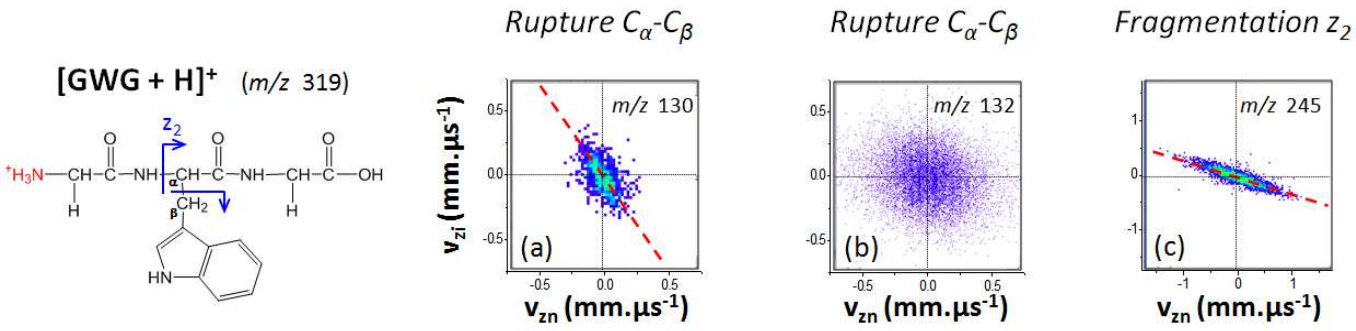


figure IV.17 : Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ illustrant les fragmentations directes observées ou attendues pour la molécule $[GWG + H]^+$. Les droites en trait rouge pointillé représentent le rapport de masses m_n / m_i.

Les fragments *m/z* 130 et *m/z* 245 de $[GWG + H]^+$, produits en une étape et en moins de 200 ns (cf tableau IV.1, page 189), peuvent être produits dans l'état excité suivant le même mécanisme que les ions *m/z* 130 et 188 de $[GW + H]^+$ (figure IV.15).

IV.4.3 Conclusion sur les mécanismes de fragmentations initiées dans l'état excité

Pour toutes les molécules que nous avons étudiées, comparons maintenant les différents mécanismes dans l'état excité proposés pour expliquer les fragmentations directes et rapides observées ($\tau < 200$ ns).

Pour les dipeptides contenant le W, nous avons vu que la présence d'un acide aminé associé au W, plus basique (tel la Lysine) peut inhiber toutes les fragmentations qui se produisent dans l'état excité. Pour un dipeptide contenant le W, tout ajout d'acide aminé supplémentaire de type aliphatique (tel la Leucine ou la Glycine) du côté C-terminal du W ne modifie pas le type de fragmentation observée. En effet nous avons observé les mêmes fragmentations directes pour $[W + H]^+$, $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$, d'une part, et pour $[GW + H]^+$ et $[GWG + H]^+$, d'autre part. Seules les intensités relatives de ces différents canaux varient (cf tableau IV.1, page 189). Par contre, dans un dipeptide $[XW + H]^+$, si l'acide aminé situé entre le site de protonation et le W crée un encombrement stérique trop important, cela

peut inhiber les mécanismes de fragmentation dans l'état excité (absence de fragmentations directes pour $[LW + H]^+$). Cette dernière constatation met en évidence l'importance des transferts de H^+ dans les mécanismes de fragmentation à l'état excité.

La localisation de l'électron « photo-activé » sur les différents sites d'une molécule régit la compétition entre les canaux de fragmentation. Cependant suivant la molécule étudiée, un même site de localisation de l'électron « actif » n'implique pas toujours le même type de fragmentation. Un transfert d'électron et de H^+ sur le carbonyle central d'un dipeptide contenant W entraîne la production de l'ion *m/z* 130 pour $[WG + H]^+$ et la fragmentation z_1 pour $[GW + H]^+$. La position du W dans la chaîne peptidique, par rapport au site de protonation, détermine quel type de fragmentation est produit dans l'état excité.

Toutes les fragmentations directes que nous avons observées s'expliquent par un transfert **local** de l'électron actif. Notons que, pour transférer « l'électron actif », un recouvrement est nécessaire entre la fonction d'onde de l'état $\pi\pi^*$ optiquement actif du Trp et celle de l'état à transfert de charge où on localise l'électron « photo-actif ». Les molécules étudiées sont décrites par une surface de potentiel multidimensionnelle qui présente de nombreuses intersections coniques et rend les transferts de charge possibles à courte distance (quelques Å). La compétition avec la conversion interne et le retour du système dans son état électronique fondamental empêche les transferts de charge à longue distance, d'où le côté **local** des fragmentations observées dans l'état excité (pas de perte ni de H, ni de NH_3, observée pour $[GW + H]^+$ ou $[LW + H]^+$).

IV.5 Fragmentations induites après conversion interne

Dans cette partie nous décrivons l'analyse de tous les autres canaux de fragmentation qui n'ont pas encore été discutés. Toutes ces fragmentations sont associées à des mécanismes séquentiels (cf tableau IV.1 et tableau IV.2) qui se produisent sur une échelle de temps allant de la dizaine de nanosecondes à la microseconde. Nous supposons que tous les mécanismes décrits dans cette partie sont produits par conversion interne. Les résultats obtenus sont comparés aux mécanismes qui sont proposés en CID.

Dans cette partie nous présentons les fragments m/z 144 de $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$, la perte de $H_2O + CO$ par $[GW + H]^+$, les fragmentations $a_1 – y_1$ pour toutes les molécules étudiées, les autres canaux de fragmentation des molécules $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$ et enfin la production en 3 étapes d'un fragment m/z 188 pour $[GW + H]^+$.

IV.5.1 Fragment *m/z* 144

Les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$, correspondant à la production des fragments *m/z* 144 des molécules $[WG + H]^+$ (*m/z* 262) et $[WL + H]^+$ (*m/z* 318), sont présentés sur la figure IV.18 (diagrammes a. et c.). Les points expérimentaux ne s'alignent pas sur la droite de pente $(m_0 - m_i)/m_i$, signature d'une fragmentation binaire. Cela montre clairement la présence d'un mécanisme en plusieurs étapes.

Nous avons vérifié en effectuant des expériences avec la zone d'interaction *non-polarisée* que la position d'arrivée y_i correspond au canal de fragmentation *m/z* 144 pour $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$ (résultats expérimentaux non-présentés ici). Sur les diagrammes $N(y_i, t_i – t_n)$, diagrammes (b) et (d) de la figure IV.18, enregistrés avec la zone d'interaction polarisée par un potentiel, la position y_i obtenue correspond à un fragment ionique formé à l'extérieur de la zone polarisée. Cette position est légèrement décalée par rapport à celle d'un fragment ionique *m/z* 144 qui serait produit à l'extérieur en une étape. Le passage par un ion intermédiaire modifiant l'énergie (donc la position y_i) de l'ion final est en accord avec la conclusion tirée des diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$. Pour chaque diagramme $N(y_i, t_i – t_n)$, on note que les deux contributions observées correspondent à une même position y_i. Cela signifie que, pour $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$, des fragments neutres sont émis à l'intérieur et à l'extérieur de la zone polarisée et sont détectés en coïncidence avec le fragment ionique final *m/z* 144 (produit à l'extérieur). La première étape de fragmentation se déroule donc à l'intérieur de la zone polarisée et la deuxième étape, à l'extérieur.

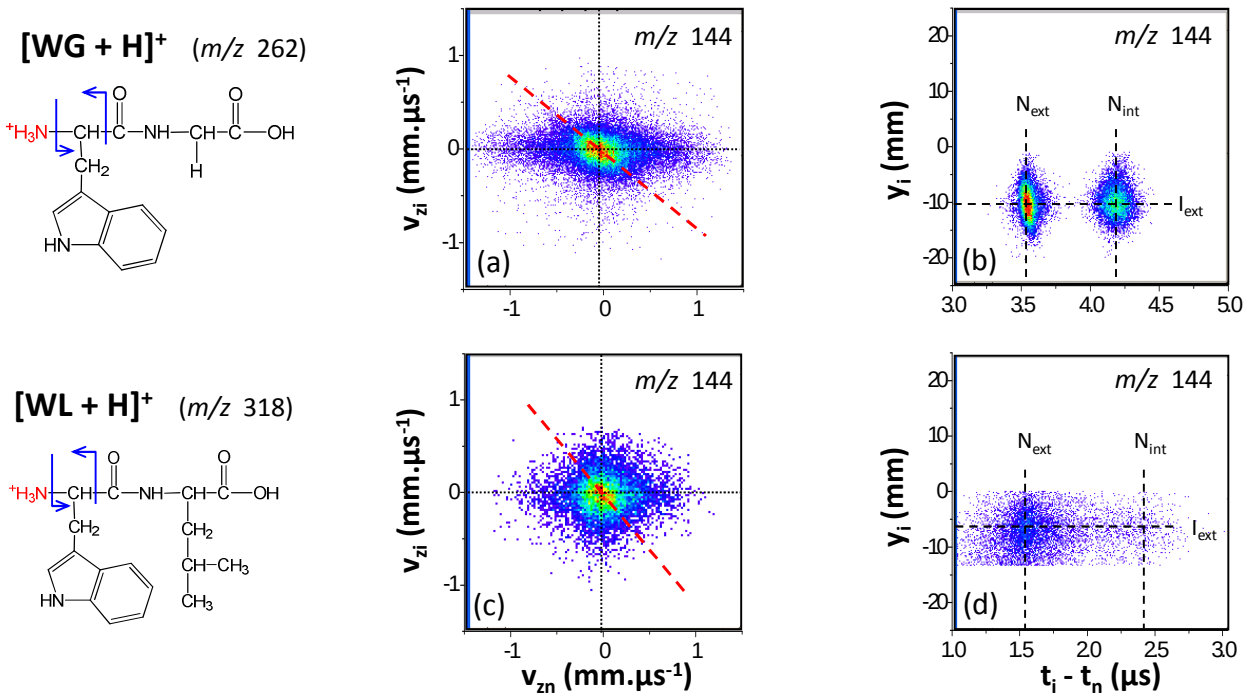


figure IV.18 : Analyse des fragments m/z 144 issus des molécules [WG + H]$^+$ (m/z 262) et [WL + H]$^+$ (m/z 318). Diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) et N(y_i, $t_i - t_n$) enregistrés en simples coïncidences. Les droites en trait rouge pointillé représentent le rapport de masses m_n / m_i.

Pour [WG + H]$^+$, l'analyse en multicoïncidences[22] du diagramme N(v_{zi}, v_{zn}) de la figure IV.18(a), confirme que la production de l'ion *m/z* 144 est consécutive à une perte de NH_3. Pour [WL + H]$^+$, le canal de fragmentation *m/z* 144 est relativement faible (5% par rapport aux autres voies de fragmentation de [WL + H]$^+$, tableau IV.1, page 189). Nous n'avons pas une statistique suffisante pour effectuer une analyse en multicoïncidence qui soit concluante.

Notre programme de simulation nous permet de vérifier, d'après la position y_i des diagrammes (b) et (d), N(y_i, $t_i - t_n$) de la figure IV.18, que l'ion *m/z* 144 est produit après passage par un ion intermédiaire de masse (m_0 – 17), pour les deux molécules considérées. Cet ion intermédiaire correspond au fragment *m/z* 245 pour [WG + H]$^+$ et *m/z* 301 pour [WL + H]$^+$. Ces deux canaux de fragmentation ont été observés et sont produits par un mécanisme direct, avec des temps de fragmentation respectifs de 20 ns et 110 ns (tableau IV.1, page 189).

[22] Cette analyse est présentée comme exemple dans le chapitre II pour expliquer le traitement en multicoïncidence avec séparation temporelle des fragments neutres

L'ion *m/z* 144 est également observé par photofragmentation du $[W + H]^+$ (tableau IV.1) après perte de NH_3 dans l'état fondamental (cf chapitre III). On suppose qu'il en est de même pour les dipeptides $[WX + H]^+$ protonés sur la chaîne peptidique. On conclue donc à un mécanisme commun aux trois molécules $[W + H]^+$, $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$: après une perte de NH_3 dans l'état fondamental ($\tau_1 < 200$ ns), la molécule se réarrange [25] pour conduire à la production de l'ion *m/z* 144, d'où le temps long de fragmentation observé ($\tau > 1$ µs). Ce mécanisme, représenté sur la figure IV.19, peut probablement s'appliquer à d'autres dipeptides contenant le W côté N-terminal, protonés sur le N-terminal de la chaîne peptidique.

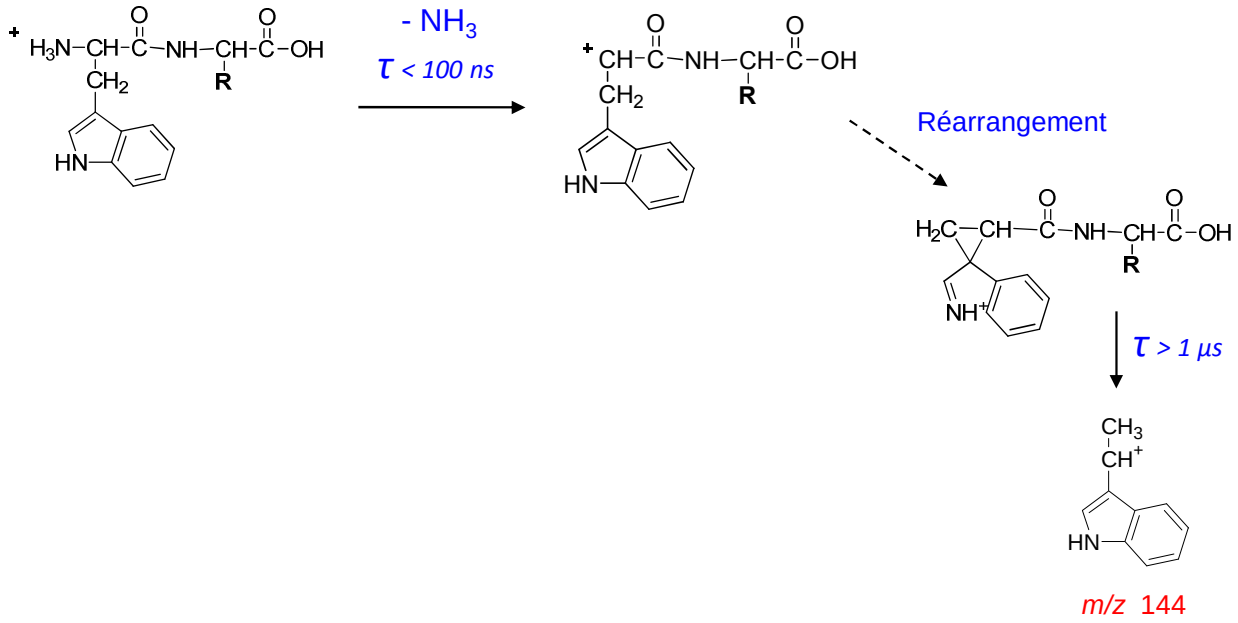


figure IV.19 : Mécanisme de formation de l'ion m/z 144, produit après une perte de NH_3, pour les molécules $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$.

Notons l'absence de la perte de NH_3 et du canal de fragmentation *m/z* 144 pour les autres molécules étudiées. Le mécanisme de la figure IV.19 ne s'applique ni à $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$ qui sont protonées sur la Lysine, ni à $[GW + H]^+$, $[LW + H]^+$ et $[GWG + H]^+$ où le W est présent côté C-terminal.

IV.5.2 Perte de H_2O et CO

La perte de H_2O et CO correspond à la perte d'une masse neutre de 46 uma. La perte séquentielle de H_2O et CO est une voie de photofragmentation de $[W + H]^+$ (*m/z* 205) et conduit à la production de l'ion *m/z* 159 [2]. Parmi les molécules étudiées, cette voie n'a été

observée que pour $[GW + H]^+$ (*m/z* 262), conduisant à la formation de l'ion *m/z* 216. Le diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ de simples coïncidences associé à ce canal de fragmentation est présenté sur la figure IV.20. Les points expérimentaux ne s'alignent pas sur la droite de pente R = - 46/216 = - 0.213, caractéristique d'une fragmentation binaire. Il s'agit donc bien d'une fragmentation en plusieurs étapes (H_2O + CO).

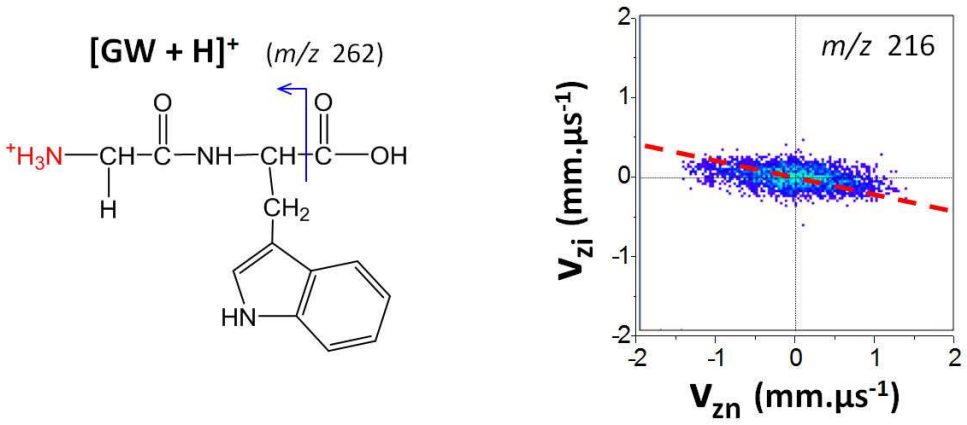
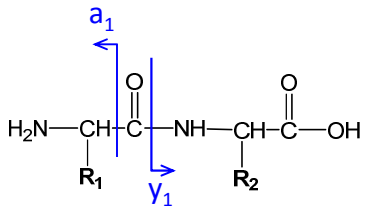


figure IV.20 : Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ de simple coïncidence enregistré pour l'ion m/z 216 de la molécule $[GW + H]^+$. La droite en trait pointillé représente, pour une fragmentation binaire, le rapport de masses m_n / m_i.

Pour ce canal, les données enregistrées en multi-coïncidences n'ont pas une statistique suffisante pour être exploitables. Il n'est pas possible de différencier les fragments neutres, ni par leur temps d'arrivée, ni par leur position sur le détecteur.

IV.5.3 Fragmentations $a_1 – y_1$

Pour chaque peptide étudié, nous observons, soit la fragmentation a_1, soit la fragmentation y_1. Rappelons que la charge est située du côté N-terminal pour un fragment a_1 et du côté C-terminal pour un fragment y_1. Ces canaux de fragmentation sont les plus intenses parmi tous ceux que nous avons observés (cf probabilités relatives données dans le tableau IV.1, page 189). Les fragmentations a_1 et y_1 sont également les canaux les plus importants observés en CID. Ces fragmentations sont très probablement produites après conversion interne en UVPD. Le tableau IV.4 rappelle le type de fragmentation (a_1 ou y_1) observé pour chacune des molécules étudiées.



molécule m/z	[WG + H]$^+$ 262	[WL + H]$^+$ 318	[WK + H]$^+$ 333	[GW + H]$^+$ 262	[LW + H]$^+$ 318	[KW + H]$^+$ 333
-R_1	**Trp**	**Trp**	**Trp**	Gly	Leu	Lys
-R_2	Gly	Leu	Lys	**Trp**	**Trp**	**Trp**
Fragmentation	a_1	a_1	y_1 *et* a_1	y_1	y_1	a_1
m/z fragment	159	159	147 et 159	205	205	101

tableau IV.4 : Type de fragmentation (a_1 ou y_1) observée pour les molécules étudiées et masses des fragments correspondants.

Pour les dipeptides contenant la Glycine et la Leucine, le fragment chargé observé est celui qui comprend le Tryptophane. Il s'agit du fragment a_1 (*m/z* 159) pour [WG + H]$^+$ et [WL + H]$^+$ et du fragment y_1 (*m/z* 205) pour les dipeptides [GW + H]$^+$ et [LW + H]$^+$. Pour les dipeptides contenant la Lysine, le fragment chargé observé contient la Lysine. Nous observons le fragment y_1 (*m/z* 147) pour [WK + H]$^+$ et le fragment a_1 (*m/z* 101) pour [KW + H]$^+$. Pour [WK + H]$^+$, un fragment a_1 (*m/z* 159) avec la charge est localisée sur le Tryptophane est également présent.

Acide aminé	Affinité protonique (kJoul.mol^{-1})
Glycine	881
Leucine	907
Tryptophane	923
Lysine	995

tableau IV.5 : Affinité protonique des acides aminés contenus dans les peptides étudiés.

Le tableau IV.5 présente les affinités protoniques des acides aminés qui composent les dipeptides que nous avons étudiés. Le Tryptophane a une affinité protonique plus élevée que la Glycine et la Leucine et la Lysine a une affinité protonique plus élevée que le Tryptophane. L'affinité protonique de ces différents acides aminés peut être corrélée au type de fragmentation, a_1 ou y_1, observée. Le fragment ionique formé est chaque fois celui qui contient l'acide aminé qui a l'affinité protonique la plus élevée. Seul le fragment a_1 (*m/z* 159) de la molécule [WK + H]$^+$ ne suit pas cette règle.

Pour le tripeptide [GWG + H]$^+$, on observe deux fragmentations produites de part et d'autre du Tryptophane: une fragmentation a_2 (*m/z* 216) et une fragmentation y_2 (*m/z* 262), ces deux fragments contenant le Tryptophane.

IV.5.3.1 Résultats expérimentaux

Les diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) de simple coïncidence enregistrés pour les fragmentations a_1 et y_1 des dipeptides [WK + H]$^+$ et [KW + H]$^+$ sont présentés sur la figure IV.21. Nous considérons trois canaux de fragmentation : un ion a_1 et un ion y_1 pour [WK + H]$^+$, d'une part, et un ion a_1 pour [KW + H]$^+$, d'autre part. Sur les trois diagrammes de la figure IV.21, les points expérimentaux ne s'alignent pas sur les droites de pente (m_i - m_0)/m_i, caractéristiques de fragmentations binaires. Ces trois fragmentations sont donc des fragmentations séquentielles.

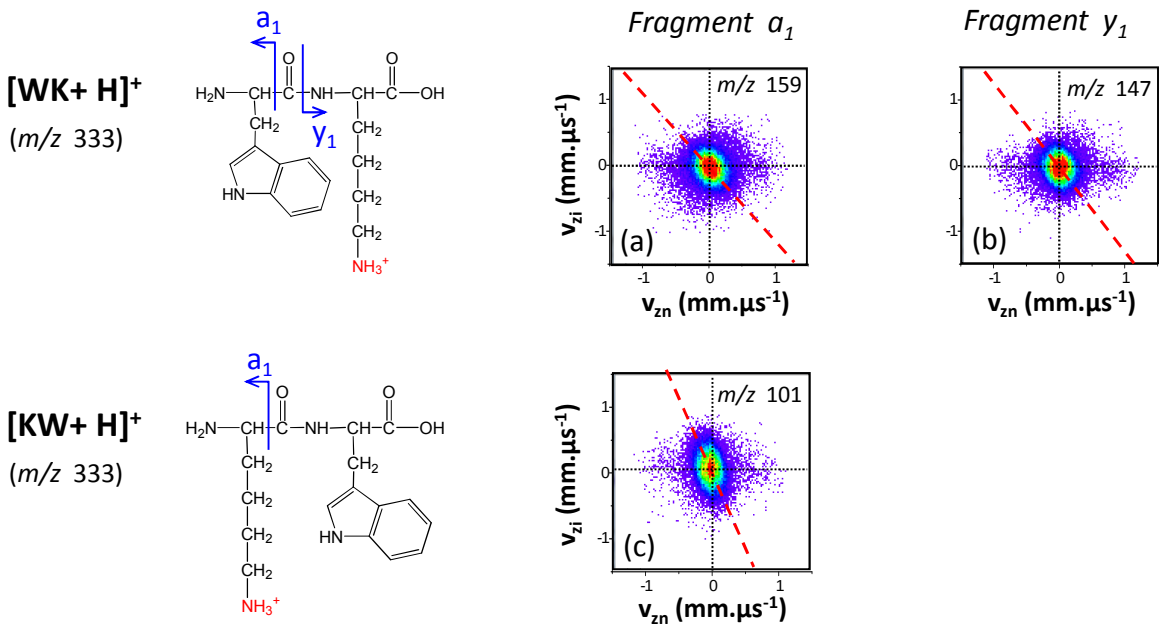


figure IV.21 : Diagrammes N(v_{zi}, v_{zn}) obtenus pour les fragments a_1 et y_1 de [WK + H]$^+$ et [KW + H]$^+$. Les droites en trait rouge pointillé représentent le rapport de masses m_n / m_i dans le cas d'une fragmentation binaire.

Malgré le long temps de fragmentation $\tau > 1$ µs mesuré pour ces trois canaux, il n'est pas possible de séparer temporellement les différents fragments neutres émis. Il n'est également pas possible de les séparer suivant leur déviation relative. Nous n'avons donc pas pu faire de traitement en multicoïncidence de ces données.

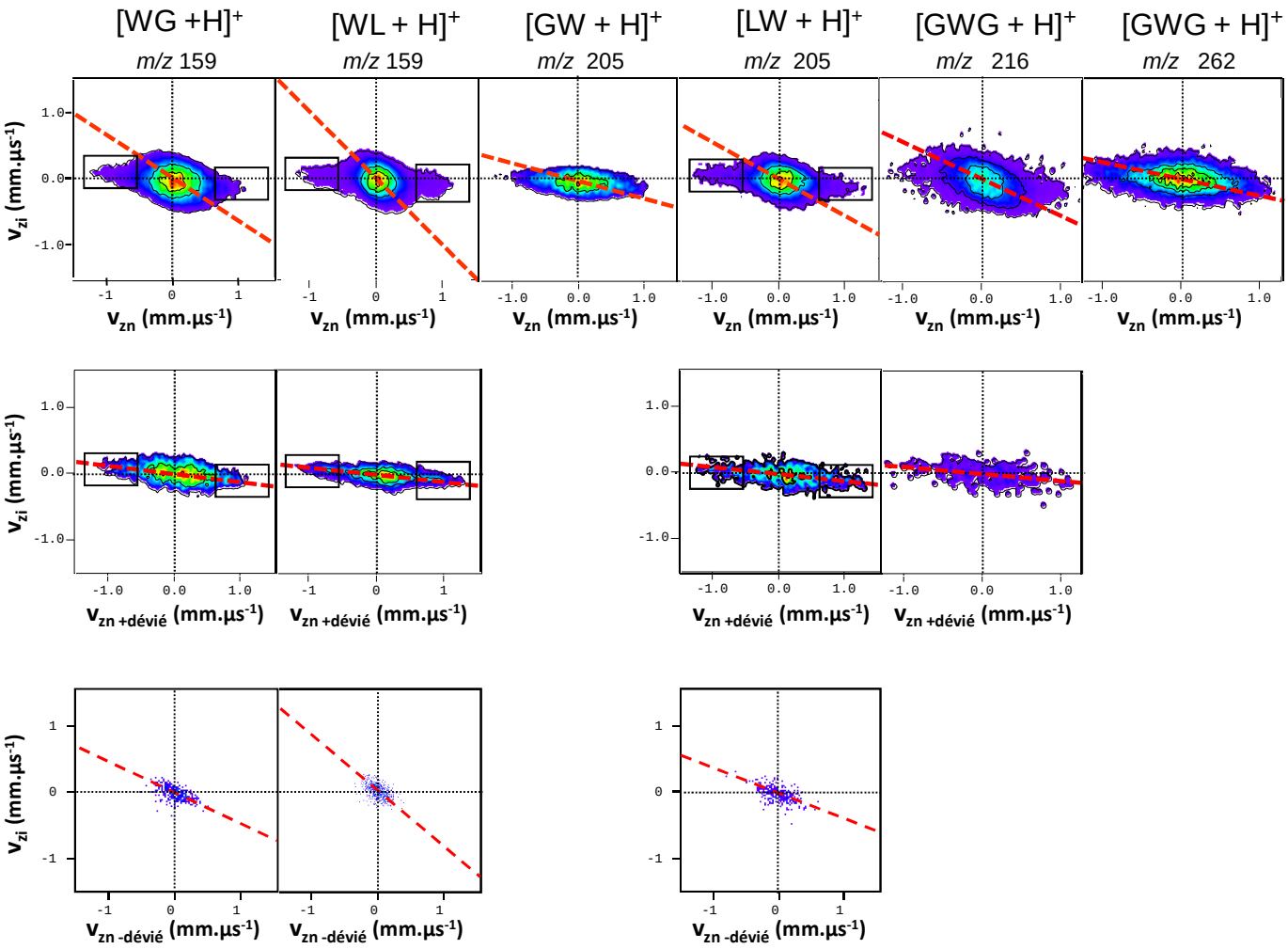


figure IV.22 : Diagrammes associés aux fragments a_1 ou y_1 de $[WG + H]^+$, $[WL + H]^+$, $[GW + H]^+$, $[LW + H]^+$ et aux fragments a_2 et y_2 de $[GWG + H]^+$. Les masses de ces fragments ioniques sont indiquées en-dessous du nom des molécules

- 1ère rangée : diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ de simple coïncidence. La droite en trait pointillé représente le rapport des masses m_n / m_i dans le cas d'une fragmentation directe.

- 2ème : diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn+dévié})$ traités en multicoïncidence avec séparation des fragments neutres suivant leur déviation relative. La pente mesurée est représentée en trait pointillé.

- 3ème rangée : diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn-dévié})$ de muticoïncidence, réalisés en ne sélectionnant que les évènements encadrés, indiqués sur les diagrammes de la 1ère et de la 2ème rangée. La pente mesurée est représentée en trait pointillé.

Les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ des données traitées en simple coïncidence pour les fragmentations a_1 et y_1 des dipeptides et du tripeptide contenant la Glycine et la Leucine sont présentées sur la 1ère rangée de la figure IV.22. Sur ces diagrammes, les points expérimentaux obtenus ne s'alignent pas sur la droite de pente $(m_i - m_0) / m_i$ et leur distribution présente souvent une double structure. Cela montre que toutes ces fragmentations a_1 et y_1 sont séquentielles, comme celles des dipeptides contenant la Lysine.

Toutes les fragmentations présentées sur la figure IV.22 sont produites avec une constante de temps $\tau < 200$ ns, excepté pour l'ion *m/z* 205 de $[LW + H]^+$ (cf tableau IV.1, page 189). Nous n'avons pu identifier les ions intermédiaires correspondants à ces fragmentations séquentielles, ni séparer *temporellement* les différents fragments neutres détectés. Pour les canaux *m/z* 159 de $[WG + H]^+$ et $[WL + H]^+$, *m/z* 205 de $[LW + H]^+$ et *m/z* 216 de $[GWG + H]^+$, on remarque la superposition de deux structures sur les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ de la 1ère rangée associés à ces canaux de fragmentation. Une structure de symétrie circulaire est superposée à un motif allongé. Ceci indique que, parmi les différents fragments neutres détectés en coïncidence, un fragment neutre est plus dévié que l'autre. L'analyse présentée dans le paragraphe suivant permet d'étudier en détail les deux étapes de la fragmentation.

Les diagrammes de la 2ème et 3ème rangées de la figure IV.22 sont issus de l'analyse d'évènements en multicoïncidence, avec identification des fragments neutres suivant leur déviation relative. Ce traitement est expliqué en détail au chapitre II pour l'ion *m/z* 159 de $[WG + H]^+$. Le même traitement a été effectué pour les canaux *m/z* 159 de $[WL + H]^+$, *m/z* 205 de $[LW + H]^+$ et *m/z* 216 de $[GWG + H]^+$. Ces données traitées en multicoïncidence $N(v_{zi}, v_{zn+dévié})$ sont montrées sur la 2ème rangée de la figure IV.22. Ces diagrammes présentent des structures linéaires dont les pentes mesurées sont données dans le tableau IV.6.

Les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn\text{-}dévié})$ de multicoïncidence de la 3ème ligne concernent les évènements sélectionnés à l'intérieur des cadres noirs, représentés sur les diagrammes de la 1ère et de la 2ème rangée. On remarque que la pente de chacun des diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn\text{-}dévié})$ de la 3ème rangée est plus grande que celle du diagramme $N(v_{zi}, v_{zn+dévié})$ associé, présenté sur la 2ème rangée. Pour un même canal de fragmentation, la comparaison des pentes des diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn+dévié})$ et $N(v_{zi}, v_{zn\text{-}dévié})$ associés aux mêmes évènements confirme que le fragment le plus dévié est le plus léger et que le moins dévié est le plus lourd.

Molécule	[WG + H]$^+$	[WL + H]$^+$	[LW + H]$^+$	[GWG + H]$^+$
Masse du parent	262$^+$	318$^+$	318$^+$	319$^+$
Canal de fragmentation	159$^+$	159$^+$	205$^+$	216$^+$
Pente mesurée	0.12	0.103	0.085	0.098
$N_1 = n_{+dévié}$	**30**	**30**	**25**	**29**
N_2 (= $n_{-dévié}$)	*73*	*129*	*88*	*74*
N_1 (= $n_{-dévié}$)	*84*	*143*	*96*	*82*
$N_2 = n_{+dévié}$	**19**	**16**	**17**	**21**

tableau IV.6 : Pentes mesurées sur les diagrammes N(v_{zi}, $v_{zn+dévié}$) de la 2ème rangée de la figure IV.22 et masses calculées pour le fragment neutre le plus dévié dans l'hypothèse où celui-ci est émis, soit lors de la 1ère étape, soit lors de la 2ème étape.

A partir des pentes mesurées présentées dans le tableau IV.6, nous avons calculé la masse du fragment neutre le plus dévié, dans le cas où il est émis lors d'une 1ère étape de fragmentation ($N_1 = n_{+dévié}$) et dans le cas où il est émis lors d'une 2e étape ($N_2 = n_{+dévié}$). Ce traitement est expliqué dans le chapitre II pour l'ion *m/z* 159 de [WG + H]$^+$. Les résultats obtenus pour ce canal ainsi que pour les ions *m/z* 159 de [WL + H]$^+$, *m/z* 205 de [LW + H]$^+$ et *m/z* 216 de [GWG + H]$^+$ sont donnés dans le tableau IV.6. En tenant compte de la marge d'erreur de 3% sur la pente mesurée, l'éjection du neutre le plus dévié lors de la première étape de fragmentation correspond à l'éjection d'une molécule de CO (m_{n1} = 28 uma) tandis que l'éjection du neutre le plus dévié lors de la seconde étape correspondrait à l'éjection d'une molécule de H_2O ou de NH_3 (m_{n2} = 18 ou 17 uma).

IV.5.3.2 <u>Etude du mécanisme de fragmentation $a_1 – y_1$</u>

Les fragmentations a et y sont des canaux importants en CID et ont été le sujet de nombreuses études théoriques basées sur des optimisations de géométrie dans l'état fondamental. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation compétitive de ces deux fragments. La figure IV.23 illustre le mécanisme proposé par Harrison *et al* [26] et celui proposé par Paizs & Suhai [27]. Ces deux mécanismes nécessitent un transfert initial de proton du N-terminal vers le groupe amide. Suivant la théorie du proton mobile [28] le transfert de H^+ d'un site à un autre dans l'état fondamental nécessite 2 eV. Notons que pour le

tripeptide [GWG + H]$^+$, le proton mobile a la possibilité de migrer vers l'un ou l'autre des sites amides, ce qui entraîne la production des deux fragmentations a_2 et y_2.

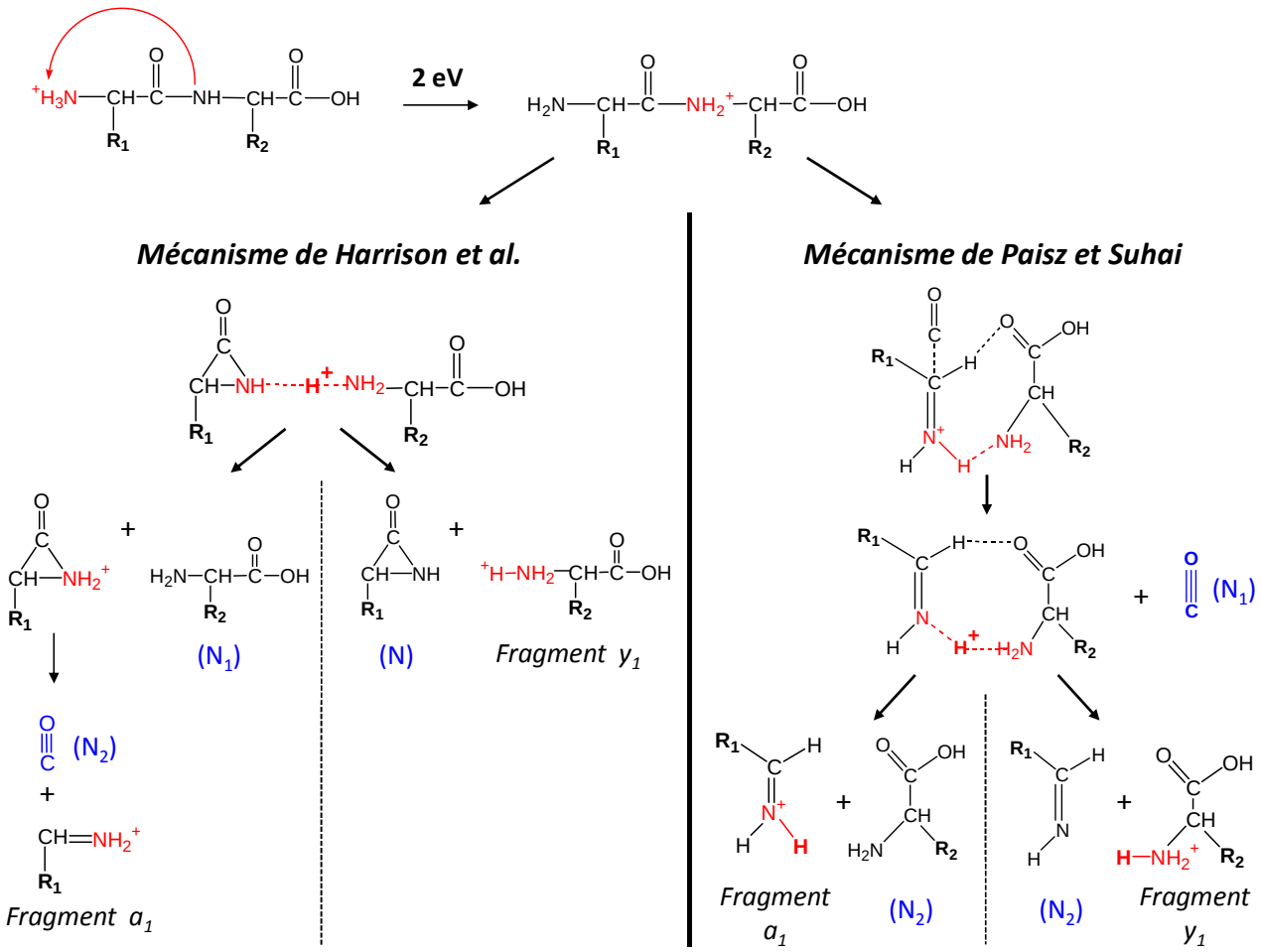


figure IV.23 : mécanismes proposés par Harrison et al. [26] et par Paizs & Suhai [27].

Après le transfert du proton vers le groupe amide, Harrison *et al.* [26] (figure IV.23) suggèrent un mécanisme avec formation d'un complexe lié par le proton entre une aziridone et un acide aminé. L'évolution de ce complexe est gouvernée par l'affinité protonique des chaînes latérales. Le proton se lie de manière préférentielle à la partie du complexe qui a la plus forte affinité protonique. Si l'acide aminé qui a la plus forte affinité protonique est situé du côté N-terminal (chaîne latérale -R_1), Harrison *et al.* [26] proposent un mécanisme qui conduit à la production de l'ion a_1 en deux étapes, avec émission d'une molécule de CO lors de la 2ème étape. Si l'acide aminé qui a la plus forte affinité protonique est situé du côté C-terminal (chaîne latérale -R_2), les mêmes auteurs suggèrent un mécanisme en une seule étape pour la production de y_1.

Le mécanisme proposé par Paizs et Suhai [27] (figure IV.23) conduit à la production en deux étapes des ions a_1 et y_1. Ce mécanisme met en jeu un complexe lié par le proton autre que celui proposé par Harrison *et al.* [26]. Le calcul effectué par Paizs et Suhai [27] indique que ce complexe cyclique est formé de manière plus favorable que celui impliquant l'aziridone. Il conduit à un mécanisme séquentiel de production des ions a_1 et y_1, avec éjection d'une molécule de CO lors de la 1ère étape.

Le mécanisme de production en une seule étape de l'ion y_1 proposé par Harrison *et al.* [26] est en désaccord flagrant avec les résultats expérimentaux observés pour les ions y_1 de $[GW + H]^+$, $[LW + H]^+$ et $[WK + H]^+$, et l'ion y_2 de $[GWG + H]^+$. En effet, les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ associés à ces quatre canaux (figure IV.21 et figure IV.22) indiquent qu'il s'agit de mécanismes séquentiels. Les résultats expérimentaux obtenus pour les fragmentations y_1 et y_2 peuvent être expliqués par le mécanisme séquentiel proposé par Paizs et Suhai [27]. Nous n'avons pas pu faire de traitement en multicoïncidence des évènements associés aux ions y_1 *m/z* 205 de $[GW + H]^+$ et y_2 *m/z* 262 de $[GWG + H]^+$. Le mécanisme de Paizs et Suhai [27] appliqué à ces deux canaux de fragmentation implique l'émission successive de deux fragments neutres de masse similaire : une molécule de CO (m = 28 uma) lors de la 1ère étape et une molécule $NH{=}CH_2$ (m = 29 uma) lors de la 2ème étape. Ce mécanisme est compatible avec la structure « linéaire » des $N(v_{zi}, v_{zn})$ observés pour les fragments y_1 de $[GW + H]^+$ et y_2 de $[GWG + H]^+$.

Les deux mécanismes séquentiels de production des ions a_1 proposés par Harrison *et al.* [26] et Paizs & Suhai [27] pourraient expliquer les résultats expérimentaux obtenus pour les ions a_1 de $[WG + H]^+$, $[WL + H]^+$, $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$, et l'ion a_2 de $[GWG + H]^+$ (figure IV.21 et figure IV.22).

Un traitement en multicoïncidence de ces données a permis de mettre en évidence deux mécanismes séquentiels possibles qui expliquent les deux étapes de fragmentation observées (cf tableau IV.6). Un mécanisme correspond à l'éjection d'une molécule de CO lors de la 1ère étape et l'autre à l'éjection d'une molécule de H_2O ou de NH_3 lors de la 2ème étape. Le mécanisme séquentiel proposé par Paizs et Suhai [27] (émission d'une molécule de CO lors de la 1ère étape) correspond donc mieux que celui de Harrison *et al.* [26] (émission d'une molécule de CO lors de la 2ème étape, pour les fragments a_1) aux résultats de ce traitement en multicoïncidence.

IV.5.4 Autres fragmentations produites par conversion interne

IV.5.4.1 Fragmentations particulières impliquant la Lysine

En plus des fragmentations a_1 et y_1, nous avons observé les fragments *m/z* 129 et *m/z* 84 pour la molécule $[KW +H]^+$ et un fragment *m/z* 129 pour la molécule $[WK +H]^+$ (cf tableau IV.2, page 190). Le fragment *m/z* 84 correspond à un fragment incluant la chaîne latérale de la Lysine (73 uma). Les diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ de simple coïncidence obtenus pour ces différents canaux de fragmentation sont présentés sur la figure IV.24. Ces résultats indiquent que le fragment b_1 (*m/z* 129) de la molécule $[KW +H]^+$ est produit par un mécanisme en une seule étape. L'ion *m/z* 84 de $[KW +H]^+$ et le fragment z_1 (*m/z* 129) de $[WK +H]^+$ sont produits par des mécanismes séquentiels.

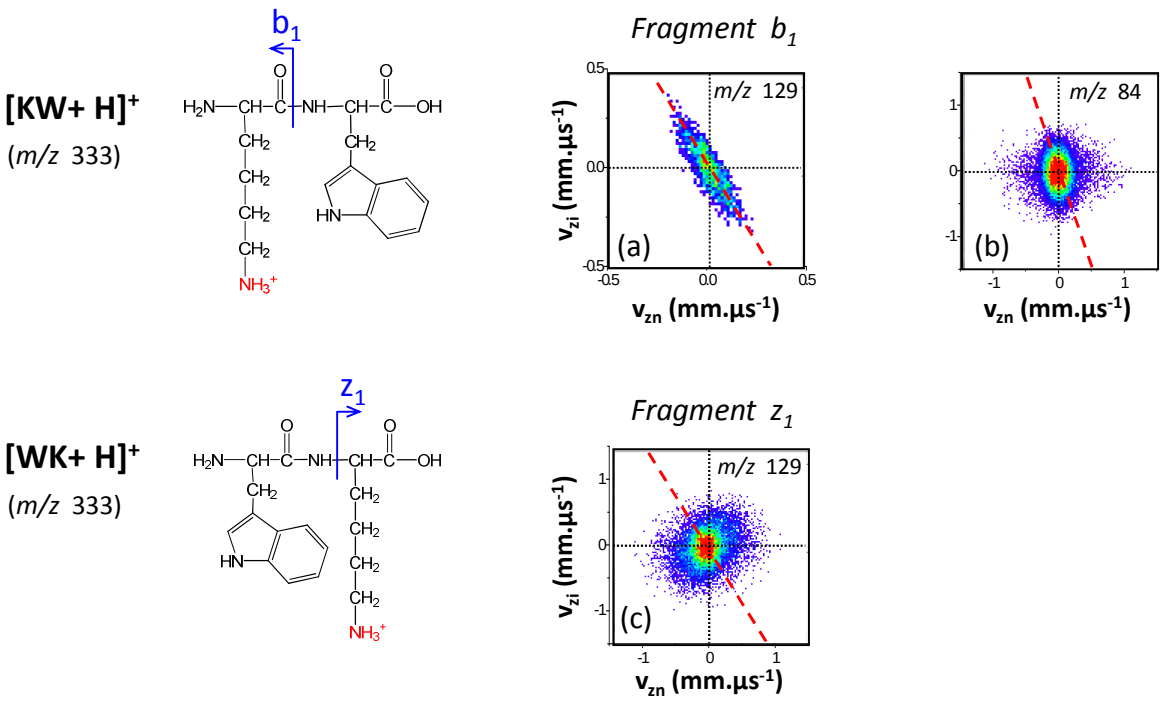


figure IV.24 : Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ obtenus pour les ions m/z 129 et m/z 84 de $[KW +H]^+$ et pour l'ion m/z 129 de $[WK +H]^+$. La pente de la droite en trait pointillé rouge correspond au rapport des masses – m_n / m_i pour une fragmentation en une étape.

De même que pour les fragments des dipeptides $[WK +H]^+$ et $[KW + H]^+$ produits par rupture de la liaison peptidique, nous n'avons pu traiter en multicoïncidence les évènements enregistrés pour l'ion *m/z* 84 de $[KW + H]^+$ et l'ion *m/z* 129 de $[WK +H]^+$puisqu'il n'était pas possible de séparer et d'identifier les 2 fragments neutres. Ces fragmentations se produisent avec une constante de temps $\tau > 1$ µs

Les trois canaux de fragmentation de la figure IV.24, ont été observées en CID et sont spécifiques aux dipeptides contenant la Lysine [29]. Le mécanisme en une étape observé pour l'ion *m/z* 129 de $[KW + H]^+$ est en accord avec le mécanisme proposé par Yalcin *et al.* [29] pour un dipeptide de type $[KX + H]^+$ (figure IV.25). Après transfert de proton du groupement ε-amino (N-terminal de la Lysine) vers le groupement amide, une cyclisation se produit à partir du groupe ε-amino. Ceci conduit à la formation d'un complexe lié par le proton, entre un α-amino-ε-caprolactam (composé cyclique) et l'acide aminé associé à la Lysine. Suivant l'affinité protonique de ces deux entités, le complexe évolue pour donner, soit un α-amino-ε-caprolactam protoné (*m/z* 129), soit l'acide aminé protoné $[X + H]^+$. Pour le dipeptide $[KW + H]^+$, nous n'avons pas observé le $[W + H]^+$ (*m/z* 205) mais nous avons observé l'ion *m/z* 129 produit en une seule étape (figure IV.24.a.) et ce conformément au mécanisme de la figure IV.25.

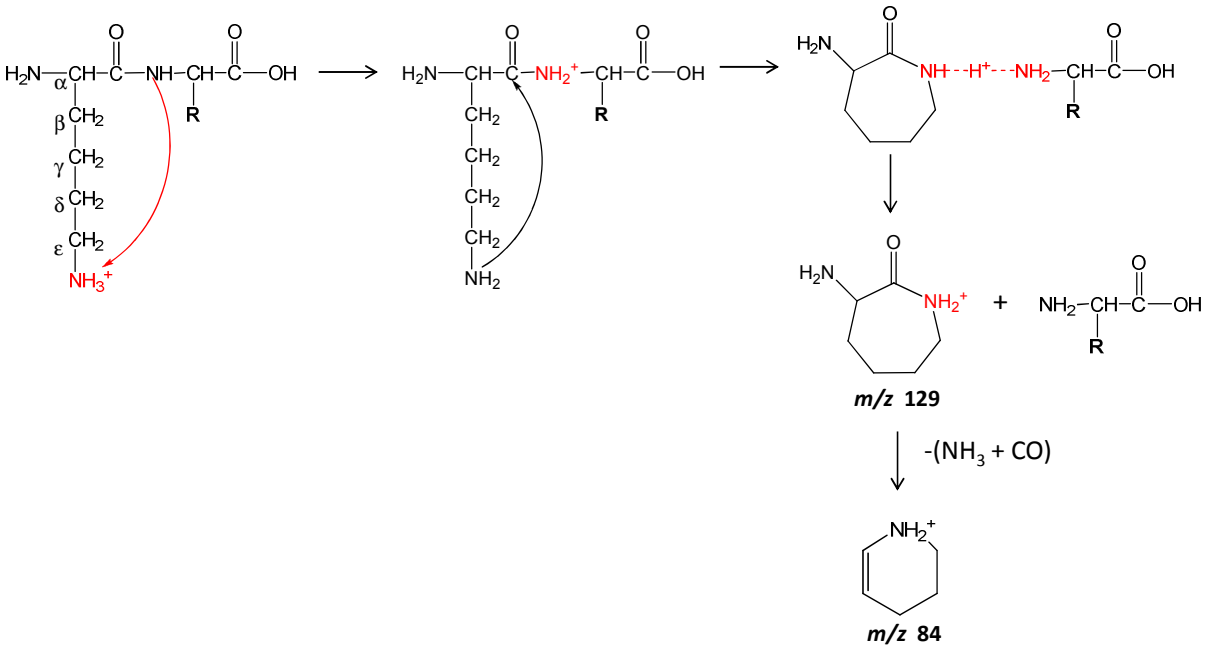


figure IV.25 : Mécanisme proposé par Yalcin et al. [29] pour la production des ions m/z 129 et m/z 84 pour un dipeptide [KX + H]$^+$

D'après les observations de Yalcin *et al*. [29], cet ion *m/z* 129 fragmente à nouveau pour donner un ion de masse *m/z* 84, en accord avec le mécanisme séquentiel observé pour l'ion *m/z* 84 (figure IV.24.b.)

Hiserodt *et al*. [30] avec des expériences de CID résolues en énergie (ERMS) ont expliqué la formation séquentielle de l'ion *m/z* 129 pour un dipeptide de type $[XK + H]^+$. Le

mécanisme proposé implique un transfert initial de H^+ vers le groupement hydroxyle, suivi d'une cyclisation qui conduit à la perte d'une molécule d'eau (figure IV.26). Hiserodt *et al.* [30] proposent un mécanisme où l'ion produit (*m/z* 315 dans le cas de $[WK + H]^+$) évolue vers un complexe cyclique lié par le proton, semblable à celui calculé par Paizs et Suhai [27]. Après perte d'une molécule de CO, ce complexe évolue suivant l'affinité protonique de l'acide aminé associé à la Lysine et celle de l'α-amino-ε-caprolactam formé (figure IV.26). Ce complexe conduit à la production d'un ion immonium (*m/z* 159 dans le cas de $[WK + H]^+$) et/ou d'un α-amino-ε-caprolactam protoné (*m/z* 129).

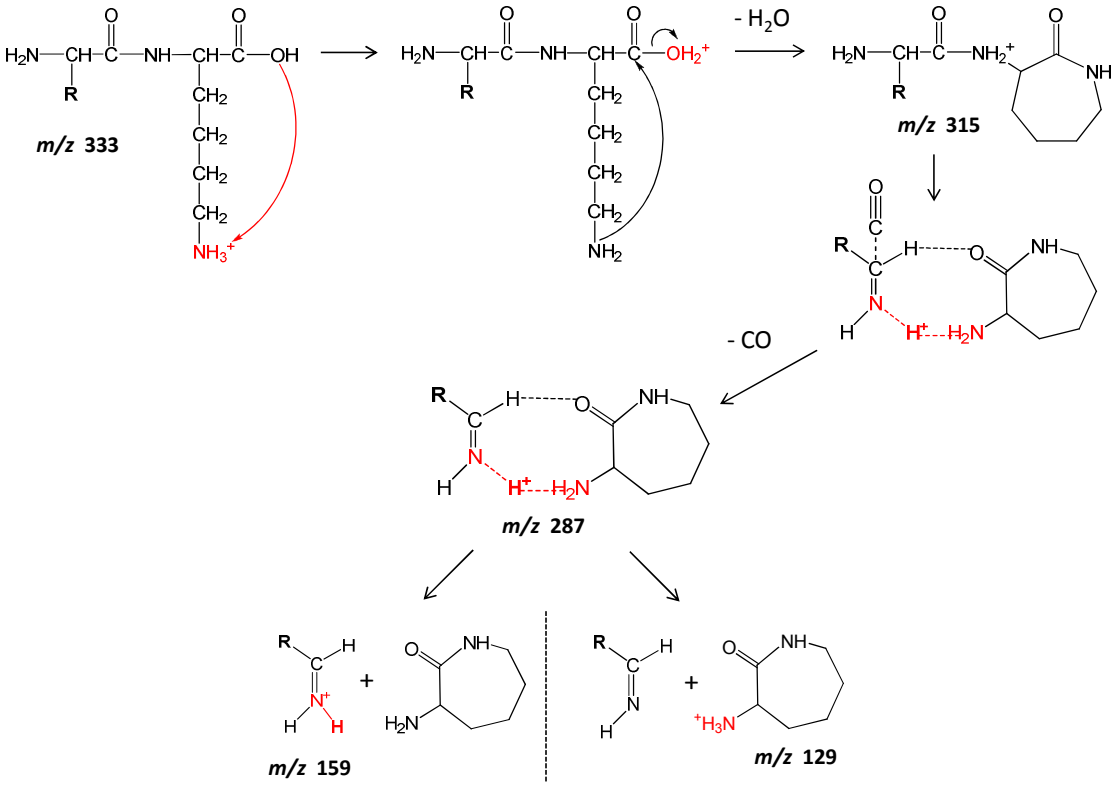


figure IV.26 : Mécanisme séquentiel de production de l'ion m/z 129 pour [WK + H]$^+$ proposé par Hiserodt* et al. *[30]

Le mécanisme séquentiel de la figure IV.26 est en accord avec les résultats expérimentaux que nous avons obtenus pour le canal *m/z* 129 de $[WK + H]^+$ (figure IV.24.c.). Nous ne pouvons pas justifier si l'ion *m/z* 159 de $[WK + H]^+$ est produit par ce mécanisme et/ou par le mécanisme de Paizs et Suhai [27] (figure IV.23). Notons cependant que les ions intermédiaires mis en jeu dans le mécanisme de la figure IV.26 (*m/z* 315 et 287 dans le cas de $[WK + H]^+$) n'ont pas été observés avec notre dispositif malgré le long temps de fragmentation mesuré pour ce canal ($\tau > 1$ µs).

IV.5.4.2 Mécanisme séquentiel de production de l'ion m/z 188 pour $[GW + H]^+$

Le canal de fragmentation présenté dans ce paragraphe n'a pas été facile à analyser mais montre que notre dispositif permet d'analyser des mécanismes de fragmentation séquentiels produits en trois étapes.

Le diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ de la figure IV.27.a., enregistré pour la molécule $[GW + H]^+$ présente trois motifs de corrélation notés (α), (β) et (γ). Le motif (α) de coordonnée y_i = -8.8 mm correspond à un ion possédant une énergie $E_i \approx 3310$ eV à l'entrée de l'analyseur électrostatique[23]. Il s'agit de l'ion *m/z* 188 produit à l'intérieur de la zone polarisée[24]. Sur le diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ associé au motif (α) (figure IV.27.c), les points expérimentaux s'alignent sur la droite tracée. Ce motif correspond à la fragmentation z_1 (ion *m/z* 188) de $[GW + H]^+$ produite en une étape.

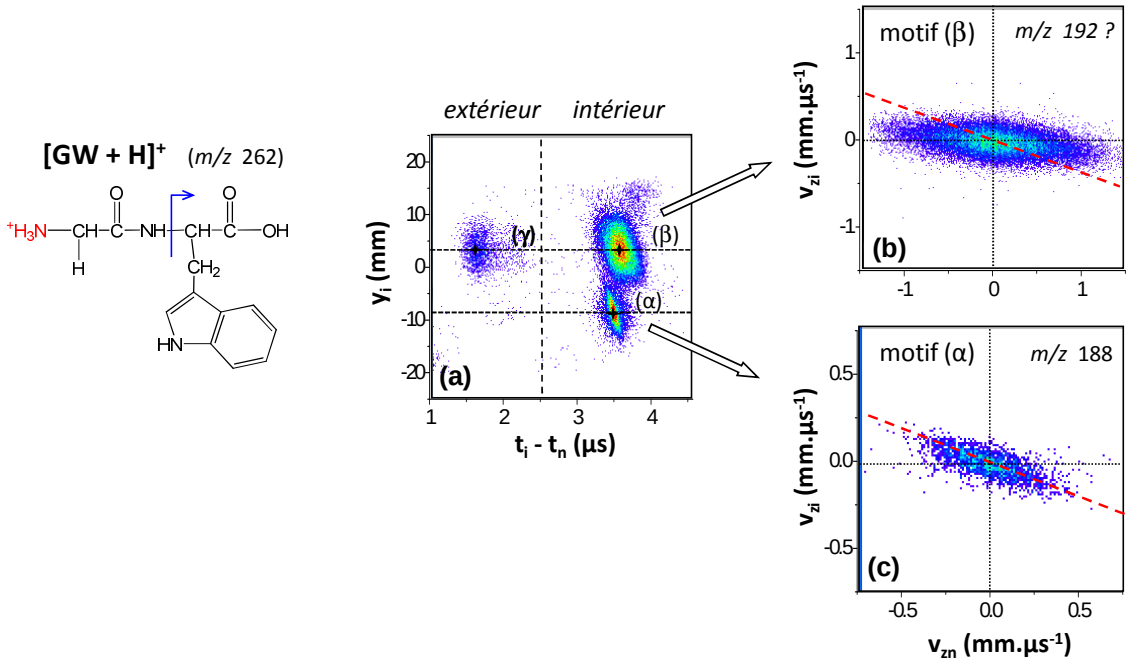


figure IV.27 : Diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ enregistré pour les ions m/z 188 de $[GW + H]^+$ pour la zone polarisée par un potentiel V = 1000 Volts et V_{ana} = 2050 Volts. Diagrammes $N(v_{zi}, v_{zn})$ associés respectivement aux évènements des motif (α) et (β). Les pente des droites en trait pointillé rouge sont celles correspondant à une fragmentation directe.

---

[23] $E_i = \frac{qV_a}{2h}(y_{galion} + y_i)$. Calcul effectué pour V_a = 2050 V, h = 152.9 mm et y_{galion} = 503 mm

[24] Pour une fragmentation qui a lieu à l'intérieur de la zone polarisée $E_i = q(V_0 + V)\frac{m_i}{m_0} - qV$, donc $m_i = \frac{E_i + qV}{q(V_0 + V)} m_0$. Calcul effectué pour E_i = 3313 Volts, V = 1 kVolts, V_0 = 5 kVolts et m_0 = 262 uma

Le motif (β), situé à la coordonnée y_i = 3.4 mm, correspond à un ion d'énergie $E_i \approx$ 3390 eV à la sortie de la zone polarisée, qui serait un fragment *m/z* 192 s'il était produit par une fragmentation directe dans la zone polarisée. Le diagramme $N(v_{zi}, v_{zn})$ associé au motif de corrélation (β),présenté sur la figure IV.27.b., montre que les points expérimentaux ne sont pas alignés sur la droite de pente -70/192 = -0,365. Il s'agit donc d'un mécanisme de fragmentation séquentiel. Notons que les motifs (β) et (γ) ont la même position y_i. Ils sont donc associés à un même canal de fragmentation.

Une expérience a été réalisée avec la zone d'interaction *non-polarisée*. Les trois motifs (α), (β) et (γ) du diagramme $N(y_i, t_i - t_n)$ (résultats non-présentés ici), ne forment plus qu'une seule contribution associée au même fragment ionique *m/z* 188. Les motifs (β) et (γ) sont donc associés à un ion *m/z* 188 produit par un mécanisme séquentiel. Les deux motifs de corrélation (β) et (γ) localisés au même y_i indiquent que l'ion final *m/z* 188 est corrélé à des fragments neutres émis à l'intérieur (motif β) et à l'extérieur (motif γ) de la zone polarisée. Le fragment ionique final *m/z* 188 associé à ces évènements est donc émis à l'extérieur de la zone polarisée.

Nous n'avons pas pu expliquer les motifs (β) et (γ) par un mécanisme de production de l'ion *m/z* 188 en deux étapes. Nous avons donc chercher un mécanisme en *trois* étapes correspondant à deux fragmentations rapides produites à l'intérieur de la zone polarisée (motif β) suivies d'une fragmentation plus lente dans la zone située avant l'analyseur électrostatique (motif γ).

Soit m_{i0} la masse de l'ion parent, m_{i2} celle du deuxième ion intermédiaire produit dans la zone polarisée par un potentiel V et m_{i3} l'ion final produit à l'extérieur de la zone polarisée. L'énergie E_{i3} de l'ion final s'exprime par la relation suivante :

$$E_{i3} = \left(q(V_0 + V)\frac{m_{i2}}{m_{i0}} - qV \right)\frac{m_{i3}}{m_{i2}} \qquad \text{(IV.2)}$$

La masse m_{i2} est directement déduite de l'énergie de l'ion final d'énergie $E_{i3} \approx$ 3390 eV. A partir de l'équation (IV.2) (avec V_0 = 5 kVolts, V = 1 kVolt, m_{i0} = 262 uma et m_{i3} = 188 uma), on en déduit la masse m_{i2} = 205 uma.

Pour $[GW + H]^+$, l'ion *m/z* 205 est produit par un mécanisme séquentiel rapide (60 ns) en deux étapes (cf tableau IV.1, page 189). Ce fragment ionique n'est autre que la molécule de Tryptophane protonée, du mécanisme proposé par Paizs et Suhai [27] (figure IV.23, page

222). La production de l'ion final *m/z* 188 à l'extérieur de la zone polarisée, motif (γ) de la figure IV.27.a, correspond à la perte « lente » ($\tau > 1$ µs) d'un fragment NH_3 par la molécule Trp-H^+ (*m/z* 205). Ce mécanisme de fragmentation en trois étapes se résume ainsi :

1) Perte de CO (m_{n1} = 28 uma)
2) Perte de $NH{=}CH_2$ (m_{n2} = 29 uma)
3) Perte de NH_3 (m_{n3} = 17 uma)

Ce mécanisme en trois étapes de production de l'ion *m/z* 188 a également été observé pour $[LW+ H]^+$ mais il s'agit d'un canal très faible par comparaison à $[GW+ H]^+$ (cf probabilités relatives dans le tableau IV.1, page 189). Comme la molécule $[LW + H]^+$ possède un plus grand nombre de degrés de liberté que $[GW + H]^+$, la même quantité d'énergie interne est répartie sur un plus grand nombre de degrés de liberté. Comparativement à $[GW + H]^+$, moins d'énergie est déposée dans chaque degré de liberté de $[LW + H]^+$, ce qui explique la faible probabilité relative de ce canal produit dans l'état fondamental.

Notons que notre technique expérimentale de multicoïncidence a permis de montrer l'existence de deux mécanismes compétitifs produisant l'ion *m/z* 188 pour la molécule $[GW + H]^+$ (*m/z* 262) :

- une fragmentation rapide en 1 étape produite dans l'état électronique excité (fragmentation z_1).
- une fragmentation en 3 étapes, produite après conversion interne dans l'état fondamental (fragmentations observées en CID), qui implique l'émission rapide de deux fragments neutres (fragmentation y_1) suivie d'une fragmentation lente supplémentaire (perte de NH_3).

Tous les mécanismes séquentiels décrits dans cette partie ont été observés en CID. Nos observations expérimentales sont en accord avec la plupart des mécanismes CID proposés. Pour la fragmentation $a_1 - y_1$, nous avons montré que le mécanisme de Harrison et al. ne décrivait pas correctement les mécanismes observés et que nous étions en accord avec le mécanisme proposé par Paizs et Suhai. Nous avons pu aussi montrer l'avantage de la technique des coïncidences et de l'échelle de temps nano-microseconde que nous utilisons, qui nous ont permis de mettre en évidence deux mécanismes complètement différents pour un même canal de fragmentation (ion m/z 188 de $[GW + H]^+$).

IV.6 Temps de fragmentation déterminé par interaction ion-laser dans un champ électrique

Pour les dipeptides et tripeptide étudiés, en utilisant les résultats obtenus précédemment sur le Trp-H^+ et les résultats d'expériences CID de la littérature, nous avons pu déterminer si les canaux de fragmentation observés sont produits dans l'état excité ou dans l'état fondamental après conversion interne. Nous avons vu dans le chapitre précédent que les temps de fragmentation mesurés pour le complexe $[Trp + H]^+$(CE) nous ont permis de différencier ces deux mécanismes. Pour les petits peptides contenant le W, présentés dans ce chapitre, nous ne pouvons pas, à l'aide des temps de fragmentation mesurés, différencier les mécanismes produits dans l'état fondamental de ceux initiés après conversion interne.

Nous avons résumé dans le tableau IV.7, les mécanismes proposés pour tous les canaux de fragmentation qui ont un temps $\tau < 1$ µs. Dans ce tableau sont également donnés les temps de fragmentation mesurés pour chaque canal. Les fragmentations produites uniquement à l'extérieur de la zone polarisée (*m/z* 144 et fragmentations consécutives à la perte de H) ainsi que les voies de fragmentation des molécules $[WK + H]^+$ et $[KW + H]^+$ qui se produisent avec un temps de fragmentation $\tau > 1$ µs, ont été volontairement exclues de ce tableau.

Sur ce tableau, on constate qu'en moyenne, on a un temps de fragmentation in férieur ou égal à 20 ns pour $[W + H]^+$, d'environ 30 à 50 ns pour $[WG + H]^+$ et $[GW + H]^+$ et d'environ 100 à 200 ns pour $[WL + H]^+$, $[LW + H]^+$ et $[GWG + H]^+$ et ce, **quel que soit le mécanisme**. Ces temps de fragmentation augmentent avec la taille du système étudié ce qui suggère des mécanismes statistiques, même pour les canaux de fragmentation dont on pense qu'ils sont produits dans l'état excité.

Les expériences pompe-sonde réalisées avec des impulsions laser femtoseconde [31-33] ont montré que les états excités des acides aminés aromatiques protonés ont une durée de vie inférieure à quelques picosecondes. Ces expériences ont permis de différencier clairement fragmentations statistiques et non-statistiques. Les temps de fragmentation associés aux mécanismes dans l'état excité que nous avons mesurés sont très longs par rapport à la dynamique de l'état excité. Notons également que le processus de conversion interne a lieu sur une échelle de temps très supérieure au temps de fluorescence qui est de l'ordre de 20 ns.

	Fragmentations initiées dans l'état excité		Fragmentations produites après conversion interne	
Molécule étudiée	*Canal*	*τ mesuré (ns)*	*Canal*	*τ mesuré (ns)*
[W + H]$^+$	130$^+$	≤ 20	159$^+$	≤ 20
m/z 205	132$^+$	≤ 20	***188***$^+$	***≤ 20***
	188$^+$	***≤ 20***		
[WG + H]$^+$	130$^+$	45	159$^+$	30
m/z 262	132$^+$	25	***245***$^+$	***≤ 20***
	245$^+$	***≤ 20***		
[WL + H]$^+$	130$^+$	50	159$^+$	130
m/z 318	132$^+$	85	***301***$^+$	***110***
	301$^+$	***110***		
[GW + H]$^+$	130$^+$	50	132$^+$	> 200
m/z 262	188$^+$	70	205$^+$	60
			216$^+$	60
[LW + H]$^+$			188$^+$	>200
m/z 318			205$^+$	> 200
[GWG + H]$^+$	130$^+$	150	132$^+$	> 200
m/z 319	245$^+$	70	216$^+$	100
			262$^+$	50

tableau IV.7 : Résumé du type de mécanisme et du temps de fragmentation mesuré pour tous les canaux de fragmentation qui ont un temps τ < 1 µs. En gras sont indiquées des canaux qui correspondent aux deux mécanismes, statistique et non-statistique (perte de NH_3). Remarque : 20 ns correspond à la limite de résolution temporelle de notre dispositif.

Dans le chapitre précédent nous avons évoqué l'existence d'un complexe ion-neutre produit après fragmentation dans l'état excité. La fragmentation de ce complexe de ce complexe dans l'état fondamental peut expliquer la dynamique que nous observons où tous les temps de fragmentation semblent statistiques et évoluent avec la taille du système (cf tableau IV.7). Les dipeptides [WK + H]$^+$ et [KW + H]$^+$ n'ont pas beaucoup plus de degrés de liberté que [WL + H]$^+$, [LW + H]$^+$ et [GWG + H]$^+$ ont pourtant un temps de fragmentation beaucoup plus grand (τ ≈ 3 à 4 µs, soit 1 ordre de grandeur de plus). Cette augmentation importante du temps de fragmentation pour les dipeptides contenant la Lysine n'est donc pas liée à la taille de la molécule. *A priori*, il s'agit plutôt d'un effet lié à la hauteur des barrières de dissociation. Comme le N-terminal de la Lysine est plus basique que le N-terminal de la chaîne peptidique, le transfert de proton sur l'amide dans l'état fondamental nécessite plus d'énergie pour [WK + H]$^+$ et [KW + H]$^+$ que pour les autres di- et tripeptides étudiés. Par ailleurs le proton peut être bloqué par une liaison hydrogène entre le N-terminal de la Lysine

et le N-terminal de la chaîne peptidique. Ceci explique l'augmentation importante du temps de fragmentation mesuré pour les dipeptides contenant la Lysine.

Des expériences permettent de confirmer l'hypothèse d'un complexe ion-neutre produit dans l'état excité et qui se dissocierait dans l'état fondamental. Guidi *et al.* [34] ont effectués des expériences de spectroscopie UV sur des peptides refroidis à ≈ 10 K, comptant jusqu'à 17 acides aminés contenant un acide aminé aromatique (Trp, Tyr ou Phe). Le signal observé pour la fragmentation de la liaison C_α-C_β de l'acide aminé aromatique après photoexcitation UV est très faible. Ce signal est augmenté jusqu'à deux ordres de grandeur lorsque les peptides sont excités avec un laser CO_2 décalé en temps après l'excitation UV. Le laser à CO_2, qui augmente l'énergie interne de ces peptides, permet donc d'augmenter la constante de vitesse de la rupture de la liaison C_α-C_β. Ce type de fragmentation, spécifique de l'état excité, a donc un temps de fragmentation qui évolue lorsqu'on « chauffe » la molécule après un temps bien supérieur à la durée de vie de l'état excité. Ceci est cohérent avec l'hypothèse de la formation d'un complexe ion-neutre, où l'augmentation de l'énergie interne (avec le laser CO_2 dans les expériences de Guidi *et al.* [34]) permet dans ce cas d'aider à casser ce complexe.

En ECD, pour justifier les temps observés pour la fragmentation de la liaison N-C_α pendant lesquels des réarrangements radicalaires sont possibles, l'existence d'un complexe ion-radical [c'-z$^\bullet$] a également été proposée[25] [35]. L'évolution de ce complexe conduit à la production des ions c' + z$^\bullet$ ou c$^\bullet$ + z'. La rupture de la liaison N-C_α est donc également associée à un temps de fragmentation non-statistique. Notons que le même type d'expérience que celles de Guidi *et al.* est effectué en ECD [36, 37] : les molécules étudiées sont activées par un laser IR ou par collision avant (ou après) capture d'un électron de faible énergie. Après activation, la variation de l'intensité des fragments ECD produits en fonction de l'énergie interne du précurseur permet de différencier en partie les structures primaires, secondaires et tertiaires de protéines en phase gazeuse. En modulant l'activation vibrationnelle des ions précurseurs, Tsybin *et al.* [38] ont montré clairement que l'intensité des ions c et z, prime et radicaux, produits en ECD dépend de l'énergie interne de ce précurseur.

[25] La notation « prime » est utilisée en ECD pour indiquer qu'il s'agit d'un fragment ionique

IV.7 Comparaison à des peptides contenant la Tyrosine

Dans ce chapitre, nous avons montré que le modèle de transfert d'électron et de proton à l'état excité, établi pour la molécule de Trp-H^+ s'applique à de petits peptides contenant le Trp. Mais qu'en est-il des autres acides aminés aromatiques comme la Tyrosine et la Phénylalanine ? Le modèle de transfert d'électron et de proton que nous avons établi s'applique-t-il aussi aux petits peptides qui contiennent un autre type d'acide aminé aromatique ?

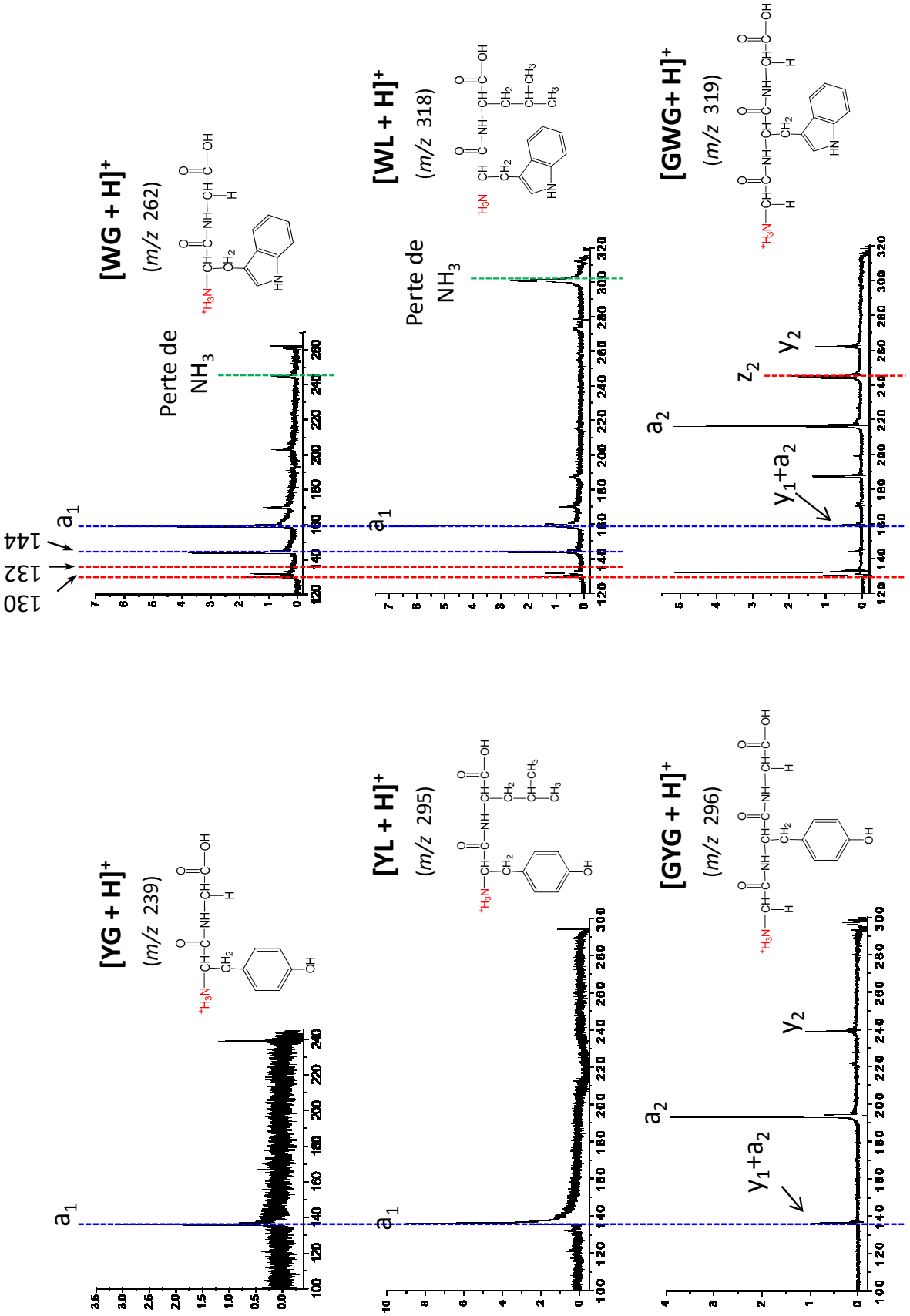
Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le mécanisme de fragmentation C_α-C_β dans l'état excité est présent pour la Tyr-H^+. Notons cependant que les canaux observés sont beaucoup moins intenses que pour le Trp-H^+ dû en partie à la force d'oscillateur plus faible de la Tyr-H^+ photo-excitée à 266 nm.

Aucune expérience en coïncidence n'a été effectuée avec la Tyrosine (notée Y en abrégé). Nous présentons cependant, sur la figure IV.28, des spectres de photofragmentation[26] UV enregistrés pour les molécules $[YG + H]^+$, $[YL + H]^+$ et $[GYG + H]^+$ afin de les comparer aux canaux de fragmentation observés pour les molécules $[WG + H]^+$, $[WL + H]^+$ et $[GWG + H]^+$.

Sur la figure IV.28, pour les molécules contenant le W, on retrouve les différentes fragmentations qui ont été décrites dans ce chapitre. Les fragmentations initiées dans l'état excité produisent, pour les dipeptides $[WG + H]^+$, $[WL + H]^+$, les ions *m/z* 130, *m/z* 132 et la perte de NH_3 et pour le tripeptide $[GWG + H]^+$, l'ion *m/z* 130 et la fragmentation z_2. Après conversion interne, pour les dipeptides $[WG + H]^+$, $[WL + H]^+$, l'ion *m/z* 144 (consécutif à la perte de NH_3) et le fragment a_1 sont produits et pour le tripeptide, on observe les fragments a_2, y_2 et le fragment (y_1 + a_2) qui n'avait pas été mis en évidence dans l'étude en coïncidence. D'autres fragments de faible intensité sont présents sur ces trois spectres et correspondent à des fragments type CID.

figure IV.28 (page suivante) : spectres de photofragmentation UV

[26] Ces spectres ont été enregistrés avec la meme source electrospray il y a quelques années, par C. Jouvet et G. Grégoire, sur notre dispositif qui depuis a évolué. Les molécules présentées sur les spectres de la figure IV.28 ont donc été produites de la même façon que celles utilisées pour les expériences en coïncidence présentées dans cette thèse (énergie interne et conformations semblables). La photofragmentation est également effectuée à la même longueur d'onde (266 nm).


[WG + H]+
(m/z 262)
Perte de NH3
a1
130
132
144
[WL + H]+
(m/z 318)
Perte de NH3
a1
[GWG+ H]+
(m/z 319)
a2
y1+a2
z2
y2
[YG + H]+
(m/z 239)
a1
[YL + H]+
(m/z 295)
a1
[GYG + H]+
(m/z 296)
a2
y1+a2
y2

Pour les molécules contenant la Tyrosine, de façon surprenante, seules les fragmentations produites après conversion interne sont présentes. On n'observe aucune fragmentation initiée dans l'état excité[27].

Le modèle de transfert d'électron et de proton dans l'état excité que nous proposons semble donc ne pas s'appliquer pour des di- ou tripeptides, contenant la Tyrosine, photoexcités à 266 nm. Cette constatation se justifie par des calculs d'états excités effectués sur les molécules $[YG + H]^+$ et $[WG + H]^+$ par C. Jouvet. Ces calculs sont présentés ci-dessous sur la figure IV.30. Comme les molécules étudiées expérimentalement ont une énergie interne importante, elles sont plutôt présentes sous forme dépliée (cf chapitre III). Les calculs d'état excité de la figure IV.30 n'ont été effectuées que pour des conformères étendus (figure IV.29).

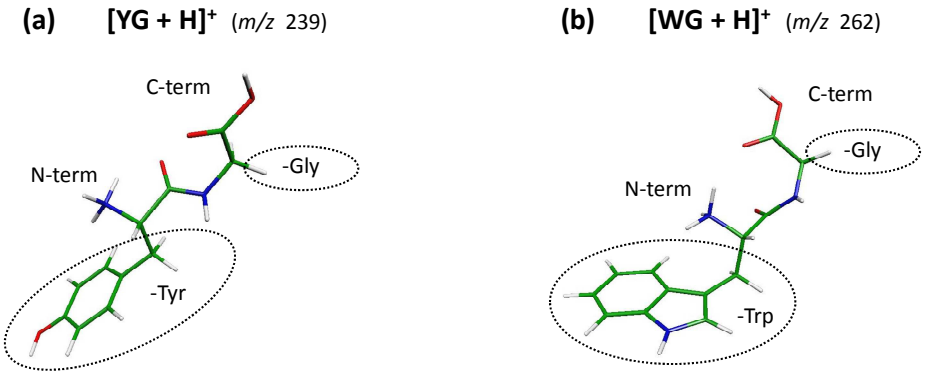


figure IV.29 : isomères de $[YG + H]^+$ et $[WG + H]^+$ utilisés dans le calcul de la figure IV.30

Sur la figure IV.30 sont présentés les différents états excités calculés entre 4.5 et 6.5 eV pour $[YG + H]^+$ et $[WG + H]^+$. Nous avons représenté l'énergie de 4,66 eV fourni par le laser UV (266 nm) mais également les états excités atteints pour une énergie interne de + 0,5 eV et de + 1 eV. Pour $[WG + H]^+$ on atteint les états excités $\pi\pi^*$, $\pi\sigma^*$ et on suppose que l'état $\pi\pi_{CO}^*$ peut être atteint par transfert de charge. Pour le conformère de $[YG + H]^+$ on n'atteint que l'état $\pi\pi^*$, les deux autres états excités $\pi\sigma^*$ et $\pi\pi_{CO}^*$ étant trop haut en énergie.

[27] Nous rappelons qu'après rupture de la liaison C_α-C_β, l'équivalent des ions *m/z* 130 et 132 du Trp-H^+ (*m/z* 205) sont les ions *m/z* 107 et 109 de la Tyr-H^+ (*m/z* 182)

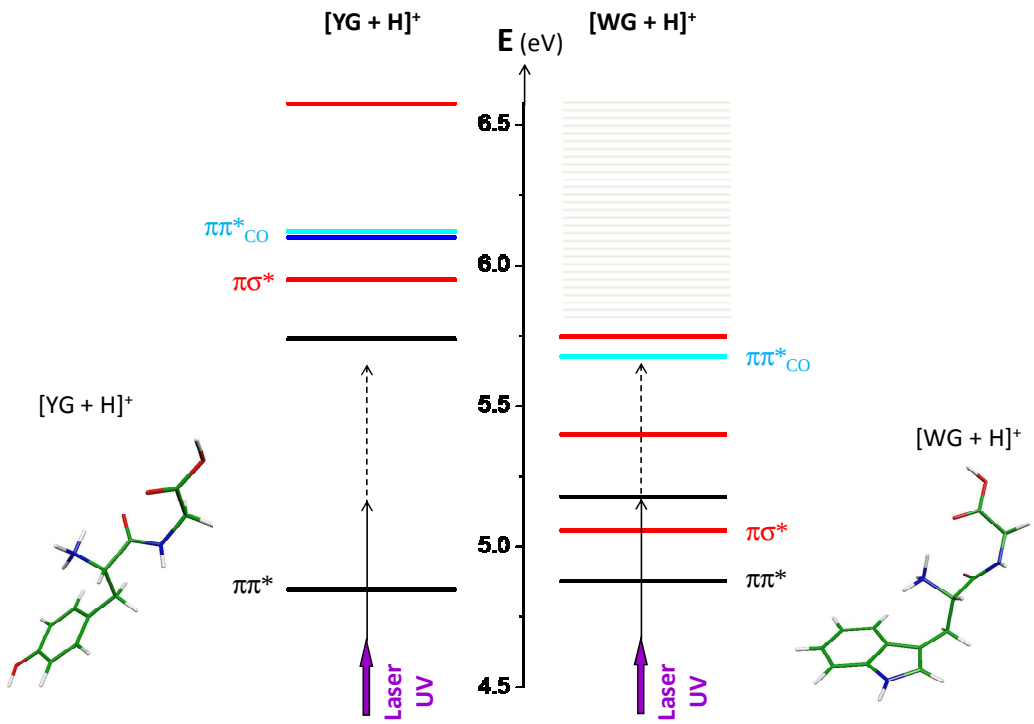


figure IV.30 : Calcul des états excités pour des conformères étendus de [YG + H]$^+$ et de [WG + H]$^+$

Le modèle de transfert d'électron et de proton à l'état excité que nous avons utilisé pour [WG + H]$^+$ est justifié par les calculs présentés sur la figure IV.30. Pour une conformation étendue de [WG + H]$^+$, les états ππ* et πσ* sont accessibles et l'état $\pi\pi_{CO}$* semble pouvoir être atteint, en accord avec les mécanismes présentés au § IV.4.1. Pour un conformère étendu de [YG + H]$^+$, les calculs de la figure IV.30 indiquent que l'électron photo-excité peut uniquement rester localisé sur l'indole. Cela explique pourquoi on n'observe ni la perte de NH_3, ni le fragment *m/z* 107 dans les spectres de la figure IV.28. Seule l'absence du fragment *m/z* 109 (équivalent de *m/z* 132 pour [WG + H]$^+$) sur ces spectres n'est pas encore comprise. Il est probable que la conversion interne l'emporte sur cette voie de dissociation.

Le modèle de transfert d'électron et de proton dans l'état excité qui s'applique à des petits peptides contenant le Trp, ne s'applique donc pas à ceux contenant la Tyr

IV.8 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que le mécanisme utilisé pour décrire la photofragmentation du $[W + H]^+$ pouvait s'étendre à des systèmes de plus grande taille contenant le W. Le modèle de transfert d'électron suivi d'un transfert de proton dans l'état excité proposé pour le $[W + H]^+$ s'applique à des dipeptides contenant le W, protonés sur la chaîne peptidique. Ce mécanisme ne s'applique pas pour les dipeptides protonés sur leur chaîne latérale, où le W est associé à un acide aminé fortement basique tel la Lysine. Pour les systèmes où le site de protonation n'est pas situé sur la chaîne peptidique, nous n'avons observé aucune fragmentation spécifique UVPD, induite dans l'état excité. Le tripeptide $[GWG + H]^+$ a été étudié avant le début de ma thèse mais, à l'époque, seules quelques voies de fragmentation étaient comprises [39]. Le parallèle effectué sur les sept molécules contenant le W, présentées dans ce chapitre, a permis d'obtenir une vue globale sur les mécanismes de photofragmentation mis en jeu.

A l'origine de cette étude nous nous demandions si la position du W dans un dipeptide modifie les mécanismes de fragmentations observés. Des expériences CID ont montré que la position du W à une influence sur les fragmentations produites dans l'état fondamental par excitation vibrationnelle [40]. Nous avons retrouvé des résultats similaires qui correspondent vraisemblablement à des fragmentations induites après conversion interne. Nous avons montré que la position du W modifie les mécanismes de fragmentation dans l'état excité. Un même mécanisme de transfert d'électron suivi d'un transfert de proton sur le carbonyle, dans l'état excité, peut induire deux sortes de fragmentation. Suivant la position du W par rapport au carbonyle sur lequel est transféré l'électron, on observe, soit la rupture de la liaison C_α-C_β, soit la rupture de la liaison N-C_α.

La mesure des temps de fragmentation de ces systèmes ne nous a pas permis de différencier les fragmentations initiées dans l'état excité de celles induites après conversion interne. Les fragments produits dans l'état excité restent sans doute piégés par une interaction dipolaire ion-molécule, qui conduit à l'observation de longs temps de fragmentation (considérés comme statistiques). Notre technique expérimentale reste cependant très efficace pour suivre la dynamique en temps réel et connaître l'ordre des étapes d'un mécanisme séquentiel produit en quelques dizaines de nanosecondes. Par rapport à la spectrométrie de masse qui permet uniquement d'identifier les fragments par la mesure de leur *m/z*, nous avons

montré comment notre dispositif différencie deux mécanismes différents (direct / séquentiel) pour un même fragment *m/z*.

Notre dispositif expérimental permet de mettre en évidence le passage par un ion intermédiaire, même s'il ne permet pas toujours de déterminer sa masse. On peut ainsi tester la validité de mécanismes de fragmentation calculés dans l'état fondamental. Dans ce chapitre nous avons montré le très bon accord entre nos résultats et le calcul d'optimisation de géométrie dans l'état fondamental effectué par Paizs & Suhai [27], alors que le calcul proposé par Harrison *et al.* [26] est en désaccord avec nos observations. Nos résultats peuvent également être comparés à des calculs d'optimisation de géométrie dans l'état excité ou servir à les guider [1, 3, 17, 41].

L'étude de la dynamique de l'état excité (femto-seconde) de la plupart des molécules étudiées dans ce chapitre a été effectuée par G. Grégoire et C. Jouvet il y a quelques années. Les résultats obtenus sur les dipeptides $[WL + H]^+$, $[LW + H]^+$ et le tripeptide $[GWG + H]^+$ ont été publiés [42-44]. Les mesures de dynamique de l'état excité des dipeptides contenant le Tryptophane associé à la Glycine ou la Lysine pourront être plus facilement exploités suite à l'étude que nous avons menée. Nos résultats permettent également de mieux comprendre ceux obtenus pour des peptides contenant la Tyrosine, comme montré à la fin de ce chapitre.

Bibliographie

1. G. Gregoire, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, *UV photoinduced dynamics in protonated aromatic amino acid,* Eur. Phys. J. D **51**, 109 (2009)
2. V. Lepere, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, V.J. Picard, C. Jouvet, P. Carcabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, A. Fujii, *Comprehensive characterization of the photodissociation pathways of protonated tryptophan,* J Chem Phys **127**, 134313 (2007)
3. B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, M. Perot, C. Jouvet, G. Gregoire, S. Brondsted Nielsen, *Mechanisms of photoinduced Calpha[Single Bond]Cbeta bond breakage in protonated aromatic amino acids,* J Chem Phys **128**, 164302 (2008)
4. M. Perot, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Jouvet, *Mechanisms of UV photodissociation of small protonated peptides,* J Phys Chem A **114**, 3147 (2010)
5. http://fr.wikipedia.org/wiki/Liaison_peptidique, web page
6. R.B. Martin, *Free energies and equilibria of peptide bond hydrolysis and formation,* Biopolymers **45**, 351 (1998)
7. K. Biemann, *Contributions of Mass-Spectrometry to Peptide and Protein-Structure,* Biomedical and Environmental Mass Spectrometry **16**, 99 (1988)
8. P. Roepstorff, J. Fohlman, *Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass-Spectra of Peptides,* Biomedical Mass Spectrometry **11**, 601 (1984)
9. Z.B. Maksic, B. Kovacevic, *Towards the absolute proton affinities of 20 alpha-amino acids,* Chem. Phys. Lett. **307**, 497 (1999)
10. H. Lioe, R.A.J. O'Hair, G.E. Reid, *Gas phase ion chemistry of biomolecules. Part 37 - Gas-phase reactions of protonated tryptophan,* J. Am. Soc. Mass Spectrom. **15**, 65 (2004)
11. L. Hanley, P.D. Edirisinghe, W.F. Calaway, I.V. Veryovkin, M.J. Pellin, J.F. Moore, *7.87 eV postionization of peptides containing tryptophan or derivatized with fluorescein,* Applied Surface Science **252**, 6723 (2006)
12. R. Maul, M. Preuss, F. Ortmann, K. Hannewald, F. Bechstedt, *Electronic excitations of glycine, alanine, and cysteine conformers from first-principles calculations,* J. Phys. Chem. A **111**, 4370 (2007)
13. H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Photo-induced dissociation of protonated tryptophan TrpH(+): A direct dissociation channel in the excited states controls the hydrogen atom loss,* Phys. Chem. Chem. Phys. **6**, 2628 (2004)
14. A. Ehlerding, J.A. Wyer, H. Zettergren, M.B.S. Kirketerp, S.B. Nielsen, *UV Photodissociation of Protonated Gly-Trp and Trp-Gly Dipeptides and Their Complexes with Crown Ether in an Electrostatic Ion Storage Ring,* J. Phys. Chem. A **114**, 299 (2010)

15. E. Bagheri-Majdi, Y.Y. Ke, G. Orlova, I.K. Chu, A.C. Hopkinson, K.W.M. Siu, *Copper-mediated peptide radical ions in the gas phase,* J. Phys. Chem. B **108**, 11170 (2004)

16. G. Gregoire, C. Jouvet, C. Dedonder, A.L. Sobolewski, *Ab initio study of the excited-state deactivation pathways of protonated tryptophan and tyrosine,* J. Am. Chem. Soc. **129**, 6223 (2007)

17. V. Lepere, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, Y.J. Picard, C. Jouvet, P. Carcabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, A. Fujii, *Characterization of neutral fragments issued from the photodissociation of protonated tryptophane,* Phys. Chem. Chem. Phys. **9**, 5330 (2007)

18. R.A. Zubarev, N.L. Kelleher, F.W. McLafferty, *Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process,* Journal of the American Chemical Society **120**, 3265 (1998)

19. J.E.P. Syka, J.J. Coon, M.J. Schroeder, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry,* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**, 9528 (2004)

20. E.A. Syrstad, Turec, F. ek, *Toward a general mechanism of electron capture dissociation,* Journal of the American Society for Mass Spectrometry **16**, 208 (2005)

21. X.H. Chen, F. Turecek, *The arginine anomaly: Arginine radicals are poor hydrogen atom donors in electron transfer induced dissociations,* Journal of the American Chemical Society **128**, 12520 (2006)

22. M. Sobczyk, W. Anusiewicz, J. Berdys-Kochanska, A. Sawicka, P. Skurski, J. Simons, *Coulomb-assisted dissociative electron attachment: Application to a model peptide,* J. Phys. Chem. A **109**, 250 (2005)

23. A. Fujihara, H. Matsumoto, Y. Shibata, H. Ishikawa, K. Fuke, *Photodissociation and spectroscopic study of cold protonated dipeptides,* J. Phys. Chem. A **112**, 1457 (2008)

24. A. Fujihara, N. Noguchi, Y. Yamada, H. Ishikawa, K. Fuke, *Microsolvation and Protonation Effects on Geometric and Electronic Structures of Tryptophan and Tryptophan-Containing Dipeptides,* J. Phys. Chem. A **113**, 8169 (2009)

25. H. Lioe, R.A.J. O'Hair, G.E. Reid, *Gas-phase reactions of protonated tryptophan,* Journal of the American Society for Mass Spectrometry **15**, 65 (2004)

26. A.G. Harrison, I.G. Csizmadia, T.H. Tang, Y.P. Tu, *Reaction competition in the fragmentation protonated dipeptides,* J. Mass Spectrometry **35**, 683 (2000)

27. B. Paizs, S. Suhai, *Theoretical study of the main fragmentation pathways for protonated glycylglycine,* Rapid Commun. Mass Spectrom. **15**, 651 (2001)

28. G.E. Reid, R.J. Simpson, R.A.J. O'Hair, *Probing the fragmentation reactions of protonated glycine oligomers via multistage mass spectrometry and gas phase ion molecule hydrogen/deuterium exchange,* Int. J. Mass Spectrom. **191**, 209 (1999)

29. T. Yalcin, A.G. Harrison, *Ion Chem. protonated lysine derivatives,* J. Mass Spectrometry **31**, 1237 (1996)

30. R.D. Hiserodt, S.M. Brown, D.F.H. Swijter, N. Hawkins, C.J. Mussinan, *A study of b(1)+H2O and b(1)-ions in the product ion spectra of dipeptides containing N-*

terminal basic amino acid residues, Journal of the American Society for Mass Spectrometry **18**, 1414 (2007)

31. H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Control of bond-cleaving reactions of free protonated tryptophan ion by femtosecond laser pulses,* J. Phys. Chem. A **109**, 2417 (2005)

32. H. Kang, C. Jouvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, C. Charriere, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Photoinduced processes in protonated tryptamine,* J. Chem. Phys. **122**, 7 (2005)

33. H. Kang, C. Jouvet, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Ultrafast deactivation mechanisms of protonated aromatic amino acids following UV excitation,* Phys. Chem. Chem. Phys. **7**, 394 (2005)

34. M. Guidi, U.J. Lorenz, G. Papadopoulos, O.V. Boyarkin, T.R. Rizzo, *Spectroscopy of Protonated Peptides Assisted by Infrared Multiple Photon Excitation,* J. Phys. Chem. A **113**, 797 (2009)

35. M.M. Savitski, F. Kjeldsen, M.L. Nielsen, R.A. Zubarev, *Hydrogen rearrangement to and from radical z fragments in electron capture dissociation of peptides,* Journal of the American Society for Mass Spectrometry **18**, 113 (2007)

36. K. Breuker, H.B. Oh, D.M. Horn, B.A. Cerda, F.W. McLafferty, *Detailed unfolding and folding of gaseous ubiquitin ions characterized by electron capture dissociation,* Journal of the American Chemical Society **124**, 6407 (2002)

37. H. Oh, K. Breuker, S.K. Sze, Y. Ge, B.K. Carpenter, F.W. McLafferty, *Secondary and tertiary structures of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry and photofragment spectroscopy,* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **99**, 15863 (2002)

38. Y.O. Tsybin, H. He, M.R. Emmett, C.L. Hendrickson, A.G. Marshall, *Ion activation in electron capture dissociation to distinguish between N-terminal and C-terminal productions,* Anal. Chem. **79**, 7596 (2007)

39. B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Jouvet, P. Carcabal, G. Gregoire, *Statistical versus non-statistical photo-fragmentation of protonated GWG tri-peptide induced by UV excitation,* Chem. Phys. **347**, 324 (2008)

40. F. Pingitore, M.J. Polce, P. Wang, C. Wesdemiotis, B. Paizs, *Intramolecular condensation reactions in protonated dipeptides: Carbon monoxide, water, and ammonia losses in competition,* J. Am. Soc. for Mass Spectrometry **15**, 1025 (2004)

41. U. Kadhane, M. Pérot, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Jouvet, A. Ehlerding, M.B.S. Kirketerp, S.B. Nielsen, J.A. Wyer, H. Zettergren, *Photodissociation of protonated tryptamine and its supramolecular complex with 18-crown-6 ether: Dissociation times and channels, absorption spectra, and excited states calculations,* Chem. Phys. Lett. **480**, 57 (2009)

42. D. Nolting, T. Schultz, I.V. Hertel, R. Weinkauf, *Excited state dynamics and fragmentation channels of the protonated dipeptide H2N-Leu-Trp-COOH,* Phys. Chem. Chem. Phys. **8**, 5247 (2006)

43. G. Gregoire, H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, C. Desfrancois, D. Onidas, V. Lepere, J.A. Fayeton, *Statistical vs. non-statistical deactivation pathways in the UV photo-fragmentation of protonated tryptophan-leucine dipeptide*, Phys. Chem. Chem. Phys. **8**, 122 (2006)

44. G. Gregoire, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, C. Desfrancois, J.A. Fayeton, *Ultrafast excited state dynamics in protonated GWG and GYG tripeptides*, Phys. Chem. Chem. Phys. **9**, 78 (2007)

CHAPITRE V

Photofragmentation de l’adénine protonée

CHAPITRE V. Photoframentation de l'adénine protonée

L'article que nous avons publié, en commun avec l'équipe coréenne de Park, sur la photofragmentation UV de l'adénine protonée constitue ce cinquième chapitre

[N.R. Cheong, S.H. Nam, H.S. Park, S. Ryu, J.K. Song, S.M. Park, M. Perot, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Jouvet, *Photofragmentation in selected tautomers of protonated adenine.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. 13(1): p. 291-295]

L'adénine est une molécule aromatique qui absorbe l'UV, comme les autres bases de l'ADN. L'adénine présente plusieurs sites possibles de protonation et peut être présente sous la forme de différents tautomères. A priori, avec notre source électrospray, nous formons le tautomère le plus stable de l'adénine. Pour l'équipe de Séoul, les molécules d'adénine protonées, formées après irradiation de dimères d'adénine neutres, sont présentes sous la forme d'un autre tautomère. Ceci a été vérifié d'après la forme des spectres d'action qu'ils ont enregistrés pour deux canaux de fragmentation de l'adénine protonée.

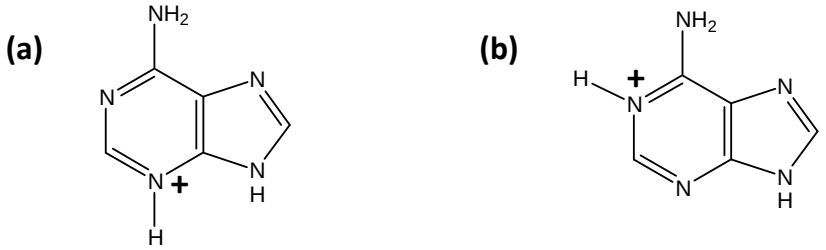


figure V.1 : tautomères de l'adénine protonée (m/z 136) étudiés à Orsay (a) et à Séoul (b)

En photofragmentant l'adénine protonée $[m_0]^+$, avec le laser UV envoyé dans le piège électrostatique, nous n'avons pas observé de radical cation $[m_0 - 1]^{\bullet+}$ piégé. La perte de H qui a été observée pour l'adénine neutre photoexcitée à 233 nm, n'est pas observée avec notre dispositif pour l'adénine protonée.

Dans le piège électrostatique nous avons observé un temps de vie $\tau \approx 8$ µs pour l'ion parent. Nous avons identifié quatre canaux de photofragmentation de l'adénine protonée (*m/z* 136)

- la perte de NH_3 (*m/z* 119)
- la perte de HCN (*m/z* 109)
- la perte de NH_2CN (*m/z* 94)
- l'ion NH_4^+ (*m/z* 18)

Les diagrammes de corrélation $N(v_{zi}, v_{zn})$ indiquent que ces quatre canaux correspondent à des fragmentations binaires en une étape. Ils présentent tous la même dynamique ($\tau \approx 1$ µs)[28]. Nous en déduisons qu'il s'agit de fragmentations statistiques produites dans l'état fondamental, après conversion interne.

Malgré des conformations initiales (tautomères) différentes, les intensités relatives des quatre canaux de fragmentation de l'adénine protonée obtenus avec notre dispositif sont assez similaires à ceux observés à Séoul (sauf pour le NH_4^+ qui n'est pas entièrement collecté dans l'expérience de Séoul). Ceci est en accord avec une dissociation statistique dans l'état fondamental vibrationnellement excité. Après conversion interne, l'énergie présente dans le système est supérieure à celle des barrières d'isomérisations. Cela permet de passer d'un tautomère à l'autre. C'est pourquoi la photofragmentation observée ne dépend pas de la conformation initiale.

[28] La différence des temps de fragmentation mesurés avec la zone polarisée ($\tau \approx 1$ µs) et le piège électrostatique ($\tau \approx 8$ µs) a été discutée dans le chapitre III.

CONCLUSION

Le dispositif ARC-EN-CIEL permet d'étudier la dynamique de photofragmentation UV de molécules d'intérêt biologique protonées par détection en coïncidence des photofragments ioniques et neutres. Cette thèse présente les résultats obtenus pour :

- le Tryptophane protoné, isolé et complexé à un éther-couronne
- de petits peptides protonés contenant le Tryptophane
- une base de l'ADN protonée : l'adénine

La technique expérimentale que nous utilisons permet de déterminer le nombre d'étapes associées à chaque canal de fragmentation, même quand celles-ci sont très rapides ($\tau < 20$ ns). Les informations temporelles et spatiales relatives aux fragments ioniques et neutres issus d'un même évènement permettent d'identifier avec précision chaque canal de fragmentation. Ainsi il est possible de distinguer, pour un même *m/z*, des fragments ioniques issus de mécanismes différents. Notre dispositif expérimental permet une étude de la dynamique de fragmentation sur une large échelle de temps. Les dynamiques rapides (20 ns $< \tau <$ 10 µs) sont étudiées par photo-excitation dans la zone polarisée par un champ électrique. On détermine de cette façon les temps de fragmentations associés à chaque canal détecté. Les dynamiques plus lentes (10 µs $< \tau <$ ms) sont étudiées en envoyant le laser d'excitation dans le piège électrostatique. Ce deuxième type d'expérience donne accès au temps de vie de l'ion parent et des ions fragments dont la masse est proche de celle du parent.

Les expériences effectuées sur des bases de l'ADN protonées, l'adénine et la thymine, ont montré que tous les canaux de fragmentation observés pour ces deux molécules présentent la même dynamique (τ de l'ordre de la µs). Tous les fragments sont produits après conversion interne dans l'état fondamental. D'autres expériences ont été effectuées sur l'adénosine et l'adénosine monophosphatée protonées afin de comparer leur dynamique à celle des mêmes systèmes chargés négativement [1, 2]. Depuis peu, des tests sont en cours sur l'adénosine monophosphate négativement chargée. Toutefois, des résultats ont récemment été publiés à ce sujet [3, 4].

Les temps de fragmentation mesurés pour le complexe Trp-H^+(CE), nous ont permis de mettre en évidence deux mécanismes différents : un mécanisme lent ($\tau \approx \mu s$), statistique, produit après conversion interne et un mécanisme rapide ($\tau \leq 50$ ns), non-statistique, initié dans l'état excité.

Pour les petits peptides protonés contenant le Tryptophane, des voies de fragmentation spécifiques induites dans l'état excité ont été mises en évidence grâce à la connaissance du nombre d'étapes de fragmentation. Les temps de fragmentation mesurés pour ces canaux ne nous ont pas permis de les différencier des fragmentations produites après conversion interne. On suppose qu'après rupture d'une liaison dans l'état excité, une interaction dipolaire maintient le système sous forme d'un complexe ion-neutre. Si la dissociation complète de ce complexe se produit après conversion interne, cela peut expliquer les longs temps de fragmentation observés. Pour les petits peptides protonés contenant le Tryptophane, nous avons repris le même modèle de transfert d'électron et de proton à l'état excité que celui utilisé pour le Tryptophane protoné isolé [5]. Les fragmentations directes observées sont ainsi expliquées comme des fragmentations issues de l'état excité. D'après ce modèle, adapté aux petits peptides contenant le Tryptophane, l'électron photo-excité de l'indole peut être transféré :

- dans une orbitale de Rydberg localisée sur le cycle aromatique et conduire à la perte de la chaîne latérale aromatique, après transfert de H^+ dans l'état excité et transfert de $H^\bullet$ dans l'état fondamental vers le cycle aromatique
- dans une orbitale de Rydberg localisée sur le NH_3^+ et conduire à la perte de H
- dans une orbitale de Rydberg localisée sur la chaîne peptidique et conduire
  - à la perte de NH_3, si cette orbitale est plutôt localisée sur le NH_3
  - à la perte de la chaîne latérale aromatique ou à la fragmentation de la liaison N-C_α, si cette orbitale est plutôt localisée sur un carbonyle, après transfert d'un H^+ dans l'état excité vers ce carbonyle.

Nous avons montré que ces deux dernières fragmentations en compétition (ruptures C_α-C_β et N-C_α) dépendent de la position du Tryptophane par rapport au carbonyle.

Ces différents mécanismes s'appliquent à des petits peptides contenant le Tryptophane, protonés au niveau de la chaîne peptidique. En revanche, ils ne s'appliquent ni aux peptides protonés sur une chaîne latérale basique, ni aux peptides qui contiennent la Tyrosine.

Pour plusieurs canaux de fragmentation, les mécanismes de photofragmentation UV impliquent un transfert de H^+ dans l'état excité. Pourtant, pour le complexe peptidique Ac–Phe-$(Ala)_5$-$LysH^+$(CE), la perte de la chaîne latérale de la Phénylalanine (rupture C_α-C_β) produite dans l'état excité a été observée alors que l'éther-couronne, *a priori* complexé au site de protonation (ammonium de la Lysine), inhibe les transferts de H^+ [6]. Ceci contredit le mécanisme que nous proposons pour la rupture de la liaison C_α-C_β (transfert d'électron suivi d'un transfert de proton sur le carbonyle). Shemesh *et al.* [7, 8] ont donc proposé un mécanisme alternatif qui s'applique à des peptides d'au moins trois acides aminés formant des liaisons hydrogènes intra-moléculaires, permettant d'expliquer ces observations. Les calculs effectués [7, 8] montrent l'existence d'un état excité $n\pi^*_{CO}$, plus bas en énergie que l'état $\pi\pi^*$. Cet état $n\pi^*_{CO}$ correspond au transfert d'un électron d'une orbitale n, non-liante localisée sur l'azote d'un groupement amide, vers une orbitale π^*_{CO}, anti-liante localisée sur un carbonyle ; l'amide et le carbonyle concernés étant reliés par une liaison hydrogène comme indiqué sur la figure 1. Une intersection conique permet de passer de l'état $n\pi^*_{CO}$ vers un état à transfert de charge. Cet état à transfert de charge induit un transfert de proton du $NH^{\bullet+}$ vers le $CO^{\bullet-}$ grâce à la liaison hydrogène qui les relie (figure 1). Le passage d'une barrière de potentiel dans l'état excité qui conduit à la rupture de cette liaison hydrogène ($N^{\bullet\cdots\cdots}HO\text{-}C^{\bullet}$) éloigne le système de l'intersection conique qui le ferait revenir dans l'état fondamental [6]. La dissipation de l'énergie par redistribution vibrationnelle permet *a priori* de stabiliser cette espèce de nature biradicalaire. De telles espèces très stables, à longue durée de vie, ont déjà été observées [6, 9]. Au bout d'un certain temps, cette espèce biradicalaire peut se fragmenter suivant sa liaison la plus faible, la liaison C_α-C_β.

Quand on augmente la taille d'un peptide, le potentiel d'ionisation de la chaîne peptidique diminue. Pour de petits peptides, après rupture de la liaison C_α-C_β de l'acide aminé aromatique, la charge reste localisée sur le cycle (PI de l'acide aminé aromatique < PI chaîne peptidique), tandis que pour des peptides de plus grande taille, la charge ionique est localisée sur la chaîne peptidique (partie tronquée [6] du peptide de la figure 1). D'après les expériences effectuées par le groupe de T. Rizzo, sur des peptides protonés, le mécanisme de la figure 1 appliqué à une structure de type hélice alpha semble aussi pouvoir s'appliquer à des structures compactes (globulaires) [10]

comme des feuillets bêta telle la gramicidine cyclique S [11]. Les résultats obtenus par le groupe de Dugourd suggèrent un même type de mécanisme pour des polypeptides protonés contenant la Tyrosine [12]. Toutes ces observations indiquent que la fragmentation de la liaison C_α-C_β dépend de la nature de la séquence peptidique et des liaisons intramoléculaires du système étudié. Mais après perte de la chaîne latérale aromatique, les liaisons hydrogènes de la chaîne peptidique sont-elles conservées ? (figure 1)

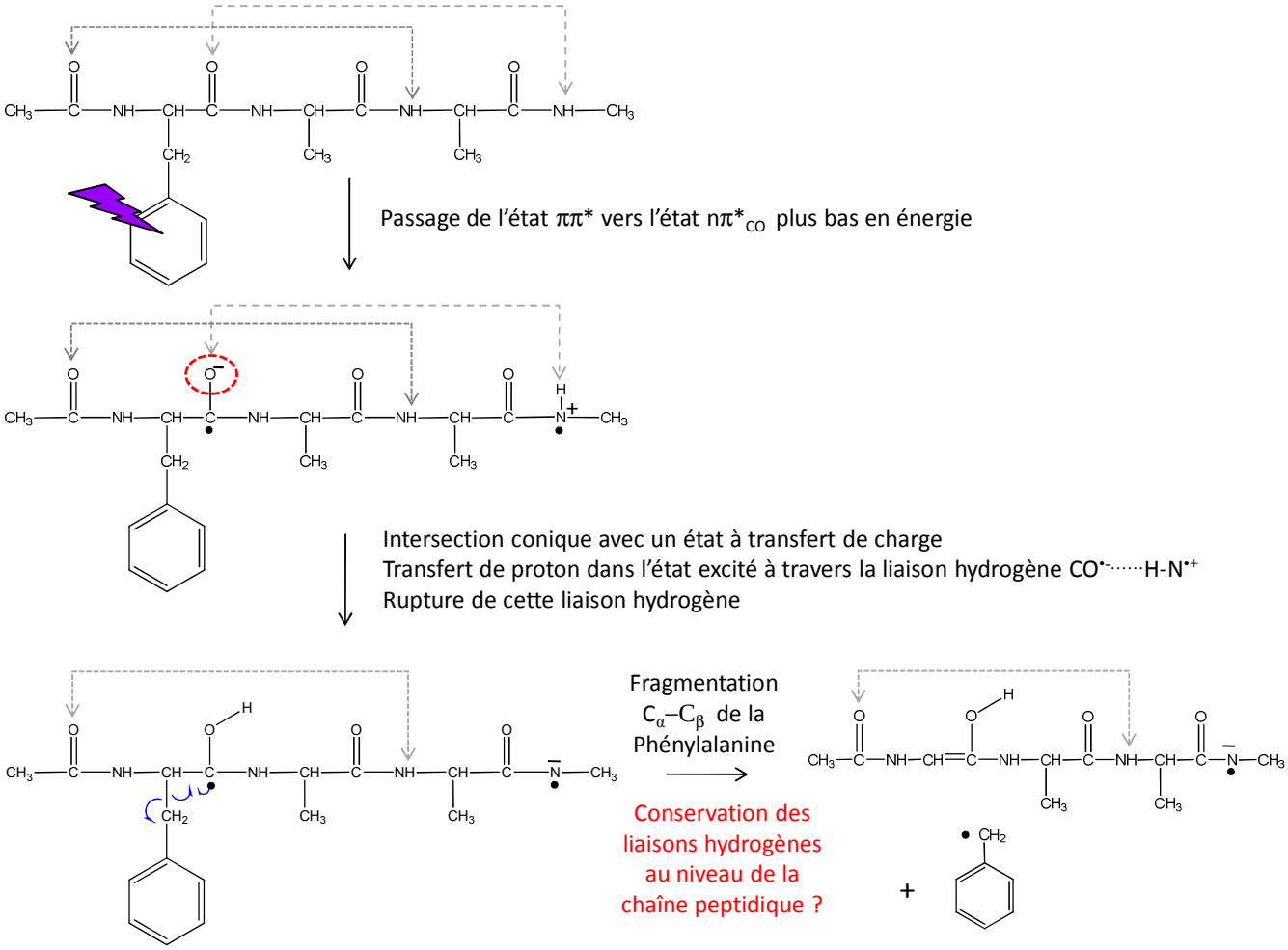


Figure 1 : mécanisme proposé par Shemesh et al. [7, 8] pour le peptide Ac-Phe-Ala-Ala (version tronquée du peptide Ac-Phe-(Ala)$_5$-LysH,$^+$ étudié par le groupe de Rizzo) [6]. Les liaisons hydrogène, à l'origine de la forme d'hélice de ce peptide, sont indiquées en traits gris pointillés.

Le travail présenté dans cette thèse montre la compétition entre la perte de la chaîne latérale du chomophore et la rupture de la liaison N-C_α reliée à l'acide aminé aromatique. Un mécanisme alternatif à celui présenté sur la figure 1 peut donc être proposé (figure 2), où l'état $n\pi^*_{CO}$ impliqué, met en jeu le carbonyle situé du côté C-terminal du chromophore. Notons cependant que

les fragments c/z n'ont jamais été observés en photodissociation UV sur des peptides de grande taille. Le mécanisme proposé sur la figure 2 est donc purement hypothétique.

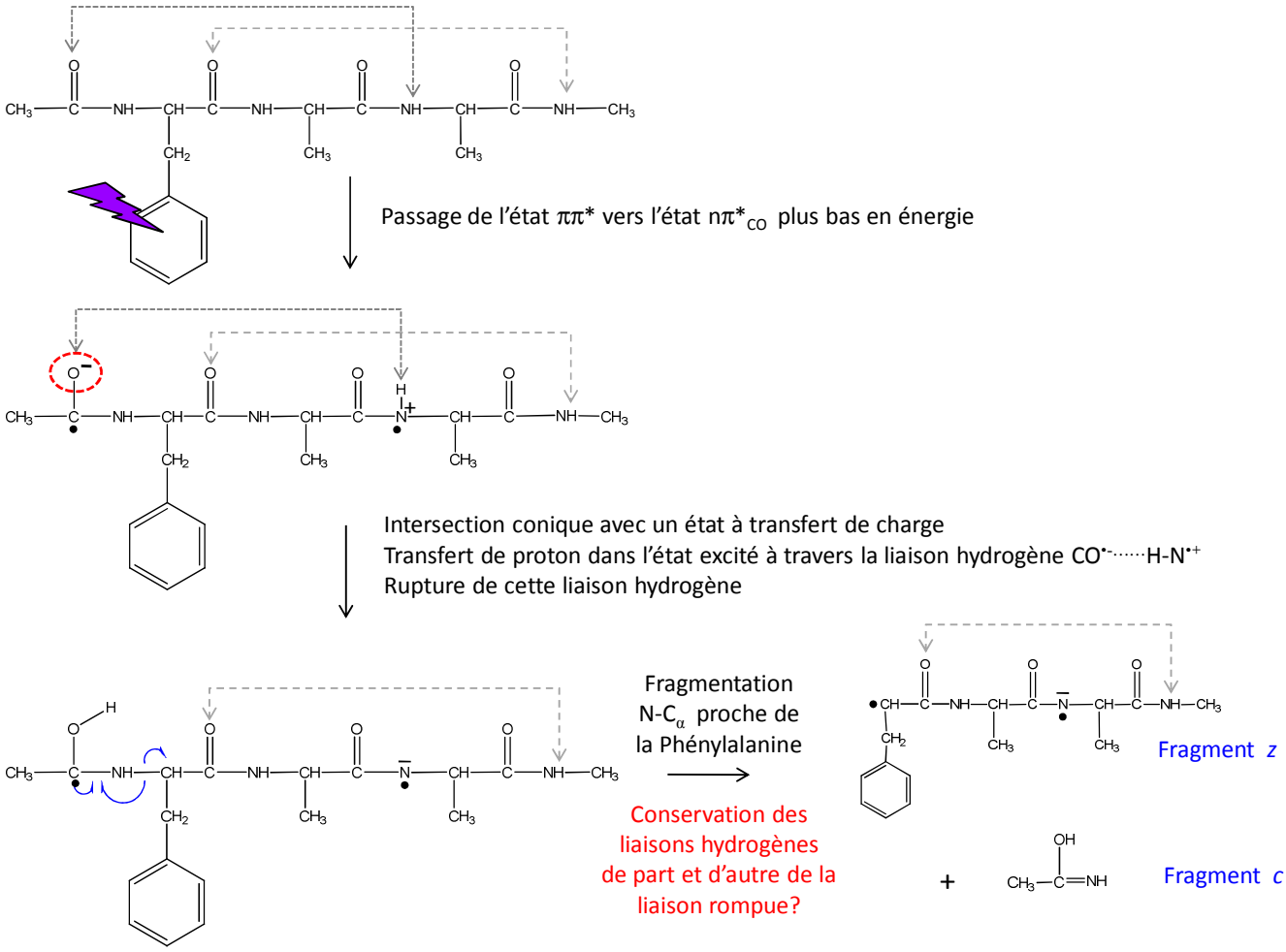


Figure 2 : mécanisme alternatif à celui de la figure 1 conduisant à la production de fragments c / z (mécanisme hypothétique)

Le mécanisme proposé par Shemesh *et al.* [7, 8] résumé sur la figure 1 et le mécanisme proposé sur la figure 2, impliquent des temps de fragmentation très longs dès que les peptides étudiés ont une taille suffisante pour former des liaisons intra-moléculaires. Notre dispositif, plutôt adapté à la mesure des dynamiques rapides, mesurées dans la zone d'interaction polarisée (fenêtre temporelle de 20 à 300 ns), ne permet pas d'étudier de tels systèmes dû à leurs longs temps de fragmentation. Notons cependant que l'étude de systèmes modèles (dipeptides) présentés dans cette thèse nous permet de mieux appréhender les mécanismes de fragmentation de peptides de plus grande taille.

Les peptides à deux chromophores constituent un autre type de système modèle qui pourraient être étudiés avec l'expérience ARC-EN-CIEL. Certaines études, déjà effectuées sur ce type de système, demandent à être approfondies [13, 14]. La principale question est de savoir si un transfert de charge est possible d'un chromophore vers l'autre. Les calculs d'état excité, seuls, ne suffisent pas pour répondre à ce genre de question [13]. Comme nous l'avons montré dans cette thèse, notre dispositif expérimental a aidé à l'interprétation de calculs de l'état excité (problème de l'existence de l'état excité à transfert de charge $\pi\pi^*_{CO}$ du Trp-H^+ [15-18]). Notons cependant que les dernières méthodes développées pour le calculs des états excités ont récemment montré une parfaite reproductibilité des résultats expérimentaux [19]. Aujourd'hui seule la modélisation des états excités à transfert de charge reste encore à améliorer.

Un laser VUV a été installé récemment sur notre dispositif afin d'effectuer les expériences en coïncidence à une autre longueur d'onde (157 nm). Ainsi nous pourrons entre autre tester sur des peptides protonés, sans cycle aromatique, les mécanismes de photofragmentation VUV proposés par Reilly [20, 21]

D'autres modifications de notre dispositif expérimental sont envisagées. Une nouvelle source électrospray va être installée. La principale différence entre cette nouvelle source et la précédente est la présence d'un capillaire métallique chauffant qui devrait permettre de produire des molécules solvatées afin d'étudier leur dynamique de fragmentation [22, 23]. Avec l'installation de ce nouvel électrospray, il est aussi prévu d'améliorer le dispositif de pompage au niveau de la source pour diminuer l'énergie interne des ions étudiés et favoriser ainsi la formation d'agrégats solvatés. Cette nouvelle source sera d'abord utilisée pour des expériences en coïncidence mais il est prévu qu'elle serve également pour effectuer des expériences de type pompe-sonde, avec le laser femto-seconde d'Elyse, aujourd'hui accordable, dans la continuité des expériences réalisées précédemment au sein de l'équipe [15-17]. D'après les mécanismes présentés sur les figures 1 et 2, l'utilisation de lasers pompe et sonde accordables pourrait permettre de contrôler l'état excité peuplé (localisation de l'électron photoexcité sur le carbonyle, soit du côté N-, soit du côté C-terminal du chromophore). On pourrait alors contrôler le type de fragmentation photoinduit (rupture de la liaison N-C_α ou de la liaison C_α-C_β du Trp). Ceci permettrait de différencier par leur dynamique de fragmentation, des conformères qui n'ont pas les mêmes liaisons hydrogènes intra-moléculaires.

Une amélioration est également envisagée au niveau du piège électrostatique afin de pouvoir, comme sur le dispositif d'Aarhus, étudier tous les photofragments ioniques qui ont des longs temps de vie, quelque soit leurs masses.

La combinaison des expériences femto-seconde, de l'irradiation UV dans la zone polarisée et dans le piège électrostatique, permettra de suivre, avec un même dispositif, la dynamique de fragmentation d'un système sur une échelle de temps allant de la centaine de femto-seconde jusqu'à la milliseconde (plus de six ordres de grandeur). Comme les conditions de source et de détection peuvent beaucoup varier d'un appareil à l'autre, il est très intéressant de pouvoir comparer, sur un même dispositif, la dynamique de fragmentation sur plusieurs échelles de temps.

Récemment, des expériences de flash-photolyse (échelle nano-picoseconde) réalisées sur le Tryptophane en solution par Léonard *et al.* [24] ont mis en évidence, en milieu acide, la présence d'un photoproduit, formé par un mécanisme en une étape depuis l'état excité S_1, correspondant au Tryptophane protoné sur l'indole. La dynamique de l'état excité mesurée pour cette expérience en solution (< 100 fs) est la même que celle observée en phase gazeuse, qui conduit à la production de l'ion *m/z* 132 du Trp-H^+ [25]. Les calculs de chimie quantique réalisés dans notre équipe [26] suite aux résultats expérimentaux obtenus sur la photofragmentation du Trp-H^+ en phase gazeuse, ont montré que de l'ion *m/z* 132 (τ < 20 ns) est formé après un transfert de proton vers le cycle aromatique, produit dans l'état excité $\pi\pi^*$, suivi d'un transfert d'hydrogène vers le cycle aromatique, produit dans l'état fondamental après conversion interne. En solution, aucune fragmentation n'est observée après photolyse. Malgré une dynamique de l'état excité semblable à celle observée en phase gazeuse, en phase liquide le réarrangement du solvant est probablement plus rapide que le transfert d'hydrogène dans l'état fondamental, ce qui inhibe la fragmentation de la liaison C_α-C_β.

La connaissance de la dynamique de photofragmentation sur plusieurs échelles de temps peut donc aider à une meilleure compréhension des phénomènes observés en solution, plus proches de la biologie. Il est important de connaitre le devenir de l'énergie (photon UV) déposée dans une biomolécule et de savoir si cette énergie absorbée est dissipée dans le solvant, si cette énergie conduit à des phénomènes radiatifs ou à des phénomènes non-radiatifs. Les phénomènes non-radiatifs, s'ils sont plus rapides que la réorganisation du solvant, peuvent entrainer la

modification irrémédiable de molécules biologiques (peptides, oligonucléotides), d'où l'importance de connaître la dynamique de ces phénomènes.

Bibliographie

1. S.B. Nielsen, J.U. Andersen, J.S. Forster, P. Hvelplund, B. Liu, U.V. Pedersen, S. Tomita, *Photodestruction adenosine 5 '-monophosphate (AMP) nucleotide ions in vacuo: Statistical versus nonstatistical processes.* Phys. Rev. Let., 2003. **91**(4).
2. S.B. Nielsen, T.I. Sølling, *Are Conical Intersections Responsible for the Ultrafast Processes of Adenine, Protonated Adenine, and the Corresponding Nucleosides?* ChemPhysChem, 2005. **6**(7): p. 1276-1281.
3. G. Aravind, R. Antoine, B. Klaerke, J. Lemoine, A. Racaud, D.B. Rahbek, J. Rajput, P. Dugourd, L.H. Andersen, *Sub-microsecond photodissociation pathways of gas phase adenosine 5[prime or minute]-monophosphate nucleotide ions.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(14): p. 3486-3490.
4. J.C. Marcum, A. Halevi, J.M. Weber, *Photodamage to isolated mononucleotides-photodissociation spectra and fragment channels.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. **11**(11): p. 1740-1751.
5. V. Lepere, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, V.J. Picard, C. Jouvet, P. Carcabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, A. Fujii, *Comprehensive characterization of the photodissociation pathways of protonated tryptophan.* J Chem Phys, 2007. **127**(13): p. 134313.
6. M. Guidi, *Thèse.* http://library.epfl.ch/theses/?nr=4573, 2010.
7. D. Shemesh, A.L. Sobolewski, W. Domcke, *Efficient Excited-State Deactivation of the Gly-Phe-Ala Tripeptide via an Electron-Driven Proton-Transfer Process.* Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(4): p. 1374-1375.
8. D. Shemesh, A.L. Sobolewski, W. Domcke, *Role of excited-state hydrogen detachment and hydrogen-transfer processes for the excited-state deactivation of an aromatic dipeptide: N-acetyl tryptophan methyl amide.* Phys Chem Chem Phys, 2010. **12**(19): p. 4899-905.
9. L. Joly, R. Antoine, A.-R. Allouche, P. Dugourd, *Formation and Spectroscopy of a Tryptophan Radical Containing Peptide in the Gas Phase.* Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(42): p. 13832-13833.
10. J.A. Stearns, O.V. Boyarkin, T.R. Rizzo, *Spectroscopic signatures of gas-phase helices: Ac-Phe-(Ala)(5)-Lys-H+ and Ac-Phe-(Ala)(10)-Lys-H+*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(45): p. 13820-+.

11. N.S. Nagornova, T.R. Rizzo, O.V. Boyarkin, *Highly Resolved Spectra of Gas-Phase Gramicidin S: A Benchmark for Peptide Structure Calculations.* Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(12): p. 4040-4041.

12. L. Joly, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, J. Lemoine, *Specific UV photodissociation of tyrosyl-containing peptides in multistage mass spectrometry.* Journal of Mass Spectrometry, 2007. **42**(6): p. 818-824.

13. C. Clavagueira, F. Piuzzi, J.-P. Dognon, *Electronic Spectrum of Tryptophan-Phenylalanine. A Correlated Ab Initio and Time-Dependent Density Functional Theory Study.* The Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(51): p. 16443-16448.

14. E. Gloaguen, H. Valdes, F. Pagliarulo, R. Pollet, B. Tardivel, P. Hobza, F.o. Piuzzi, M. Mons, *Experimental and Theoretical Investigation of the Aromaticâˆ'Aromatic Interaction in Isolated Capped Dipeptidesâ€* The Journal of Physical Chemistry A, 2009. **114**(9): p. 2973-2982.

15. H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, *Control of bond-cleaving reactions of free protonated tryptophan ion by femtosecond laser pulses.* Journal of Physical Chemistry A, 2005. **109**(11): p. 2417-2420.

16. G. Gregoire, H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, C. Desfrancois, D. Onidas, V. Lepere, J.A. Fayeton, *Statistical vs. non-statistical deactivation pathways in the UV photo-fragmentation of protonated tryptophan-leucine dipeptide.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2006. **8**(1): p. 122-128.

17. G. Gregoire, C. Jouvet, C. Dedonder, A.L. Sobolewski, *Ab initio study of the excited-state deactivation pathways of protonated tryptophan and tyrosine.* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(19): p. 6223-6231.

18. B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, M. Perot, C. Jouvet, G. Gregoire, S. Brondsted Nielsen, *Mechanisms of photoinduced Calpha[Single Bond]Cbeta bond breakage in protonated aromatic amino acids.* J Chem Phys, 2008. **128**(16): p. 164302.

19. I. Alata, R. Omidyan, C. Dedonder-Lardeux, M. Broquier, C. Jouvet, *Electronically excited states of protonated aromatic molecules: benzaldehyde.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. **11**(48): p. 11479-11486.

20. J.P. Reilly, *Ultraviolet Photofragmentation of Biomolecular Ions.* Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(3): p. 425-447.

21. L. Zhang, J.P. Reilly, *Radical-Driven Dissociation of Odd-Electron Peptide Radical Ions Produced in 157 nm Photodissociation.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(7): p. 1378-1390.

22. S.R. Mercier, O.V. Boyarkin, A. Kamariotis, M. Guglielmi, I. Tavernelli, M. Cascella, U. Rothlisberger, T.R. Rizzo, *Microsolvation effects on the excited-state dynamics of protonated tryptophan.* Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(51): p. 16938-16943.

23. H. Zettergren, L. Adoui, V. Bernigaud, H. Cederquist, N. Haag, A.I.S. Holm, B.A. Huber, P. Hvelplund, H. Johansson, U. Kadhane, M. Koefoed Larsen, B. Liu, B. Manil, S. Brøndsted Nielsen, S. Panja, J. Rangama, P. Reinhed, H.T. Schmidt, K. Støchkel, *Electron-Capture-Induced Dissociation of Microsolvated Di- and Tripeptide Monocations:*

Elucidation of Fragmentation Channels from Measurements of Negative Ions. ChemPhysChem, 2009. **10**(9-10): p. 1619-1623.

24. J. Leonard, D. Sharma, B. Szafarowicz, K. Torgasin, S. Haacke, *Formation dynamics and nature of tryptophan's primary photoproduct in aqueous solution.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(48): p. 15744-15750.

25. G. Gregoire, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, *UV photoinduced dynamics in protonated aromatic amino acid.* European Physical Journal D, 2009. **51**(1): p. 109-116.

26. V. Lepere, B. Lucas, M. Barat, J.A. Fayeton, Y.J. Picard, C. Jouvet, P. Carcabal, I. Nielsen, C. Dedonder-Lardeux, G. Gregoire, A. Fujii, *Characterization of neutral fragments issued from the photodissociation of protonated tryptophane.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2007. **9**(39): p. 5330-5334.