



HAL
open science

Etude de la stabilité des interactions ioniques en phase gazeuse : application aux complexes biologiques.

Bessem Brahim

► **To cite this version:**

Bessem Brahim. Etude de la stabilité des interactions ioniques en phase gazeuse : application aux complexes biologiques.. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066016 . tel-00978816

HAL Id: tel-00978816

<https://theses.hal.science/tel-00978816v1>

Submitted on 14 Apr 2014

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

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



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Chimie Analytique

Ecole Doctorale de Chimie Moléculaire de Paris centre (ED406)

Présentée par

M. Bessem BRAHIM

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Etude de la stabilité des interactions ioniques en phase gazeuse : application aux complexes biologiques

soutenue le 28 janvier 2014

devant le jury composé de :

M. Jean-Claude TABET	Directeur de thèse
M. Guillaume van der REST	Rapporteur
Mme. Emmanuelle LEIZE-WAGNER	Rapporteur
M. David TOUBOUL	Examineur
M. François FENAILLE	Examineur
M. Bernold HASENKNOPF	Examineur
Mme. Sandra ALVES	Membre invitée

à mon père, le Dr. Taieb BRAHIM,

à ma famille, et à mes amis,

Remerciements

Je remercie Mme. Emmanuelle LEIZE-WAGNER et M. Guillaume van der REST pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit de thèse. Je tiens également à remercier M. David TOUBOUL, M. Bernold HASENKNOPF et M. François FENAILLE pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse en qualité d'examineurs.

Je souhaite ensuite remercier M. Jean-Claude TABET pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ma thèse de doctorat au sein de l'Equipe de Chimie Structurale Organique et Biologique de l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire. Je lui témoigne ma plus grande gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée et pour les moments mémorables que nous avons partagés lors de discussions passionnantes (scientifiques ou non). Je remercie Mme. Sandra ALVES pour m'avoir encadré durant ces trois dernières années et notamment pour la grande patience dont elle a fait preuve pour suivre et recadrer mes raisonnements parfois alambiqués.

Je remercie également Sanofi et le CEA pour leurs financements qui m'ont permis de réaliser ce projet passionnant.

Je remercie tous les doctorants côtoyés au laboratoire durant la réalisation de ce projet (*i.e.*, Ludovic, Chafia, Viet, Baiyi, Farid, Ljubica, Natali, Sarah, Cécile, Adrian, Xiahua, Quentin et Jean) pour tous les moments (tant d'apprentissage que de détente) passés ensemble.

Je remercie également tous les permanents (Richard, Denis, Héloïse, Philippe, Claude, Hristo, Estelle et Dalila) pour leur participation ou leur aide plus générale à mes travaux de recherche. Je remercie Maria pour sa gestion administrative exceptionnelle et pour son sourire qui a ensoleillé les jours les plus sombres de la réalisation de ce projet. Je remercie aussi Anna pour sa participation à la résolution de problèmes tant administratifs que scientifiques.

Je souhaite particulièrement remercier la Société Française de Spectrométrie de Masse pour m'avoir attribué une bourse « Jeune chercheur » m'ayant permis de participer à mon premier congrès national. Je remercie aussi son Club Jeune pour les nombreuses rencontres (et discussions associées) avec des spécialistes et de plus jeunes chercheurs, lors des trois écoles de printemps auxquelles j'ai pu participer. Elles m'ont donné l'occasion de renforcer mes connaissances en spectrométrie de masse.

Je remercie aussi tous mes proches (famille et amis) pour leur soutien et leur patience pendant la réalisation de ce projet, et notamment, durant la rédaction de ce manuscrit. Enfin je remercie mon père pour m'avoir laissé comme dernière consigne d'aller le plus loin possible dans mes études ; c'est chose faite !

Liste des communications scientifiques

Liste des congrès scientifiques nationaux et internationaux

- 04 - 09 avril 2011 *Ecole de printemps*, XVIe rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse (Pissos)
- 19 - 22 septembre 2011 *Spectrométrie de Masse & Analyse Protéomique*, congrès de la Société Française de Spectrométrie de Masse (Avignon)
- Intervention orale (lors de la demi-journée du Club Jeune) intitulée : « Influence of salt-bridge interactions in the gas-phase peptide/DNA complex fragmentation ».
 - Présentation d'un poster intitulé : « Influence of salt-bridge interactions in the gas-phase peptide/DNA complex stability ».
- 02 - 06 avril 2012 *Ecole de printemps*, XVIIe rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse (La Bresse)
- Intervention orale intitulée : « Signal Enhancement of Non-Covalent Peptide/DNA Complexes in Gas Phase Using Supercharging Reagent ».
- 20 - 24 mai 2012 *60th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, congrès de l'American Society of Mass Spectrometry (Vancouver)
- Présentation d'un poster intitulé : « Signal and Charge Enhancement of DNA Single Strands in Negative Electrospray Ionization using the Supercharging Reagent meta-Nitrobenzylalcohol ».
- 08 - 12 avril 2012 *Ecole de printemps*, XVIIIe rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse (Izeste)
- Intervention orale intitulée : « Signal and Charge Enhancement of DNA Single Strands in Negative Electrospray Ionization using the Supercharging Reagent meta-Nitrobenzylalcohol ».

Liste des publications scientifiques

B. Brahim, S. Alves, R. B. Cole, J.-C. Tabet ; Charge Enhancement of Single-Stranded DNA in Negative Electrospray Ionization Using the Supercharging Reagent Meta-nitrobenzyl Alcohol. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2013**, 24(12), 1988-1996 (DOI 10.1007/s13361-013-0732-8)

B. Brahim, S. Alves, J.-C. Tabet ; Positive and Negative Ion Mode Comparison for the Determination of DNA/Peptide Non-covalent Binding Sites. (*Submitted*) **2013**

Liste des abréviations

<i>ACTH</i>	adrénocorticotrophine
<i>ADN</i>	acide β -D-2'-désoxyribonucléique
<i>ATT</i>	6-aza-2-thiothymine
<i>API</i>	ionisation à pression atmosphérique (pour <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>)
<i>BIRD</i>	dissociations induites par radiation infrarouge d'un corps noir (pour <i>Blackbody Infrared Radiative Dissociation</i>)
<i>Bz-Pyr</i>	sel de benzyl-pyridinium
<i>pMe-Bz-Pyr</i>	<i>para</i> -methyl-benzyl-pyridinium
<i>pNO₂-Bz-Pyr</i>	<i>para</i> -nitro-benzyl-pyridinium
<i>pOMe-Bz-Pyr</i>	<i>para</i> -methoxy-benzyl-pyridinium
<i>CAD</i>	décompositions activées par collision (pour <i>Collision-Activated Decomposition</i>)
<i>CHCA</i>	acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique
<i>CEC_{1%}</i>	coefficient d'augmentation de charges (pour <i>Charge Enhancement Coefficient at 1% of mNBA</i>)
<i>CID</i>	dissociation induite par collision (pour <i>Collision-Induced Dissociation</i>)
<i>CRM</i>	modèle du résidu chargé (pour <i>Charged Residu Model</i>)
<i>DART</i>	analyse directe en temps réel (pour <i>Direct Analysis in Real Time</i>)
<i>DESI</i>	l'ionisation par désorption à électro-nébulisation (pour <i>Desorption ElectroSpray Ionization</i>)
<i>DBD</i>	domaine de reconnaissance de l'ADN (pour <i>DNA-Binding Domain</i>)
<i>DHB</i>	acide 2,5-dihydroxy-benzoïque
<i>ssDNA</i>	simple brin d'ADN (pour <i>single-stranded DNA</i>)
<i>dsDNA</i>	brins doubles d'ADN (pour <i>double-stranded DNA</i>)
<i>E_{int}</i>	énergie interne

$\rho(E)$	distribution d'énergie interne
E_0	énergie critique de dissociation des ions précurseurs
E_{app}	énergie d'apparition des ions fragments
<i>EASI</i>	ionisation ambiante par spray sonore (pour <i>Easy Ambient Sonic-spray Ionization</i>)
<i>ECD</i>	dissociation par capture d'électron (pour <i>Electron Capture Dissociation</i>)
<i>EDD</i>	dissociation par détachement d'électron (pour <i>Electron Detachment Dissociation</i>)
<i>ESI</i>	ionisation par électro-nébulisation (pour <i>ElectroSpray Ionization</i>)
<i>ETD</i>	dissociation par transfert d'électron (pour <i>Electron Transfer Dissociation</i>)
<i>FAB</i>	bombardement d'atomes rapides (pour <i>Fast Atom Bombardment</i>)
<i>FIDI</i>	ionisation de gouttelettes induite par champ (pour <i>Field-Induced Droplet Ionization</i>)
ΔG°	variation d'enthalpie libre standard
ΔG°_{acid}	variation d'enthalpie libre standard de déprotonation (ou acidité en phase gazeuse)
$\Delta^\circ G_{acid,app}$	variation d'enthalpie libre standard apparente de déprotonation
<i>GB</i>	variation d'enthalpie libre standard de protonation (ou basicité en phase gazeuse)
GB_{int}	valeur intrinsèque de GB de la molécule considérée
GB_{app}	variation d'enthalpie libre standard apparente de protonation
<i>HBI</i>	interactions de type liaison hydrogène (pour <i>Hydrogen Bond Interactions</i>)
<i>3-HPA</i>	acide 3-hydroxy-picolinique
<i>HTH</i>	motif « hélice-virage-hélice » (pour <i>Helix-Turn-Helix</i>)
I_{tot}	intensité totale du signal
<i>IEM</i>	modèle de l'évaporation ionique (pour <i>Ion Evaporation Model</i>)
<i>IR</i>	infrarouge
<i>IRPMD</i>	dissociations induites par plusieurs photons infrarouges (pour <i>InfraRed MultiPhoton Dissociation</i>)

K_D	coefficients de dissociation
KS	déplacement cinétique (pour <i>Kinetic Shift</i>)
LZ	motif « glissière à Leucine » (pour <i>Leucine-Zipper</i>)
$MALDI$	ionisation par désorption laser assistée par matrice (pour <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MS	spectrométrie de masse (pour <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	spectrométrie de masse « en tandem »
M_w	masse molaire (pour <i>Molecular weight</i>)
m/z	rapport masse sur charge
$(m/z)_m$	rapport masse sur charge du pic mono-isotopique
NAD	base de données des acides nucléiques (pour <i>Nucleic Acid Database</i>)
$mNBA$	<i>meta</i> -nitrobenzyl alcool
NCI	interactions non-covalentes (pour <i>Non-Covalent Interactions</i>)
NCX	complexes non-covalents (pour <i>Non-Covalent complexes</i>)
NH_4^+	cation ammonium
PDB	banque de donnée des protéines (pour <i>Protein Data Bank</i>)
R^2	coefficient de corrélation
RMN	résonance magnétique nucléaire
RR	dissociation par réarrangement
RS	dissociation par rupture simple
RSD	écarts types relatifs (pour <i>Relative Standard Deviation</i>)
SA	acide 3,5-dimethoxy-4 hydroxy-cinnamique (pour <i>Sinapinic Acid</i>)
SBI	interactions de type pont salin (pour <i>Salt Bridge Interactions</i>)
$SER_{1\%}$	rapport d'amélioration du signal à 1% de <i>mNBA</i> (pour <i>Signal Enhancement Ratio at 1% of mNBA</i>)

<i>SID</i>	dissociations induites par collision sur une surface (pour <i>Surface-Induced Dissociation</i>)
<i>SLD</i>	désorption laser de surface (pour <i>Surface Laser Desorption</i>)
<i>SSI</i>	ionisation par spray sonique (pour <i>Sonic-Spray Ionization</i>)
<i>SV-EASI</i>	V-EASI Spartiate (pour <i>Spartan V-EASI</i>)
<i>SWAN</i>	ionisation par nébulisation acoustique de surface (pour <i>Surface Acoustic Wave Nebulization</i>)
<i>SY</i>	taux d'ions survivants (pour <i>Survival Yield</i>)
<i>2,4,6-THAP</i>	2,4,6-trihydroxy-acetophenone
<i>TSI</i>	ionisation par spray thermique (pour <i>ThermoSpray Ionization</i>)
<i>UV</i>	ultra-violet
<i>V-EASI</i>	ionisation ambiante par spray sonique à pompage Venturi (pour <i>Venturi Easy Ambient Sonic-spray Ionization</i>)
z_{avg}	état de charge moyen
z_{high}	plus haut état de charge observé
z_{low}	plus bas état de charge observé
z_{max}	l'état de charge maximum potentiel
z_{mode}	état de charge ayant le plus grand effectif
<i>ZF</i>	motif « doigt de zinc » (pour <i>Zinc Finger</i>)

Sommaire

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION GENERALE	21
<u>CHAPITRE 1 :</u>	
Les complexes biologiques non-covalents	25
I. Les interactions non-covalentes impliquées dans la stabilisation de complexes biologiques ..	25
I. 1. Les interactions électrostatiques	26
I. 1. a. Les forces coulombiennes	26
I. 1. b. Les liaisons hydrogènes	27
I. 1. c. Les forces de van der Waals	28
I. 2. Les interactions π	29
I. 3. L'effet hydrophobe	29
II. Les complexes non-covalents biologiques	30
II. 1. Structure des protéines et des peptides en solution	30
II. 1. a. Les acides aminés	30
II. 1. b. La liaison peptidique	32
II. 1. c. Conformations des protéines	33
II. 1. d. Stabilité des protéines	34
II. 2. Structure des brins d'ADN en solution	35
II. 2. a. Nucléotides, nucléosides et bases nucléiques	35
II. 2. b. La liaison phospho-diester	37
II. 2. c. Conformations des brins d'ADN	38
II. 2. d. Stabilité des brins d'ADN	43
II. 3. Les complexes non-covalents ADN-protéine en solution	44
II. 3. a. Etude moléculaire des interactions ADN/protéines	45
II. 3. b. Exemples de structures de complexes ADN/protéines	49

CHAPITRE 2 :

La détection par spectrométrie de masse des complexes non-covalents ADN/protéine	53
I. La désorption/ionisation sous vide des complexes biologiques non-covalents	55
II. La désorption/ionisation à pression atmosphérique par électro-nébulisation	56
II. 1. Production des ions en phase gazeuse	57
II. 1. a. Formation des gouttelettes multichargées	57
II. 1. b. Evaporations et fissions successives des gouttelettes	59
II. 1. c. Modèles de production des agrégats chargés	61
II. 2. Désolvatation des agrégats chargés en phase gazeuse	64
II. 2. a. Conséquences de la désolvatation en phase gazeuse sur le choix des grandeurs thermodynamiques utilisées	64
II. 2. b. Exemples d'échelles de basicité et d'acidité en phase gazeuse	66
II. 2. c. Cas de la n-ième (dé)protonation d'une molécule déjà chargée	68
II. 3. Application aux complexes biologiques non-covalents	70
III. Exemples d'études MS de complexes ADN/protéine	71
III. 1. Exemples d'études par MALDI-MS	71
III. 2. Exemples d'études par ESI-MS	74

CHAPITRE 3 :

Influence des agents de « superchargement » lors des processus de désolvatation des agrégats chargés	81
I. Les valeurs descriptives de l'intensité des signaux et des états de charge	85
I. 1. Les variations d'intensité du signal	85
I. 1. a. Valeurs descriptives de l'intensité du signal	85
I. 1. b. Introduction de la SER_{1%}	86
I. 2. Les variations d'états de charge	87
I. 2. a. Valeurs descriptives de l'état de charge	87
I. 2. b. Introduction de la CEC_{1%}	88
II. Influence du <i>m</i>NBA sur les processus de désorption/ionisation par ESI(+)	89
II. 1. Variations observées pour les peptides	89
II. 2. Variations observées pour les complexes non-covalents	92
II. 2. a. Influence de la présence de l'oligonucléotide sur l'action de <i>m</i>NBA ...	92

II. 2. b. Influence de la présence de <i>m</i> NBA sur les voies de fragmentation	95
III. Influence du <i>m</i> NBA sur les processus de désorption/ionisation par ESI(-)	96
III. 1. Variations observées pour les oligonucléotides	97
III. 2. Variations observées pour les complexes non-covalents	101
III. 2. a. Influence de la présence du peptide sur l'action de <i>m</i> NBA	101
III. 2. b. Influence de la présence de <i>m</i> NBA sur les voies de fragmentation ...	103
IV. Modèle proposé pour la désolvatation des agrégats chargés	105
IV. 1. Dépendance du modèle vis-à-vis de la polarité	105
IV. 2. Modèle de désolvatation existant pour les protéines protonées	107
IV. 3. Modèle de désolvatation proposé pour les oligonucléotides déprotonés	108
IV. 3. a. Cas des plus longs brins d'ADN (12-mer)	109
IV. 3. b. Cas des brins d'ADN plus courts (6-mer)	111
IV. 4. Cas particuliers des complexes non-covalents ADN/peptide	112
V. Conclusion	114

CHAPITRE 4 :

Conception d'une source sans hautes tensions ; le V-EASI	117
I. Description de la source V-EASI	120
I. 1. Description de l'effet Venturi	120
I. 2. Description de la source V-EASI dans la littérature	121
I. 3. Conception d'une source V-EASI	122
II. Etude énergétique des ions produits par la source V-EASI	124
II. 1. Notion de distribution d'énergie interne	124
II. 2. Origines de la distribution d'énergie interne des ions en phase gazeuse	125
II. 3. Molécules thermomètres : Les sels de benzyl-pyridiniums substitués	127
II. 4. Calcul du taux d'ions survivants	129
II. 5. Comparaison énergétique des sources ESI et V-EASI	129
III. Applications du V-EASI aux complexes non-covalents	134
III. 1. La désorption/ionisation de complexes métal/ligands organiques	134
III. 2. La désorption/ionisation des complexes biologiques non-covalents	136
III. 3. Le super-chargement de simples brins d'ADN par V-EASI	138
IV. Conclusion	141

CHAPITRE 5 :

Comportement des complexes biologiques non-covalents lors de leur activation en phase gazeuse	143
I. Méthodes d'activation usuelles des ions en phase gazeuse	143
I. 1. Méthodes d'activation « par chauffage »	144
I. 2. Méthodes d'activation par neutralisation de charge(s)	147
I. 3. Nomenclature des ions fragments	150
I. 3. a. Fragmentation des peptides en phase gazeuse	150
I. 3. b. Fragmentation des brins d'ADN en phase gazeuse	151
II. Fragmentations des complexes biologiques « par chauffage »	154
II. 1. Comportement des complexes « peptide/oligonucléotide »	154
II. 1. a. Influence de la basicité en phase gazeuse du peptide	155
II. 1. b. Influence de la séquence de l'oligonucléotide	156
II. 1. c. Localisation des interactions ioniques <i>via</i> la production d'ions fragments non-covalents « à trois corps »	160
II. 1. d. Influence de la taille du peptide sur la production d'ions fragments non-covalents « à trois corps »	160
II. 1. e. Influence de l'état de charge du complexe sur la production d'ions fragments non-covalents « à trois corps »	162
II. 1. f. Conclusion	162
II. 2. Comportement des complexes « peptide/duplex »	163
II. 3. Comportement des complexes « peptide/oligonucléotide/peptide »	166
III. Fragmentation des complexes biologiques par neutralisation de charge(s)	170
III. 1. Comportement des complexes « peptide/oligonucléotide »	170
III. 2. Comportement des complexes « peptide/oligonucléotide/peptide »	172
IV. Conclusion	176
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	179
ANNEXES	185

Introduction générale

Les interactions non-covalentes (*NCI* pour *Non-Covalent Interactions*) stabilisant les complexes non-covalents biologiques (*NCX* pour *Non-Covalent complexes*) régissent la majorité des processus cellulaires indispensables au développement et au bon fonctionnement de tout organisme vivant (hormis certains virus). Toutes les fonctions de l'ADN, telles que son conditionnement, sa réplication et la régulation de son expression, sont permises par la formation et la dissociation de *NCI* avec des protéines¹.

La compréhension des bases de ces processus cellulaires de l'ADN au niveau moléculaire est un sujet d'actualité et d'une importance fondamentale. C'est pourquoi R. D. Kornberg a reçu le Prix Nobel de Chimie en 2006 pour ses études sur les bases moléculaires de la transcription eucaryote². Les protéines se liant à l'ADN peuvent avoir une reconnaissance spécifique à une séquence d'ADN, *e.g.* (i) les protéines de régulation qui initient et/ou contrôlent la transcription, (ii) les enzymes de restriction qui coupent spécifiquement une séquence d'ADN particulière, (iii) les protéines de réparation qui identifient une lésion et retirent la séquence endommagée. Certaines protéines, comme les ADN topo-isomérases, peuvent dérouler l'ADN pour amorcer la réplication, et d'autres, comme les histones, sont impliquées dans la condensation et le stockage de l'ADN en nucléosomes. Enfin certaines protéines, comme les ADN polymérases, se lient sans spécificité de séquence et utilisent l'ADN comme modèle pour la synthèse d'acides nucléiques³. Des études sur le séquençage et l'analyse du génome humain ont estimé que près de 13% du génome humain (≈ 4000 gènes) encodent des protéines se liant aux acides nucléiques^{4,5}. Depuis 2007, plus de 1700 structures de *NCX* acide nucléique/protéine (dont près de 1200 du type ADN/protéine) sont connues et disponibles sur la banque de données des protéines (*PDB* pour *Protein Data Bank*) *i.e.*, près de 10 fois plus de structures qu'en 1996⁶. La cristallographie à

¹ V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, J. I. Tinoco ; *Nucleic Acids, Structures, Properties, and Functions*. University Science Book (Sausalito CA), **1999**.

² H. Boeger, D. A. Bushnell, R. Davis, J. Griesenbeck, Y. Lorch, J. S. Strattan, K. D. Westover, K. D. Kornberg ; Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS. Lett.*, **2005**, 579, 899–903.

³ S. Neidle ; *Nucleic Structure and Recognition*. Oxford University Press (Oxford), **2002**.

⁴ International Human Genome Sequencing Consortium ; Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, **2001**, 409, 860–921.

⁵ J. C. Venter et al. ; The sequence of the human genome, *Science*, **2001**, 291, 1304–1351.

⁶ H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne ; The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 235–242.

Introduction générale

rayon X et la résonance magnétique nucléaire (*RMN*) ont fourni la majorité de ces structures à haute résolution. Les structures obtenues sont extrêmement détaillées, cependant le manque d'homogénéité, les quantités insuffisantes d'échantillon et/ou l'impossibilité de cristallisation empêchent la caractérisation de certains NCX. Bien que notre compréhension des NCI entre ADN et protéines ait rapidement grandi ces dernières années, elle reste loin d'être complète.

Des informations essentielles peuvent être obtenues par spectrométrie de masse (*MS* pour *Mass Spectrometry*) qui joue un rôle de plus en plus important dans ce domaine^{7,8}. Outre la grande efficacité de cette méthode qui provient de la combinaison unique entre la haute sensibilité, la sélectivité et la rapidité (« les 3 S distinctifs de la MS » selon McLafferty pour *high Sensibility, Selectivity and Speed*), la MS permet l'observation directe de brins d'ADN (simples ou doubles), de protéines, de peptides et de leurs NCX respectifs, fournissant ainsi des informations sur la (ou les) stœchiométrie(s) d'appariement(s), sur la nature des ligands et sur les énergies relatives d'appariement. La nécessité de la présence d'un cofacteur spécifique au sein d'un NCX, tel qu'une petite molécule ou un cation métallique, peut être mise en évidence plus facilement et plus rapidement par MS que par d'autres méthodes. La MS permet aussi l'identification de petites modifications chimiques de l'un des partenaires du NCX. L'étude de NCX biologique par MS nécessite une instrumentation appropriée *i.e.*, une source d'ionisation suffisamment douce (pour conserver la majorité des NCI) associée à un analyseur ayant une gamme de rapport m/z adaptée à ces larges ensembles d'entités moléculaire. Des difficultés expérimentales peuvent apparaître et sont liées aux problèmes de solubilisation de certains NCX et au choix limité de tampons compatibles avec la MS. De nombreuses études ont montré qu'un choix réfléchi des conditions expérimentales permet le maintien des interactions faibles stabilisant les NCX pendant leur transfert de la solution à la phase gazeuse.

Malgré son succès et la technologie avancée déjà mise en œuvre, le développement de nouveaux concepts d'ionisation et d'activation implémentent perpétuellement la MS. Les travaux de thèse présentés à travers ce manuscrit ont pour objectif de vérifier l'intérêt de ces nouveaux concepts à l'étude de la stabilité des NCI maintenant les NCX biologiques.

⁷ C. L. Hanson, C. V. Robinson ; Protein–nucleic acid interactions and the expanding role of mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 24907–24910.

⁸ F. Rusconi, F. Guillonnet, D. Praseuth ; Contributions of mass spectrometry in the study of nucleic acid-binding proteins and of nucleic acid–protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.*, **2002**, 21, 305–348.

Dans un premier chapitre, les bases nécessaires à la compréhension des études menées seront introduites. Ainsi, les NCI, les polymères biologiques étudiés et leurs NCX seront décrits et utilisés pour comparer les méthodes permettant leurs études en solution.

Dans le chapitre suivant, les méthodes de désorption/ionisation permettant le transfert en phase gazeuse de NCX biologiques seront introduites et amorceront une description d'études de NCX biologiques en phase gazeuse.

Dans le troisième chapitre, la jeune histoire des agents de « superchargement » utilisés par ESI (*pour ElectroSpray Ionization*) en mode positif afin d'augmenter l'état de charge de protéines et de peptides sera relatée et l'influence de leur présence lors des processus de désolvation des agrégats produits en ESI sera examinée, en mode positif et en mode négatif, pour des peptides, des oligonucléotides et pour des NCX « peptide/oligonucléotide ». Par ailleurs, la partie de cette étude concernant le processus de « superchargement » des oligonucléotides par ESI en mode négatif a été publiée dans le *Journal of American Society of Mass Spectrometry*.

Dans le chapitre suivant, les sources d'ionisation « dites ambiantes » seront aussi introduites et la conception d'une source V-EASI (*pour Venturi Easy Ambient Sonic-spray Ionization*) permettant l'aspiration libre de la solution et la désorption/ionisation des analytes à partir du spray formé par la seule vitesse du gaz porteur sera grandement détaillée. La source V-EASI construite au laboratoire sera comparée énergétiquement à une source ESI (étude originale), puis sera utilisée pour étudier le transfert de NCX de la solution vers la phase gazeuse en l'absence de fort champ électrique.

Dans le dernier chapitre, les voies de fragmentations des différentes populations d'ions seront comparées afin d'examiner les NCI stabilisant les NCX biologiques en phase gazeuse. Ainsi, de brèves descriptions des méthodes d'activation des ions en phase gazeuse par spectrométrie de masse en tandem et de la nomenclature des ions fragments résultant de l'activation de nos polymères biologiques seront faites afin de permettre (i) la comparaison des voies de fragmentations observées, en mode positif ou en mode négatif, pour les différents NCX biologiques activés par CID (*pour Collision-Induced Dissociation*) et, (ii) l'étude de la stabilité des NCX biologiques vis-à-vis de la capture d'électrons.

Introduction générale

CHAPITRE 1 : Les complexes biologiques non-covalents

I. Les interactions non-covalentes impliquées dans la stabilisation de complexes biologiques

Les interactions non-covalentes ont un rôle fondamental dans l'agencement structural des complexes biologiques. Bien que ces interactions impliquent en solution des énergies bien plus faibles (inférieur à 100 kJ/mol) que les liaisons covalentes (de 200 à 800 kJ/mol)¹, elles sont à l'origine de la formation réversible de structures secondaires, tertiaires² (*i.e.*, interactions intramoléculaires régissant la conformation tridimensionnelle de chacun des partenaires) et quaternaires³ (*i.e.*, interactions intermoléculaires régissant l'appariement de partenaires) de tous complexes biologiques, modulant ainsi leurs activités et leurs localisations au sein de l'organisme, donc leurs fonctions biologiques. D'ailleurs, l'étude des interactions non-covalentes a conduit à une meilleure compréhension de différents systèmes biologiques et de leurs réactivités respectives. Parmi les systèmes les plus étudiés figurent : (i) les complexes engageant deux partenaires biologiques ; ADN/ADN (duplex⁴, triplex⁵ et quadruplex⁶), ADN/protéines⁷, ou ARN(transfert ou messenger)/protéines, et protéines/protéines⁸ impliquées, par exemple, dans les différentes étapes de la réplication de l'ADN et de la régulation de l'expression des gènes, (ii) les complexes biologiques engageant (en plus) un partenaire inorganique ; ADN/métal⁹ ou

¹ CRC Handbook of Chemistry and Physics. In [Online] 89th ed.; Lide D.R., Ed. 2008-2009.

² T. R. Cech, S. H. Damberger, R. R. Gutell ; Representation of the secondary and tertiary structure of group I introns. *Structural Biology*, **1994**, 1(5), 273-280.

³ R. Z.-T. Luo, D. R. Beniac, A. Fernandes, C. C. Yip, F. P. Ottensmeyer ; Quaternary Structure of the Insulin-Insulin receptor complex. *Science*, **1999**, 285, 1077-1080.

⁴ a) J. D. Watson, F. H. C. Crick ; Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, **1953**, 171, 737-738. b) J. D. Watson, F. H. C. Crick ; Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, **1953**, 171, 964-967.

⁵ M. D. Frank-Kamenetskii, S. M. Mirkin ; Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.*, **1995**, 64, 65-95.

⁶ a) F. W. Smith, J. Feigon ; Quadruplex structure of Oxyticha telomeric DNA oligonucleotides. *Nature*, **1992**, 356, 164-168. b) G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neldel ; Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*, **2002**, 417, 876-880.

⁷ a) H.-M. Jantzen, A. Admon, S. P. Bell, R. Tjian ; Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature*, **1990**, 344, 830-836. b) H.-M. Wu, D. M. Crothers ; The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature*, **1984**, 308, 509-513.

⁸ S. Fields, O. Song, A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **1989**, 340, 245-246.

⁹ E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph ; DNA-template assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. *Nature*, **1998**, 391, 775-778.

CHAPITRE 1 :

protéine/métal¹⁰, et (iii) les complexes biologiques engageant un partenaire organique (synthétique, artificiel ou naturel) ; ADN/médicament¹¹ ou protéine/médicament, et ADN/toxine ou protéine/toxine impliqués dans les différentes étapes de régénération et de dégradation de l'organisme.

I. 1. Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques engagent deux partenaires *i.e.*, atomes ou fonctions chimiques, chargés ou partiellement chargés respectivement appelés ion et dipôles¹². Ces interactions regroupent (i) les forces coulombiennes de type ion-ion, ion-dipôle ou ion-dipôle induit, (ii) les forces de van der Waals qui sont majoritairement de type dipôle-dipôle, et (iii) les interactions de type π staking (cas particulier de dipôle-dipôle discuté séparément).

I. 1. a. Les forces coulombiennes

Les forces coulombiennes décrivent initialement les interactions ion-ion répondant à la loi de Coulomb (**Equation 1-1**).

$$\text{(Eq. 1-1)} \quad E = \frac{q_1 q_2}{4\pi \varepsilon r_{1,2}}$$

La nature de l'interaction (répulsive ou attractive) dépend de la similitude ou de la différence de polarité des sites d'interaction de chacun des partenaires (**Figure 1-1**). La force d'interaction dépend de la quantité de charge et de la taille du système *i.e.*, la charge portée par chacun des partenaires (q_1 et q_2 dans l'**Equation 1-1**) et la distance qui les séparent ($r_{1,2}$ dans l'**Equation 1-1**). Notons que l'effet d'écrantage des charges par le milieu, qui disparaît en phase gazeuse et à faible pression (permittivité du milieu $\varepsilon \approx \varepsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$) *i.e.*, dans le vide partiel des instruments de spectrométrie de masse, est

¹⁰ D. R. Brown, K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P. E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohloen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway, H. Kretzschmar ; The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, **1997**, 390, 684-687.

¹¹ G. J. Quigley, A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich ; Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: Daunomycin plus d(CpGpTpApCpG). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 7204-7208.

¹² K. A. Sharp, B. Honig ; Electrostatic interactions in macromolecules: theory and applications. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **1990**, 19, 301-332.

loin d'être négligeable en phase liquide ce qui contribue à diminuer l'intensité de ces interactions.

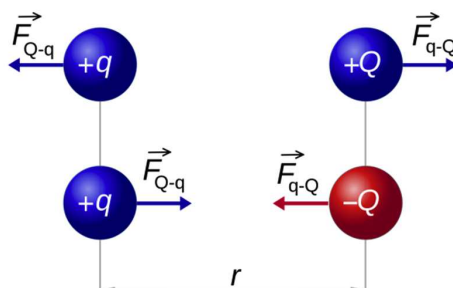


Figure 1-1. Exemple d'interactions Coulombienne répulsive (en haut) ou attractive (en bas)¹³.

Dans le cas des interactions ion-dipôle et ion-dipôle induit, la loi de Coulomb s'applique toujours. Cependant, une correction du facteur régissant l'influence de la taille du système est nécessaire et les interactions de type ion-dipôle et ion-dipôle induit varient respectivement en fonction de r^{-2} et r^{-4} . De plus, contrairement aux interactions de type ion-ion, l'un des partenaires n'étant que partiellement chargé, la quantité de charge du système diminue, et les énergies de liaison sont donc plus faibles.

I. 1. b. Les liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes sont fondamentales au champ de la biologie structurale¹⁴ (*e.g.* appariement Watson-Crick des nucléobases dans les duplex d'ADN, stabilisation de conformation protéique quaternaire, ...). A mi-chemin entre les forces coulombiennes et les forces de van der Waals, elles engagent aussi deux partenaires, l'un donneur et l'autre accepteur, qui peuvent-être dipôle-dipôle, ion-dipôle ou ion-ion. Le donneur est toujours une fonction acide *i.e.*, un hétéroatome électronégatif (*e.g.* azote, oxygène, soufre) porteur d'un proton (*e.g.* acides carboxyliques, alcools, amines, amides, thiols). L'accepteur est quant à lui toujours un atome fortement électronégatif (*e.g.* azote, oxygène, soufre, halogènes) porteur de doublets libres. Ces interactions sont directionnelles *i.e.*, alignement des trois atomes engagés dans la liaison non-covalente (**Figure 1-2**). Elles sont dépendantes des propriétés intrinsèques des atomes impliqués

¹³ Figure disponible sur : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Loi_de_Coulomb_\(électrostatique\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Loi_de_Coulomb_(électrostatique))

¹⁴ C. L. Perrin, J. B. Nielson ; Strong' Hydrogen Bonds in Chemistry and Biology. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1997**, 48, 511-544.

CHAPITRE 1 :

dans le système non-covalent mais aussi des conditions extérieures à ce système comme la nature du solvant, son pH ou la température du milieu. Ainsi, à température ambiante, ces liaisons plus faibles que des liaisons covalentes peuvent être modifiées (rupture et formation de nouvelles interactions) permettant aux systèmes biologiques non-covalents d'être en constante évolution.

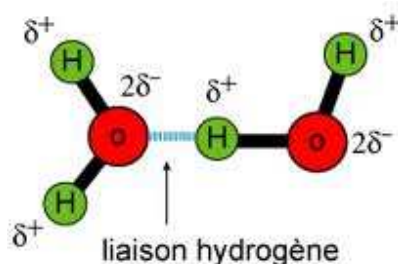


Figure 1-2. Exemple de liaison hydrogène (de type dipôle-dipôle) entre deux molécules d'eau¹⁵.

I. 1. c. Les forces de van der Waals

Les forces de van der Waals¹⁶ se dénombrent en trois forces bien distinctes : (i) les forces de Keesom (effet d'orientation) par interaction entre deux molécules polaires (dipôle permanent-dipôle permanent), (ii) les forces de Debye (effet d'induction) par interaction entre une molécule polaire et un dipôle induit (dipôle permanent-dipôle induit) et, (iii) les forces de London¹⁷ (effet de dispersion) par interaction entre deux dipôles induits (dipôle induit-dipôle induit) (**Equation 1-2**).

$$\text{(Eq. 1-2)} \quad E_{vdW} = -\frac{1}{r_{1,2}^6} \left[\frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{3 (4\pi \epsilon_0 \epsilon)^2 k_B T} + \frac{\mu_1^2 \alpha_2 + \mu_2^2 \alpha_1}{(4\pi \epsilon_0 \epsilon)^2} + \frac{3}{4} \frac{h \nu \alpha_1 \alpha_2}{(4\pi \epsilon_0)^2} \right]$$
$$E_{vdW} = -\frac{1}{r_{1,2}^6} [E_{Keesom} + E_{Debye} + E_{London}]$$

Dans cette expression, $r_{1,2}$ est la distance interatomique moyenne, μ_i sont les moments dipolaires des molécules considérées, ϵ_0 est la constante diélectrique du vide, ϵ est la constante diélectrique du milieu, k_B est la constante de Boltzmann, T est la

¹⁵ M. Bertout ; Module de biologie cellulaire 1 (Licence ; Université de Lille 1). Figure disponible sur : http://www-lemm.univ-lille1.fr/biologie/biocellulaire/apprendre/chapitre2/ch2_page1.htm

¹⁶ E. Dzyaloshinskii, E. M. Lifshitz, L. P. Pitaevskii ; General theory of van der Waals' forces. *Sov. Phys. Usp.*, **1961**, 4, 153-176.

¹⁷ "a) W. Heitler, F. London ; *Zeitschrift fur Physics*, **1927**, 44, 455 b) R. Eisenschitz, F. London ; *Zeitschrift fur Physik*, **1930**, 60, 491." Traduction en anglais : H. Hettema ; Quantum Chemistry, Classic Scientific Papers. *World Scientific*, **2000**.

température absolue, α_i sont les polarisabilités des molécules considérées, h est la constante de Planck et ν est la fréquence électronique d'absorption. Comme ces forces n'engagent que des dipôles (permanents ou induits), leurs énergies d'interactions sont considérées plus faibles que les interactions coulombiennes. Tout comme pour les forces coulombiennes, ces énergies d'interactions sont inversement proportionnelles à la distance interatomique (variation en r^{-6}) et à la permittivité du milieu. Ces interactions sont donc aussi renforcées en phase gazeuse grâce à la disparition de l'écrantage existant en solution.

I. 2. Les interactions π

Les interactions π sont des interactions non-covalentes engageant un système délocalisé d'électrons π conjugués (linéaire ou aromatique)¹⁸. Les systèmes π , possédant alternativement des sites riches et pauvres en électrons, peuvent interagir avec (i) un cation métallique ou un métal de degré d'oxydation 0 (respectivement appelé interaction π -cation et π -métal), (ii) un anion (interaction π -anion), (iii) une molécule polaire (interaction π -dipôle) ou, (iv) un autre système π (interaction π - π). Ces dernières *i.e.*, les interactions π - π , ont des énergies proches de celles des liaisons hydrogènes. Elles contribuent aussi à la stabilisation des systèmes biologiques non-covalents et de leurs conformations tridimensionnelles (*e.g.* appariement Watson-Crick entre nucléobases au sein des duplex d'ADN, certains sites actifs enzymatiques, ...) par l'empilement des plusieurs motifs aromatiques ; c'est le π stacking. Cependant, la stabilité de telles interactions reste dépendante du nombre et de l'orientation des motifs aromatiques donc de la conformation globale de la protéine.

I. 3. L'effet hydrophobe

L'effet hydrophobe est régi par l'attraction de groupements apolaires qui préfèrent s'associer entre eux plutôt qu'avec des régions hydrophiles (*i.e.*, composées de groupements polaires). Dans les milieux biologiques, aqueux par nature, l'action concertée des interactions, et notamment celles issues de l'effet hydrophobe, conditionne la conformation globale de la biomolécule. En effet, les résidus hydrophobes sont souvent

¹⁸ C. A. Hunter, J. K. M. Sanders ; The nature of π - π interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5525-5534.

CHAPITRE 1 :

tournés vers l'intérieur des protéines en milieu aqueux, tandis que les résidus hydrophiles sont aussi bien orientés vers l'intérieur que vers l'extérieur. La possibilité de former de telles interactions dépend de la position (structure primaire) et de l'orientation (structures secondaire et tertiaire) des acides aminés les uns par rapport aux autres, elles-mêmes guidées par des interactions covalentes ou non. L'effet hydrophobe étant fortement impliqué dans la conformation globale des protéines, de nombreux efforts ont été réalisés pour développer des échelles d'hydrophobie afin de prédire la probabilité de retrouver un acide aminé plutôt qu'un autre à l'intérieur ou à la surface d'une protéine considérée. Notons que l'intensité de ces interactions est fonction des surfaces hydrophobes en contact et se mesure en kilojoules par angström au carré ($\text{kJ} \cdot \text{Å}^{-2}$)¹⁹.

II. Les complexes non-covalents biologiques

II. 1. Structure des protéines et des peptides en solution

Les protéines sont des éléments essentiels de la vie de la cellule. Elles peuvent jouer un rôle : (i) catalytique, *e.g.* l'amylase salivaire est une enzyme qui catalyse la dégradation des amidons, (ii) de transport, *e.g.* l'hémoglobine transporte l'oxygène dans le sang, (iii) de régulation métabolique, *e.g.* l'insuline participe à la régulation du taux de glucose sanguin et, (iv) de protection de l'organisme, *e.g.* les anticorps reconnaissent sélectivement et inactivent spécifiquement des bactéries, des toxines ou certains virus. En somme, l'immense majorité des fonctions cellulaires est assurée par des protéines dont la structure complexe influe sur leurs actions²⁰.

II. 1. a. Les acides aminés

Les protéines (comme les peptides) sont des macromolécules biologiques constituées d'un enchainement d'acides aminés (ou résidus) unis par des fonctions amides (appelées liaisons peptidiques)²¹. Un acide aminé est une espèce organique composé d'un carbone tétravalent central (appelé carbone α) porteur d'une fonction acide

¹⁹ F. D. King, A. W. Oxford ; Progress in medicinal chemistry (1st Ed.), Elsevier Science B.V. (Amsterdam), **2002**.

²⁰ H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Zipursky, J. Darnell ; Biologie moléculaire de la cellule, 3rd ed. ; *De Boeck*, **2005**.

²¹ C. Branden, J. Tooze ; Introduction to protein structure, 2nd ed. ; *Garland Publishing*, **1999**.

carboxylique, d'une fonction amine (d'où acide aminé), d'un atome d'hydrogène et d'un groupement variable (appelé chaîne latérale, R). Parmi les 20 différents acides aminés existant chez l'Homme (**Tableau 1-1**), tous les carbones α (hormis la glycine pour laquelle le groupement variable est un atome d'hydrogène) sont asymétriques et sont généralement de configuration stéréochimique L (formes D rares dans la nature). En milieu physiologique *i.e.*, en solution aqueuse tamponnée, les acides aminés sont formellement chargés (excepté au point isoélectrique (pI) ; valeur de pH où le système est porteur de charges locales mais reste formellement neutre), voire même zwitterioniques *i.e.*, porteur simultanément de charge(s) locale(s) positive(s) et négative(s) (notamment au point isoélectrique, par définition).

Code	Abrév.	Acide aminé	Mw	pI	pKa ₁ (α -COOH)	pKa ₂ (α -NH ₃)	pKa ₃ (chaîne latérale)	Nature
A	Ala	Alanine	89,0940	6,01	2,35	9,87	-	Apolaire, aliphatique
C	Cys	Cystéine	121,1540	5,05	1,92	10,70	8,18	Polaire
D	Asp	Acide aspartique	133,1038	2,85	1,99	9,90	3,90	Acide
E	Glu	Acide glutamique	147,1307	3,15	2,10	9,47	4,07	Acide
F	Phe	Phénylalanine	165,1918	5,49	2,20	9,31	-	Apolaire, aromatique
G	Gly	Glycine	75,0671	6,06	2,35	9,78	-	Apolaire
H	His	Histidine	155,1563	7,60	1,80	9,33	6,04	Basique, aromatique
I	Ile	Isoleucine	131,1746	6,05	2,32	9,76	-	Apolaire, aliphatique
K	Lys	Lysine	146,1893	9,60	2,16	9,06	10,54	Basique
L	Leu	Leucine	131,1746	6,01	2,33	9,74	-	Apolaire, aliphatique
M	Met	Méthionine	149,2078	5,74	2,13	9,28	-	Apolaire
N	Asn	Asparagine	132,1190	5,41	2,14	8,72	-	Polaire
P	Pro	Proline	115,1319	6,30	1,95	10,64	-	Apolaire
Q	Gln	Glutamine	146,1459	5,65	2,17	9,13	-	Polaire
R	Arg	Arginine	174,2027	10,76	1,82	8,99	12,48	Basique
S	Ser	Sérine	105,0934	5,68	2,19	9,21	-	Polaire
T	Thr	Thréonine	119,1203	5,60	2,09	9,10	-	Polaire
V	Val	Valine	117,1478	6,00	2,39	9,74	-	Apolaire, aliphatique
W	Trp	Tryptophane	204,2284	5,89	2,46	9,41	-	Apolaire, aromatique
Y	Tyr	Tyrosine	181,1912	5,64	2,20	9,21	10,46	Polaire, aromatique

Tableau 1-1. Principales données caractéristiques des 20 acides aminés existants chez l'Homme. Les codes et abréviations sont ceux spécifiés par le comité de nomenclature commun IUPAC – IUBMB.

En effet, étant simultanément porteur d'une fonction acide (-CO₂H), d'une fonction basique (-NH₃) et d'une fonction variable sur la chaîne latérale (acide, basique, aromatique ou hydrophobe), la forme zwitterionique existe fréquemment dans les conditions physiologiques mais dépend de la température et du pH du milieu.

II. 1. b. La liaison peptidique

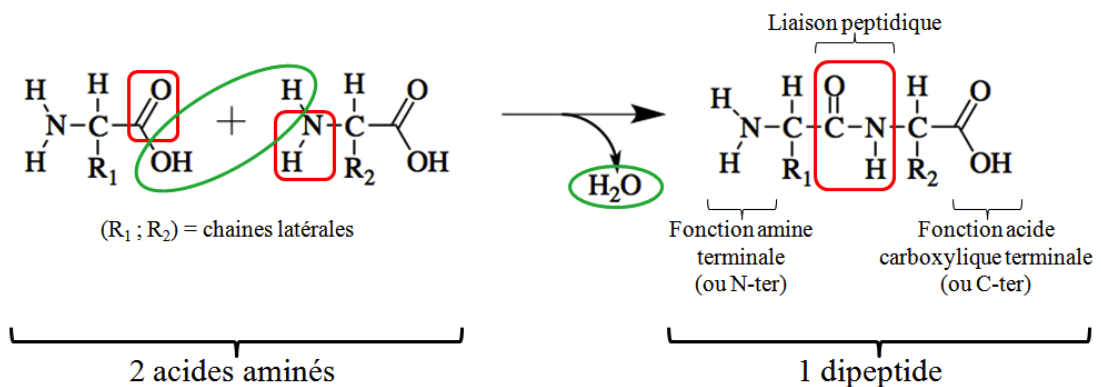


Figure 1-4. Synthèse d'une liaison peptidique.

Les fonctions acides carboxyliques et amines portées par les acides aminés permettent la formation de liaisons peptidiques par synthèse d'une fonction amide (condensation/déshydratation) à partir de deux acides aminés distincts. Les fonctions amines et acides carboxyliques libres situées aux extrémités du squelette peptidique nouvellement formées sont respectivement appelées les groupes N-terminaux et C-terminaux (**Figure 1-4**). Lorsque la longueur de la chaîne est inférieure à 50 acides aminés, on parle de peptides. Entre 50 et 100 acides aminés, on parle de peptides, de polypeptides ou de petites protéines. Enfin, lorsque la longueur de la chaîne est supérieure à 100 acides aminés, on parle de protéines²². De part la présence de formes mésomères, les liaisons peptidiques sont supposées planes et la rotation de la liaison C_{amide}-N_{amide} est fortement défavorisée. De plus, l'encombrement stérique généré par les chaînes latérales (au niveau de la liaison peptidique) discrimine la configuration *Z* de la liaison peptidique au profit de la configuration *E*. Les autres liaisons *i.e.*, C_{α,(i)}-C_{amide} et N_{amide}-C_{α,(i+1)}, restant en libre rotation, permettent aux protéines d'adopter de nombreuses conformations (ou structures tridimensionnelles).

²² G. Petsko, D. Ringe ; Structure et fonction des protéines, 1st ed. ; *De Boeck*, 2009.

II. 1. c. Conformations des protéines

Le grand nombre de résidus impliqués dans une conformation confère un aspect très complexe à la structure tridimensionnelle d'une protéine. Afin de simplifier l'étude de telles structures, la description de ces agencements est décomposée en quatre systèmes de structures imbriquées *i.e.*, où le système (i) est compris dans le système (i+1)²¹ (**Figure 1-5**).

(1) La structure primaire décrit l'enchaînement de résidus d'acides aminés (ou séquence primaire) de la protéine. Notons que ces séquences se lisent invariablement de l'extrémité N-ter vers l'extrémité C-ter. Les acides aminés sont donc numérotés dans ce même ordre.

(2) La structure secondaire décrit le premier niveau de repliement et d'agencement de la séquence primaire. Elle regroupe les hélices α et les feuillets β qui sont des conformations répétitives localisées, qui sont stabilisées par des interactions intramoléculaires de type liaison hydrogène entre acides aminés spatialement voisins.

(3) La structure tertiaire décrit le repliement et l'agencement en domaines de différents éléments de structures secondaires. C'est à ce niveau que se forme la structure tridimensionnelle de la protéine. Cette structure est stabilisée par des interactions intramoléculaires non-covalentes *i.e.*, des interactions électrostatiques, des interactions de type liaison hydrogène, des interactions π et des effets hydrophobes, mais aussi par des liaisons covalentes *i.e.*, des ponts disulfures se formant spontanément par oxydation des fonctions thiols portées par les chaînes latérales de deux résidus cystéines spatialement voisins.

(4) La structure quaternaire décrit le repliement et l'agencement en complexes non-covalents de plusieurs éléments de structure tertiaire. Notons que les conformations de ces structures tertiaires (prises individuellement) peuvent être différentes de leurs conformations au sein du complexe. Cette structure est également stabilisée par des interactions intermoléculaires non-covalentes *i.e.*, des interactions électrostatiques, des interactions de type liaison hydrogène, des interactions π et des effets hydrophobes, mais

aussi dans de rares cas par des liaisons covalentes *i.e.*, des ponts disulfures entre deux résidus cystéine spatialement voisins.

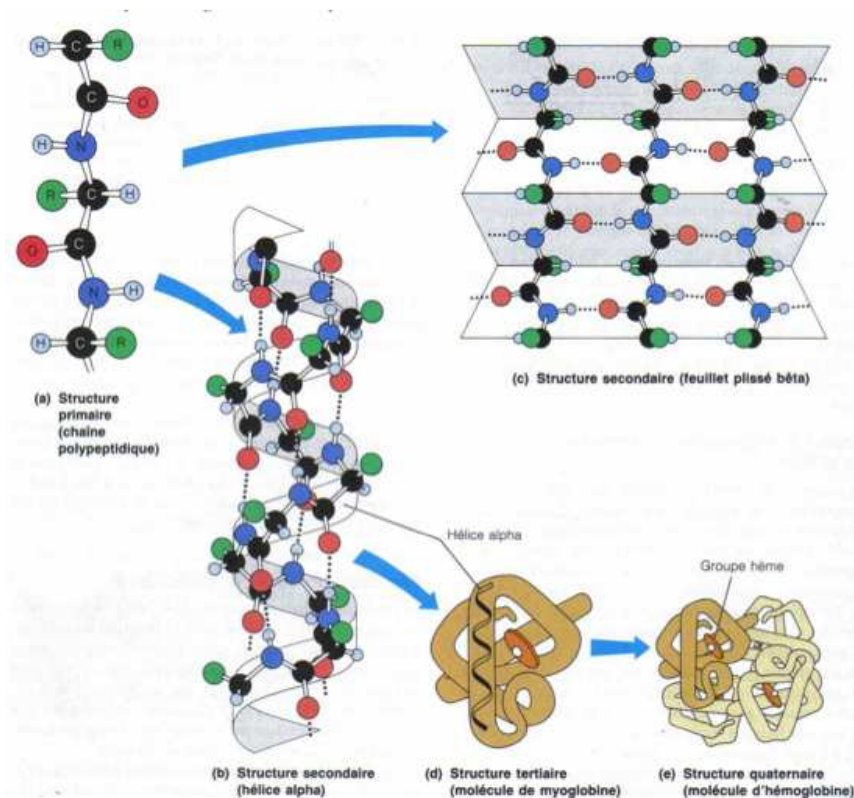


Figure 1-5. Niveaux d'organisation structurale des protéines²³.

Dans les conditions physiologiques, une protéine possède une seule ou, dans de rares cas, quelques conformation(s) spécifique(s) à sa (ou ses) fonction(s) biologique(s) appelée(s) conformation(s) native(s)²². Cependant, la conformation native d'une protéine reste dictée par sa structure primaire, qui induit ses structures secondaires, et détermine sa structure tertiaire, voir quaternaire.

II. 1. d. Stabilité des protéines

Comme décrit précédemment (c.f. I. 3.), la seule certitude sur l'agencement spatial des résidus *i.e.*, leurs répartitions et leurs orientations, est une plus grande probabilité de trouver des résidus hydrophobes orientés vers l'intérieur des structures

²³ S. Berrada ; Les Protéines : Structures, Propriétés, et Applications Technologiques (Académie de Montpellier). Figure disponible sur : http://sti.ac-montpellier.fr/IMG/pdf/Prot-ines_SBSSA.pdf

tertiaires et quaternaires assurant ainsi la stabilité de telles structures en fuyant tout contact avec le milieu physiologique. Les résidus hydrophiles *i.e.*, portant une fonction acide ou basique sur leur chaîne latérale, sont quant à eux aussi bien orientés vers l'intérieur des structures tertiaires et quaternaires, que vers l'extérieur, conférant à ces structures des propriétés de reconnaissances spécifiques. Ainsi, la fonction biologique spécifique d'une protéine dépend de sa conformation tridimensionnelle *i.e.*, des interactions non-covalentes internes à sa structure, mais aussi de la capacité de sa surface à créer des interactions non-covalentes (réversibles à températures ambiante ou physiologique) avec d'autres molécules *i.e.*, la (ou les) cible(s). D'ailleurs, la fixation d'un ligand (ou cofacteur) entraîne souvent un changement conformationnel de la protéine impliqué dans son mécanisme d'action. Dans certaines conditions, *e.g.* excès de chaleur, valeurs de pH extrêmes, force ionique excessive, présence de solvant organique et/ou présence d'agents réducteurs, les interactions assurant la conformation et la reconnaissance de surface peuvent-être modifiées, voir rompues. Il en résulte une perte de la fonction biologique ; la protéine est dite dénaturée. Notons que, remise dans des conditions adéquates, une protéine partiellement dénaturée peut se replier spontanément et retrouver sa conformation native et en conséquence son activité.

II. 2. Structure des brins d'ADN en solution

Le rôle principal de l'acide β -D-2'-désoxyribonucléique (ADN) est de stocker les informations génétiques nécessaires au développement et au fonctionnement de tout organisme vivant (à l'exception de certains virus). L'ADN est composé de la répétition linéaire de motifs unitaires dont l'ordre porte l'information génétique comme l'ordre des lettres de cette phrase en porte l'information. Le langage utilisé est appelé le code génétique. Il permet à certains organismes (principalement protéiques) de lire les instructions nécessaires à la construction et au bon fonctionnement d'un organisme vivant.

II. 2. a. Nucléotides, nucléosides et bases nucléiques

Les oligonucléotides (ou simples brins d'ADN) sont des macromolécules constituées d'un enchainement de nucléotides (monophosphate) unis par des fonctions

CHAPITRE 1 :

phospho-diester. Un nucléotide est une molécule composée de trois parties : (i) un cycle β -D-2'-désoxyribofuranose (i.e., un pentose cyclique) lié à (ii) une base nucléique variable (ou nucléobase) *via* une liaison N-hétérosidique (dite glycosidique) sur l'atome de carbone 1' du cycle désoxyribose, et lié à (iii) 1, 2 ou 3 groupements phosphates consécutifs localisés sur l'atome de carbone 5' et/ou sur l'atome de carbone 3' du cycle désoxyribose (**Figure 1-6a**). Puisque les groupements phosphates et les groupements désoxyriboses sont communs à tous les nucléotides, la nature de ces derniers est déterminée par la base nucléique qui les compose. Les bases nucléiques présentes dans l'ADN se divisent en 2 familles chimiques : les purines *i.e.*, la thymine et la cytosine, et les pyrimidines *i.e.*, l'adénine et la guanine (**Figure 1-6b**). La nomenclature des différentes entités nucléiques est rappelée dans le **Tableau 1-2**. Comme le décrivent les règles de Watson-Crick⁴, nous pouvons déjà noter, à ce niveau (élémentaire), un appariement plus spécifique des guanines pour les cytosines et des adénines pour les thymines, et ce, qu'elles soient sous formes de nucléobases, de nucléosides ou de nucléotides.

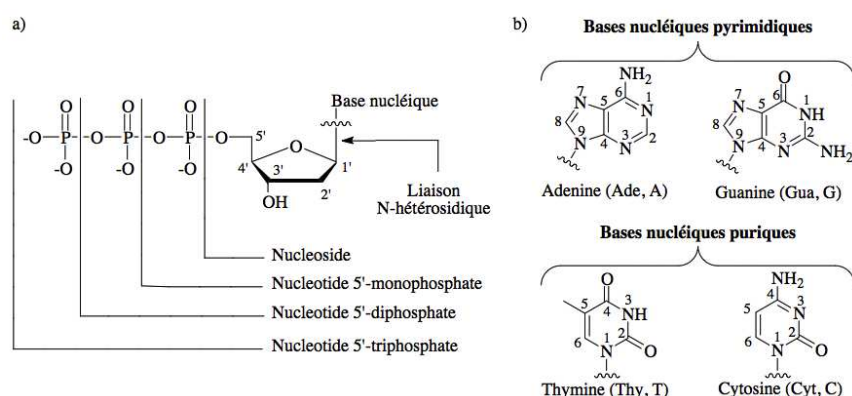


Figure 1-6. Représentation schématique (a) d'un nucléoside et de nucléotides modèles et (b) des 4 bases nucléiques composant l'ADN.

Bases nucléiques		Désoxyribonucléosides		Désoxyribonucléotides n-phosphates	
Nom	Symbole	Nom	Symbole	Nom	Symbole
adénine	<i>Ade</i>	2'-désoxyadénosine	<i>dAdo</i>	adénosine n-phosphate	<i>dAMP, dADP, dATP</i>
cytosine	<i>Cyt</i>	2'-désoxycytidine	<i>dCyd</i>	cytidine n-phosphate	<i>dCMP, dCDP, dCTP</i>
guanine	<i>Gua</i>	2'-désoxyguanosine	<i>dGuo</i>	guanosine n-phosphate	<i>dGMP, dGDP, dGTP</i>
thymine	<i>Thy</i>	(2'-désoxy)thymidine	<i>(d)Thd</i>	thymidine n-phosphate	<i>(d)TMP, (d)TDP, (d)TTP</i>

Tableau 1-2. Nomenclature des bases nucléiques, des désoxyribonucléosides et des désoxyribonucléotides n-phosphates (avec n = {mono ; di ; tri}). Les symboles sont ceux spécifiés par le comité de nomenclature commun IUPAC – IUBMB.

En milieu physiologique *i.e.*, en solution aqueuse tamponnée, les nucléotides sont formellement chargés, voire même zwitterioniques *i.e.*, porteurs simultanément de charge(s) locale(s) positive(s) et négative(s). En effet, étant simultanément porteuse de sites acides (un ou plusieurs groupements phosphates) et de sites basiques variables (sur les bases nucléiques) la forme zwitterionique existe fréquemment dans les conditions physiologiques mais dépend de la température et du pH du milieu.

II. 2. b. La liaison phospho-diester

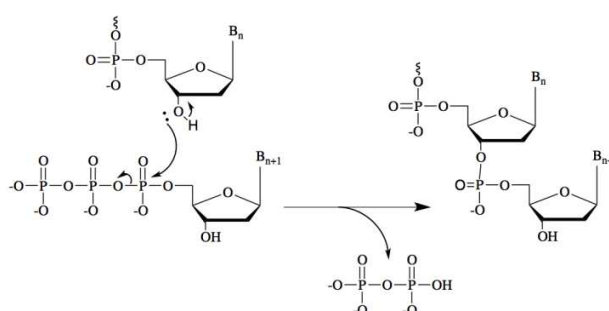


Figure 1-7. Mécanisme de formation d'une liaison phospho-diester

La fonction alcool portée par l'atome de carbone 3' d'un nucléotide et les fonctions phosphates portées par l'atome de carbone 5' d'un autre nucléotide permettent la formation d'une liaison phospho-diester par condensation/dépyrophosphatation. Les groupements libres situés aux extrémités du squelette oligonucléotique nouvellement formées sont respectivement appelées les extrémités 5' et 3' (**Figure 1-7**). Lorsque sa longueur ne permet plus de (facilement) qualifier la chaîne de nucléotide avec les préfixes grec adéquats (*e.g.* di-, tri-, tétranucléotides), on parle d'oligonucléotides (ou oligomères). Dans ce cas, la longueur de la chaîne est précisée sous forme de n-mer, où n est le nombre d'unités nucléotidiques, *e.g.* 12-mer pour un dodécanucléotide ou 100-mer pour un hécatonucléotide. De par la présence de formes mésomères résonantes entre le phospho-alcool et la phospho-cétone, la conformation pyramide-trigonale du groupement phosphate est déformée. De plus, l'encombrement stérique généré par les nucléosides limite mais n'empêche pas les rotations autour des liaisons $C_3'-O_3'$, $O_3'-P$, $P-O_5'$ et $O_5'-C_5'$, laissant un grand degré de flexibilité aux oligonucléotides.

II. 2. c. Conformations des brins d'ADN

Le grand nombre de sites impliqués dans une conformation confère un aspect très complexe à la structure des brins d'ADN. Afin de simplifier l'étude de telles structures, la description de ces agencements est, comme pour les protéines, décomposée en systèmes de structures imbriqués *i.e.*, où le système (i) est compris dans le système (i+1).

(1) La structure primaire décrit l'enchaînement de nucléotides (généralement simplifié par l'enchaînement de nucléobases) de l'oligonucléotide (ou séquence primaire). Notons que ces séquences se lisent invariablement de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Les nucléotides sont donc numérotés dans ce même ordre. Comme le décrivent les règles de Chargaff²⁴, l'ADN de n'importe quelle cellule ou de tout organisme vivant doit avoir un rapport unitaire entre les bases puriques et les bases pyrimidiques et, plus précisément, il faut que la quantité de guanine soit égale à la quantité de cytosine, et que la quantité d'adénine soit égale à la quantité de thymine. Cette tendance se retrouve dans tout simple brin de l'ADN.

(2) La structure secondaire décrit le premier niveau de repliement et d'agencement de la séquence primaire. Elle regroupe, par exemple, les structures en « épingle à cheveux » (pour *Hairpin*) et en « épingle à cheveux cassée » (pour *Broken Hairpin*) représentées respectivement sur la **Figure 1-8a** et **1-8b**, apparaissant dans le cas où des portions éloignées d'un même brin sont complémentaires (*e.g.* appariement de Watson-Crick⁴).

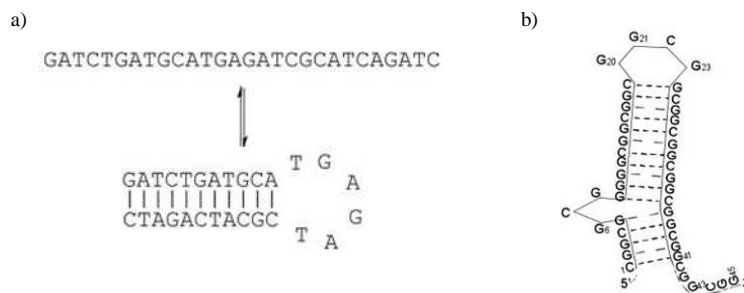


Figure 1-8. Exemples de structures secondaires des brins d'ADN : **(a)** en « épingle à cheveux » (pour *Hairpin*) et **(b)** en « épingle à cheveux cassée » (pour *Broken Hairpin*).

²⁴ D. Elson, E. Chargaff ; On the deoxyribonucleic acid content of sea urchin gametes. *Experientia*, **1952**, 8, 143–145.

Dans le cas de séquences riches en guanine, un cas particulier de structure secondaire du type Hairpin apparaît : les G-quadruplex intramoléculaires qui sont dues à un appariement particulier de 4 bases guanine coplanaires, *via* des interactions de type liaison hydrogène, sous forme de quartet formant des interactions d'empilement π (ou « π -stacking») (**Figure 1-9**).

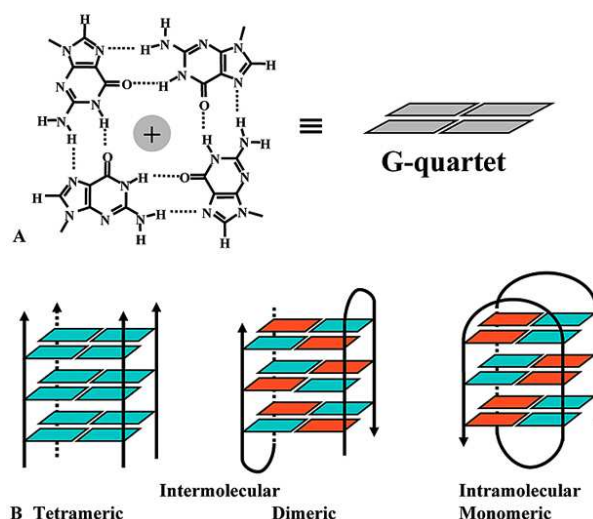


Figure 1-9. Autre exemple de structures secondaires : les G-quadruplets²⁵.

(3) La structure tertiaire décrit l'appariement et l'agencement en domaine de différents éléments de structure primaire ou secondaire. C'est à ce niveau que se forment la majorité des structures tridimensionnelles de l'ADN, telles que les doubles hélices (ou duplex), les triples hélices (ou triplex), et les quadruplex intermoléculaires qui ne sont pas en hélices (**Figure 1-9**). Ces structures sont stabilisées par des interactions de type liaison hydrogène entre les bases complémentaires des brins d'ADN opposés et par des interactions d'empilement π (ou « π -stacking») entre les cycles aromatiques des bases nucléiques consécutives au sein du même brin d'ADN, mais aussi par la dualité d'hydrophobicité existant au sein des simples brins d'ADN. En effet, le fort caractère hydrophobe des bases nucléiques les pousse à fuir le milieu physiologique (aqueux par nature), tandis que le fort caractère polaire des groupements phosphate les incite à rester à la surface de la structure.

²⁵ I. K. Moon, M. B. Jarstfer ; The human telomere and its relationship to human disease, therapy, and tissue engineering. *Frontiers in Bioscience*, **2007**, *12*, 4595-4620.

CHAPITRE 1 :

Il existe trois types de duplex d'ADN : les duplex B, les duplex A et les duplex Z. Bien que ces hélices soient toutes constituées de deux simples brins appariés antiparallèlement par des liaisons hydrogènes, leurs caractéristiques structurales sont très différentes (**Tableau 1-3 ; Figure 1-10**).

Type de duplex	Type A	Type B	Type Z
Sens de l'hélice	droite	droite	gauche
Diamètre	~ 26 Å	~ 20 Å	~ 18 Å
Paires de bases par tour d'hélice	11	10	12
Séparation angulaire entre deux paires de bases	33°	36°	60°
Avance de l'hélice par tour	28 Å	34 Å	45 Å
Avance de l'hélice par paire de bases	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
Angle de déviation des bases par rapport à l'axe de l'hélice	20°	6°	7°
Grand sillon	fin et profond	large et profond	plat
Petit sillon	large et superficiel	fin et profond	fin et profond
Conformation du désoxyribose	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo (pyrimidines) ; C3'-endo (purines)
Liaison glycosidique	anti	anti	anti (pyrimidines) ; syn (purines)

Tableau 1-3. Caractéristiques structurales des duplex d'ADN de types A, B et Z.

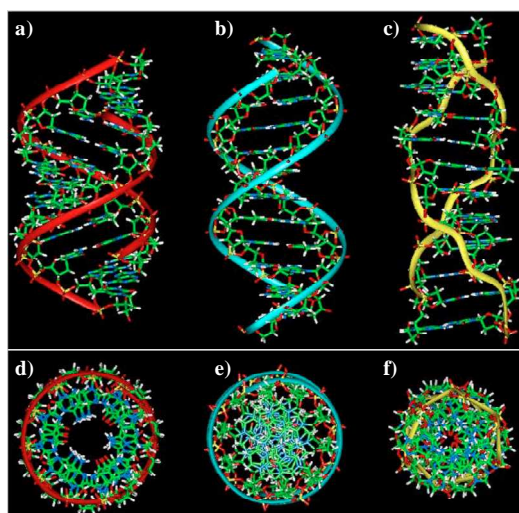


Figure 1-10. Visualisations moléculaires des duplex d'ADN (a, d) de type A, (b, e) de type B, et (c, f) de type Z, vues (a, b, c) de côté et (d, e, f) de haut.

Les duplex de type B, étant les plus stables, ils sont aussi les plus courants dans la nature. En effet, dans ces duplex, toutes les bases nucléiques sont appariées selon le modèle de Watson-Crick décrivant les interactions « base purique/base pyrimidique » les plus stables (**Figure 1-11**).

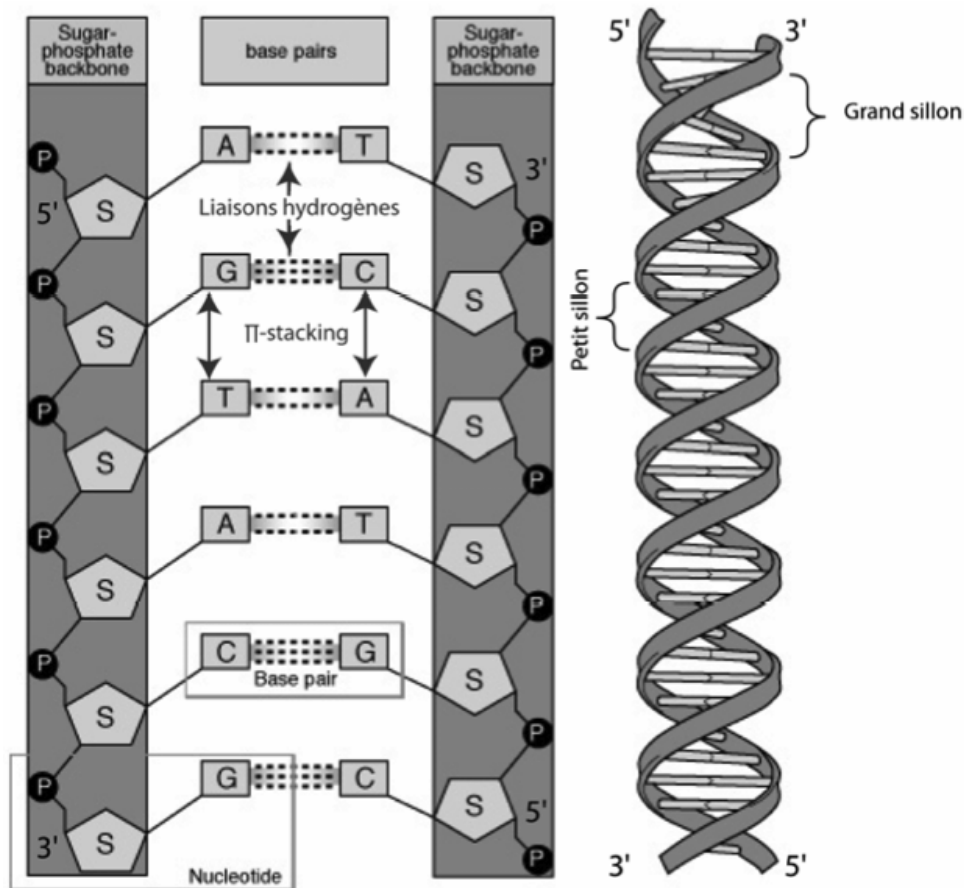


Figure 1-11. Représentation schématique d'un duplex d'ADN de type B.

D'ailleurs, ce sont les duplex d'ADN de type B qui servent de bases à la formation de triple hélices d'ADN. En effet, le grand sillon des doubles hélices B expose des tranches de bases nucléiques ayant encore la possibilité de former des liaisons hydrogènes. Ces appariements moins spécifiques (mais non-négligeables, **Figure 1-12**) ont été mis en évidence par *Karst Hoogsteen*²⁶, 10 ans après le modèle proposé par *Watson and Crick*⁴.

²⁶ a) K. Hoogsteen ; The crystal Structure of 1-Methylthymine. *Acta Crist.*, **1963**, *16*, 28-38. b) K. Hoogsteen ; The Crystal and Molecular Structure of a Hydrogen-Bonded Complex Between 1-Methylthymine and 9-Methyladenine. *Acta Crist.*, **1963**, *16*, 907-916.

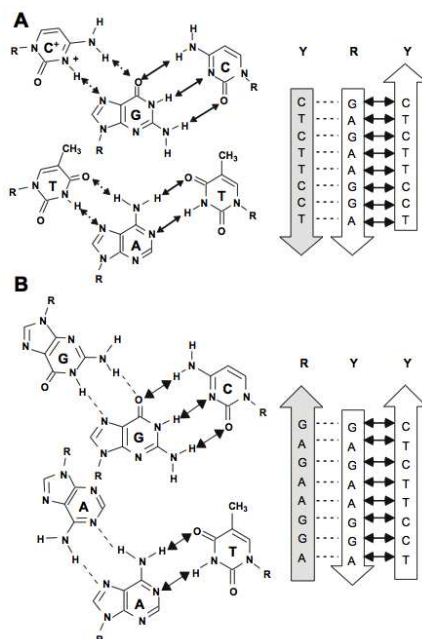


Figure 1-12. (A) Appariements des paires de bases dans une structure de triples brins d'ADN parallèles. (B) Appariements des paires de bases dans une structure de triples brins d'ADN antiparallèles. Les pointillés et les lignes continues représentent respectivement les appariements de Hoogsteen et de Watson-Crick. Les Y et les R représentent respectivement les brins composés de pyrimidines et les brins composés de purines²⁷.

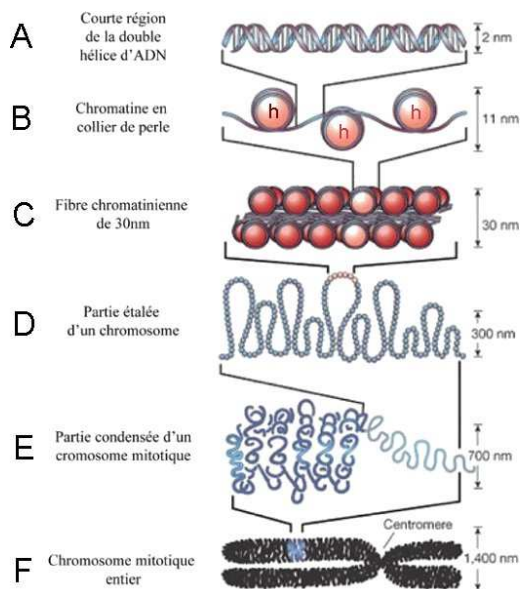


Figure 1-13. Etapes du compactage des doubles brins d'ADN.

²⁷ D. Miyoshi, N. Sugimoto ; Molecular crowding effects on structure and stability of DNA. *Biochimie*, **2008**, *90*, 1040-1051.

(4) La structure quaternaire décrit le repliement et l'agencement en complexes non-covalents de plusieurs éléments de structure tertiaire. Par exemple, dès la première étape du compactage de l'ADN (**Figure 1-13**), les chromatines, formées par le bobinage des doubles brins d'ADN autour des histones (qui sont des structures protéiques tertiaires), sont des structures quaternaires. Il en est de même pour toutes les étapes suivantes du compactage de l'ADN (**Figure 1-13**). Ces structures sont principalement stabilisées par des interactions intermoléculaires non-covalentes *i.e.*, des interactions électrostatiques, des interactions de type liaison hydrogène, et des interactions hydrophobes.

II. 2. d. Stabilité des brins d'ADN

Comme décrit précédemment (c.f. **I. 3.**), la seule certitude sur l'agencement spatial des groupements chimiques *i.e.*, leurs répartitions et leurs orientations, est une plus grande probabilité de trouver des groupements hydrophobes orientés vers l'intérieur des structures secondaires, tertiaires et quaternaires assurant ainsi la stabilité de telles structures en fuyant tout contact avec le milieu physiologique. Les groupements plus hydrophiles, comme les groupements phosphates, sont quant à eux principalement orientés vers l'extérieur, conférant à ces structures des propriétés de reconnaissances spécifiques (qui seront plus amplement décrites dans la partie suivante). Cependant, la forte densité de groupements négativement chargés induit des répulsions électrostatiques (entre groupements phosphates) déstabilisant fortement les doubles hélices d'ADN. C'est pour cette raison qu'il est difficile de former des duplex dans de l'eau pure. En revanche, la présence de sels dans la solution (e.g. Na^+ ou NH_4^+) permet de stabiliser le duplex *via* la formation de paires d'ions. Dans certaines conditions, e.g. excès de chaleur, valeurs de pH extrêmes, force ionique excessive et/ou présence de solvant organique, les interactions assurant la conformation et la reconnaissance de surface peuvent-être modifiées, voir rompues. Il en résulte une perte de la fonction biologique ; le duplex est dit dénaturé. Notons que, remis dans des conditions adéquates, le duplex partiellement dénaturé peut se replier naturellement et retrouver sa conformation native et en conséquence son activité.

II. 3. Les complexes non-covalents ADN-protéine en solution

De nombreuses méthodes de détection, autre que la MS, peuvent être appliquées à l'étude d'interactions non-covalentes (NCI) entre brins d'ADN et protéines²⁸ : la mobilité sur gel (pour *gel mobility shift assay*), l'extraction sur phase solide greffée (pour *filter binding*), la spectroscopie par fluorescence (pour *fluorescence spectroscopy*), le dosage calorimétrique adiabatique (pour *isothermal titration calorimetry*), la centrifugation analytique (pour *analytical centrifugation*), la résonance plasmonique de surface (pour *surface plasmon resonance*), la cristallographie par rayon X (pour *x-ray crystallography*) et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN pour *NMR spectroscopy*). Cependant, chacune de ces méthodes de détection a des avantages et des inconvénients.

Les constantes d'équilibre et la stœchiométrie d'appariement peuvent être obtenues par extraction sur phase solide (greffée) ou par mobilité sur gel, mais ces deux méthodes nécessitent un radio-marquage des espèces étudiées. De plus, des artefacts (*e.g.* faux positifs et/ou faux négatifs) peuvent apparaître des extractions sur phase solide lors de l'étape de rinçage ou lorsque les brins d'ADN sont trop longs. Le problème majeur de la mobilité sur gel est la durée de l'analyse qui, lorsqu'elle est trop longue, ne permet pas l'observation des complexes les plus fragiles. La spectroscopie par fluorescence nécessite la présence d'un fluorophore (comme un résidu tryptophane qui peut être déjà présent dans la séquence peptidique) mais la présence d'autres fluorophores (comme les bases nucléiques) peut interférer dans l'analyse. La résonance plasmonique de surface permet de suivre les processus d'appariement en temps réel et de déterminer les grandeurs cinétiques et thermodynamiques d'une interaction *i.e.*, les constantes d'équilibre et les constantes de vitesse de dissociation des NCX. Outre les limites sur la masse du système (qui ne doit pas être trop gros), l'inconvénient majeur de cette méthode vient de la nécessité d'immobiliser l'un des partenaires (sur une surface ou un gel), modifiant éventuellement la nature de l'interaction reconnaissance du partenaire. Le dosage calorimétrique adiabatique informe sur les constantes d'équilibre de dissociation du NCX

²⁸ V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, J. I. Tinoco ; *Nucleic Acids, Structures, Properties, and Functions*. University Science Book, 1999, Sausalito CA.

et sur sa stœchiométrie mais, comme pour extraction sur phase solide ou par mobilité sur gel, il ne permet pas une caractérisation précise des partenaires de l'interaction. De la même manière, la centrifugation analytique fournit des mesures de masses moins précises que celles obtenues par MS. Enfin, la cristallographie par rayon X et la RMN fournissent des structures tridimensionnelles hautement résolues mais sont des méthodes assez lentes et nécessitent une quantité importante d'échantillon. De plus, certaines structures sont trop grandes pour être étudiées par RMN ou ne cristallisent pas, limitant les analyses par cristallographie par rayon X. D'où il apparaît que le développement d'approches complémentaires efficaces et simples à mettre en œuvre reste d'intérêt.

II. 3. a. Etude moléculaire des interactions ADN/protéines

Les bases moléculaires des interactions non-covalentes (*NCI* pour *Non-Covalent Interactions*) entre brins d'ADN et protéines sont à l'origine des principes gouvernant la reconnaissance « ADN/protéine » en solution (avant le transfert en phase gazeuse) et permettent de prévoir l'évolution du système (pendant et après le transfert en phase gazeuse)^{29,30,31,32}. Il n'y a pas de code simple ou de règles générales, *e.g.* tel acide aminé se lie à telle base nucléique, permettant de décrire ou de prédire la reconnaissance ADN/protéine. Cependant, certaines tendances d'appariements préférentiels existent. Les NCX « ADN/protéine » résultent généralement d'un réseau complexe de contacts entre les deux partenaires et différentes NCI peuvent exister : (i) les interactions de type liaison hydrogène entre les résidus basiques des acides aminés chargés positivement et les groupements phosphates de l'ADN chargés négativement (*i.e.*, interactions de type ion-ion ou pont salin), (ii) les interactions de type liaison hydrogène entre les résidus polaires des acides aminés et les fonctions exposées sur la tranche des nucléobases ou avec les groupements désoxyribose (*i.e.*, interactions de type dipôle-dipôle ou ion-dipôle), (iii) les liaisons de contacts de type Van der Waals (*i.e.*, interactions de type dipôle-dipôle), et (iv) les liaisons non-covalentes stabilisées par des molécules d'eau. Les duplex d'ADN

²⁹ S. Neidle ; *Nucleic Structure and Recognition*. Oxford University Press (Oxford), **2002**.

³⁰ C. W. Garvie, C. Wolberger ; Recognition of specific DNA sequences. *Mol. Cell*, **2001**, 8, 937–946.

³¹ N. M. Luscombe, R. A. Laskowski, J. M. Thornton ; Amino acid–base interactions: A three-dimensional analysis of protein–DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, 29, 2860–2874.

³² M. E. Vazquez, A. M. Caamano, J. L. Mascarenas ; From transcription factors to designed sequence-specific DNA-binding peptides. *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, 32, 338–349.

CHAPITRE 1 :

sont des molécules à l'allure de double hélice composées d'un squelette sucre/phosphate fortement négativement chargé et de paires de nucléobases dont les tranches sont exposées dans un grand et dans un petit sillon. La **Figure 1-14** présente les sites disponibles pour des liaisons hydrogènes sur les tranches des nucléobases appariées. La reconnaissance d'une protéine pour un brin d'ADN provient essentiellement des interactions spécifiques avec la surface chimique du brin *i.e.*, de la succession de chaque paire de nucléobases exposée dans le grand ou le petit sillon. Cette surface chimique agit comme une « signature » chimique unique pour chaque séquence d'ADN dans une conformation donnée³⁰. La formation de NCI entre une protéine et le squelette de l'ADN n'est pas le facteur le plus important de la reconnaissance mais joue un grand rôle dans la stabilisation du complexe. Enfin, notons que, de par l'absence de l'appariement des nucléobases, la reconnaissance des simples brins d'ADN diffère de celle des duplex³².

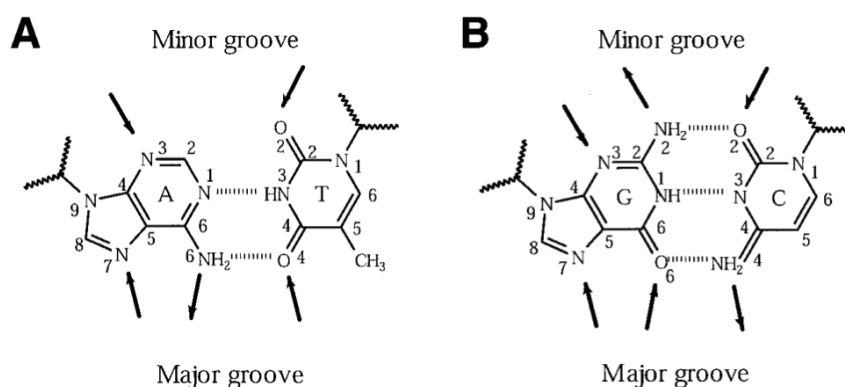


Figure 1-14. Schémas de l'appariement des nucléobases dans un duplexe d'ADN. Les flèches marquent les positions accessibles aux liaisons hydrogènes, en pointant les accepteurs et en s'éloignant des donneurs. Les accès aux nucléobases par le grand sillon (major groove) sont en bas et ceux par le petit sillon (minor groove) sont en haut³¹.

A partir de l'investigation structurale détaillée de 129 NCX de protéine/duplex d'ADN, *Thornton and co-workers*³¹ ont estimé la contribution des interactions de type liaison hydrogène, des interactions de contacts de type Van der Waals et des NCI stabilisées par des molécules d'eau selon les combinaisons d'acide aminé et de nucléobase ou de groupement du squelette de l'ADN. Rappelons que ces estimations sont basées sur les structures déterminées par cristallographie à rayon X et disponibles sur la

banque de données des protéines (*PDB* pour *Protein Data Bank*)³³ et sur la base de données des acides nucléiques (*NAD* pour *Nucleic Acid Database*)³⁴. Les résidus d'acides aminés positivement chargés et polaires contribuent le plus fréquemment aux liaisons hydrogènes stabilisant les complexes ADN/protéine selon l'ordre suivant : Arg > Lys > Ser > Thr > Asn > Gln. Les interactions les plus fortes engagent les groupements phosphates du squelette de l'ADN et les extrémités chargées des résidus basiques arginines et lysines. Un exemple est donné dans la **Figure 1-15a** avec l'arginine. Ces interactions (avec les groupements phosphates) représentent 2/3 des liaisons hydrogènes stabilisant ce type de NCX. Notons que, contrairement à leur comportement en phase gazeuse, les résidus histidine ne forment en solution des NCI stables qu'avec les groupements phosphates du squelette oligonucléique.

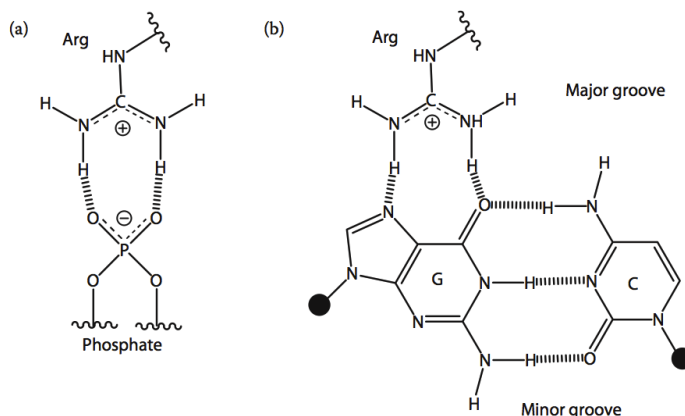


Figure 1-15. Interactions possibles impliquant le résidu basique arginine et (a) un groupement phosphate ou (b) une nucléobase guanine

Parmi les différentes nucléobases i.e., thymine, cytosine, adénine et guanine, les deux dernières (i.e., les bases pyrimidiques) montrent le plus grand potentiel à former des interactions de type liaison hydrogène ($G > A > C > T$). Cette tendance s'explique par le nombre de sites accessibles pour former des interactions de type liaison hydrogène ; en effet, la guanine propose sur ces tranches non-appariées (avec une cytosine) 4 sites de formation de liaisons hydrogènes (dont 3 sont accepteurs, **Figure 1-14**), alors que l'adénine ne propose que 3 sites (dont 2 sont accepteurs, **Figure 1-14**) et enfin la cytosine

³³ H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne ; The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 235–242.

³⁴ H. M. Berman, W. K. Olson, D. L. Beveridge, J. Westbrook, A. Gelbin, T. Demeny, S. H. Hsieh, A. R. Srinivasan, B. Schneider ; The nucleic-acid database a comprehensive relational database of 3-dimensional structures of nucleic-acids. *Biophys. J.*, **1992**, 63, 751–759.

CHAPITRE 1 :

et la thymine ne proposent chacune que 2 sites (dont 1 est accepteur, **Figure 1-14**). Chaque nucléobase (seule ou appariée à la nucléobase complémentaire) peut entrer en interaction avec la chaîne latérale des acides aminés *via* de nombreux arrangements tridimensionnels (ou conformations). Parmi les 129 NCX de protéine/duplex d'ADN examinés par *Thornton and co-workers*³¹, la guanine est impliquée dans 50% des interactions de type liaison hydrogène avec les chaînes latérales des acides aminés. L'arginine, qui est impliquée dans plus de 40% des NCI avec les nucléobases, forme avec la guanine les interactions les plus stables (des interactions acides aminé/nucléobase) même si des interactions avec l'adénine et la thymine sont aussi possibles. Un exemple d'interaction arginine/guanine est donné dans la **Figure 15b** bien que d'autres conformations soient possibles. Les interactions lysine/guanine sont les secondes les plus fréquemment trouvées. Les résidus polaires de l'asparagine et de la glutamine montrent une grande affinité pour l'adénine (mais moins importante que les interactions précédemment décrites). Enfin la serine et la thréonine interagissent essentiellement avec les groupements phosphates du squelette de l'ADN.

Étonnamment, les interactions de contacts de type Van der Waals représentent 2/3 de toutes les NCI stabilisant les NCX d'ADN/protéine. Les interactions de Van der Waals impliquant le squelette du brin d'ADN (phosphate + sucre) sont grandement majoritaires (> 75%). Les nucléobases et les acides aminés impliqués dans ces interactions sont différents de ceux décrits ci-dessus pour les liaisons hydrogènes. Le nombre d'interactions de type Van der Waals décroît dans l'ordre suivant : Lys > Arg > Thr > Phe > Asn > Gln et T > A > G > C, respectivement, selon les acides aminés et les nucléobases participants. Des affinités particulières ont été soulignées pour les couples acides aminés/nucléobases suivants : thréonine / thymine, phénylalanine ou glutamine / adénine ou thymine, et arginine / guanine.

Les molécules d'eau peuvent assister les interactions entre les chaînes latérales des acides aminés et les brins d'ADN. Ces interactions représentent près de 15% de toutes les NCI stabilisant les NCX d'ADN/protéines. Elles impliquent principalement les groupements phosphates du squelette des brins d'ADN et les acides aminés basiques ou polaires (Arg, Lys, Asn, Ser, Thr, Glu, Gln et Asp).

II. 3. b. Exemples de structures de complexes ADN/protéines

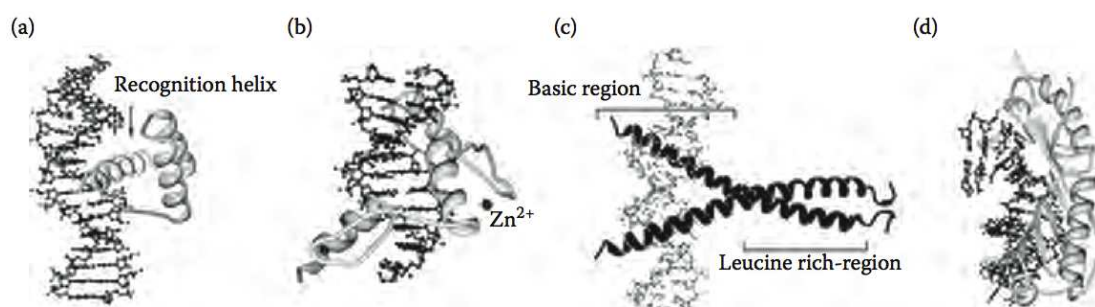


Figure 16. Exemples représentatifs des motifs protéiques se liants aux duplex d'ADN : (a) le motif HTH dans l'*homeodomain DNA complex*³⁵(3HDD), (b) le motif ZF dans le *zif268-DNA complex*³⁶(1ZAA), (c) le motif LZ dans le *GCN4-DNA complex*³⁷(1DGC), et (d) le motif feuillet β dans la *TATA-binding protein*³⁸(1YTB). Les codes de désignations PDB sont donnés entre parenthèses.

Un grand nombre de structures (résolues par RMN ou Rayon X) de NCX « ADN/protéine » sont disponibles dans les banques et bases de données, *e.g.* PDB et NAD, et les repliements de protéines les plus communes, impliquées dans ces NCX, sont bien identifiés. Bien que les protéines puissent se lier à l'ADN *via* de nombreuses conformations, elles présentent parfois des motifs structuraux caractéristiques similaires pour la reconnaissance des brins d'ADN^{25,39}. L'hélice α est le motif structural le plus couramment rencontré dans les interactions avec les brins d'ADN. Elle est généralement incluse dans des motifs structuraux de reconnaissance plus complexes, tels que les motifs « hélice-virage-hélice » (*HTH* pour *Helix-Turn-Helix*, **Figure 1-16a**)^{40,41}, les motifs « doigt de zinc » (*ZF* pour *Zinc Finger*, **Figure 1-16b**)⁴² et les motifs de « glissières à

³⁵ E. Fraenkel, M. A. Rould, K. A. Chambers, C. O. Pabo ; Engrailed homeodomain–DNA complex at 2.2 angstrom resolution: A detailed view of the interface and comparison with other engrailed structures. *J. Mol. Biol.*, **1998**, 284, 351–361.

³⁶ N. P. Pavletich, C. O. Pabo ; Zinc finger DNA recognition crystal-structure of a Zif268-DNA complex at 2.1-Å. *Science*, **1991**, 252, 809–817.

³⁷ P. Konig, T. J. Richmond ; The x-ray structure of the Gcn4-Bzip bound to Atf Creb site DNA shows the complex depends on DNA flexibility. *J. Mol. Biol.*, **1993**, 233, 139–154.

³⁸ Y. C. Kim, J. H. Geiger, S. Hahn, P. B. Sigler ; Crystal-structure of a yeast Tbp Tata-box complex. *Nature*, **1993**, 365, 512–520.

³⁹ N. M. Luscombe, S. E. Austin, H. M. Berman, J. M. Thornton ; An overview of the structures of protein–DNA complexes. *Genome Biol.*, **2000**, 1, 1–10.

⁴⁰ R. G. Brennan, B. W. Matthews ; The helix–turn–helix DNA-binding motif. *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 1903–1906.

⁴¹ S. C. Harrison, A. K. Aggarwal ; DNA recognition by proteins with the helix–turn–helix motif. *Ann. Rev. Biochem.*, **1990**, 59, 933–969.

⁴² S. A. Wolfe, L. Nekludova, C. O. Pabo ; DNA recognition by Cys(2)His(2) zinc finger proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2000**, 29, 183–212.

CHAPITRE 1 :

Leucine » (*LZ* pour *Leucine-Zipper*, **Figure 1-16c**). Généralement, les protéines spécifiques à une séquence se lient par le grand sillon du duplex, plutôt que par le petit sillon, en raison du plus grand nombre d'interactions possibles (**Figure 1-14**). De plus, notons que les duplex d'ADN restent, dans la plupart des cas, dans une conformation de type-B après appariement avec la protéine.

CHAPITRE 1 :

CHAPITRE 2 :

La détection par spectrométrie de masse des complexes non-covalents ADN/protéine

Bien que la spectrométrie de masse (*MS*) ne puisse apporter les détails structuraux fournis par la cristallographie par rayon X ou la RMN et qu'elle soit une méthode destructive, elle nécessite une plus faible quantité d'échantillon et permet d'obtenir des informations importantes sur la stœchiométrie et sur la nature des appariements¹. Les principaux avantages de la *MS* proviennent de la combinaison unique entre la haute sensibilité, la sélectivité et la rapidité (« les 3 S distinctifs de la *MS* » selon McLafferty pour *high Sensibility, Selectivity and Speed*). La *MS* propose une approche rapide et efficace pour l'étude de *NCX* sans consommation excessive d'échantillon et sans marquage préalable des partenaires. L'identification et la stœchiométrie des espèces présentes dans le complexe peuvent être déduites simultanément des mesures de masses moléculaires précises. Des expériences *MS* et *MS* en tandem (*MS/MS*) fournissent de nombreux détails sur la nature des partenaires composant le complexe (même dans le cas de petits ligands), et répondent partiellement aux questions de spécificité et de stabilité des complexes. Les proportions des espèces en solution (et/ou en phase gazeuse) et leurs énergies d'appariements en phase gazeuse peuvent être examinées par différentes méthodes².

Henion and co-workers^{3,4}, suivis par *Chait and co-workers*⁵, ont été les premiers à décrire la détection de complexes non-covalents (*NCX*) par spectrométrie de masse. Depuis lors, la détection d'une grande variété de *NCX* a été rapportée dans la littérature : « protéine/protéine », « protéine/acide nucléique », « protéine/carbohydre », « protéine/métal » et « protéine/ligand ».

¹ J.M. Daniel, S. D. Friess, S. Rajagopalan, S. Wendt, R. Zenobi ; Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2002**, 216, 1–27.

² J. M. Daniel, S. D. Friess, S. Rajagopalan, S. Wendt, R. Zenobi ; Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2002**, 216, 1–27.

³ B. Ganem, Y. T. Li, J. D. Henion ; Detection of noncovalent receptor ligand complexes by mass-spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113(16), 6294–6296.

⁴ B. Ganem, Y. T. Li, J. D. Henion ; Observation of noncovalent enzyme substrate and enzyme product complexes by ion-spray mass-spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113(20), 7818–7819.

⁵ V. Katta, B. T. Chait ; Observation of the Heme Globin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass-spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113(22), 8534–8535.

CHAPITRE 2 :

L'étude de NCX de protéines a fait l'objet de nombreuses revues^{6,7,8,9,10,11}. Même si le potentiel des études par MS pour la caractérisation de complexes protéine/acide nucléique a été reconnu, le nombre de publications examinant leurs comportements reste limité^{12,13,14,15,16}. Toutes les techniques de désorption/ionisation ne proposent pas forcément les conditions de transferts vers la phase gazeuse suffisamment douces, mais nécessaires au maintien de la majorité des faibles interactions non-covalentes (préexistantes en milieu physiologique). L'ionisation par électro-nébulisation (*ESI* pour *ElectroSpray Ionization*) et les techniques analogues à débit réduit, *e.g.* le micro-ESI et le nano-ESI, sont devenues les techniques d'ionisation les plus utilisées pour la caractérisation de NCX de par la « douceur » des processus de désorption/ionisation et de leur compatibilité avec des conditions non dénaturantes^{17,18}. Bien que la plupart des études par MS examinant les NCX aient été réalisées par ESI, l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (*MALDI* pour *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) a aussi été utilisée dans ce domaine^{19,20}.

⁶ T. D. Veenstra ; Electrospray ionization mass spectrometry in the study of biomolecular non-covalent interactions. *Biophys. Chem.*, **1999**, 79(2), 63–79.

⁷ J. A. Loo ; Electrospray ionization mass spectrometry : A technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, 200(1–3), 175–186.

⁸ B. Ganem, J. D. Henion ; Going gently into flight : Analyzing noncovalent interactions by mass spectrometry, *Bioorganic Med. Chem.* 11(3), 311–314, 2003.

⁹ A. R. J. Heck, R. H. H. van den Heuvel ; Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **2004**, 23(5), 368–389.

¹⁰ S. Akashi ; Investigation of molecular interaction within biological macromolecular complexes by mass spectrometry. *Med. Res. Rev.*, **2006**, 26(3), 339–368.

¹¹ J. A. Loo ; Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, 16(1), 1–23.

¹² C. L. Hanson, C. V. Robinson ; Protein–nucleic acid interactions and the expanding role of mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279(24), 24907–24910.

¹³ F. Rusconi, F. Guillonneau, D. Praseuth ; Contributions of mass spectrometry in the study of nucleic acid-binding proteins and of nucleic acid–protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.*, **2002**, 21(5), 305–348.

¹⁴ M. Przybylski, J. Kast, M. O. Glocker, E. Durr, H. R. Bosshard, S. Nock, M. Sprinzl ; Mass spectrometric approaches to molecular characterization of protein–nucleic acid interactions. *Toxicol. Lett.*, **1995**, 82, 567–575.

¹⁵ T. D. Veenstra ; Electrospray ionization mass spectrometry: A promising new technique in the study of protein/DNA noncovalent complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, 257(1), 1–5.

¹⁶ J. L. Beck, M. L. Colgrave, S. F. Ralph, M. M. Sheil ; Electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotide complexes with drugs, metals, and proteins. *Mass Spectrom. Rev.*, **2001**, 20(2), 61–87.

¹⁷ J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse ; Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989**, 246, 64–71.

¹⁸ M. Wilm, M. Mann ; Analytical properties of the nanoelectrospray ion source, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 1–8.

¹⁹ M. Karas, F. Hillenkamp ; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299–2301.

²⁰ T. B. Farmer, R. M. Caprioli ; Determination of protein–protein interactions by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **1998**, 33, 697–704.

I. La désorption/ionisation sous vide des complexes biologiques non-covalents

Depuis l'introduction du MALDI par *Hillenkamp and co-workers*²¹, et de la désorption laser de surface (*SLD* pour *Surface Laser Desorption*) par *Tanaka et al.*²², la détection d'un grand nombre de NCX (protéine/protéine, protéine/ADN, peptide métal, *etc.*) a été rapportée par MALDI-MS²³ et cette technique d'ionisation semble être une méthode alternative à l'ESI pour l'étude des NCI.

La production d'ions (majoritairement mono-chargés) en phase gazeuse par MALDI résulte de l'irradiation sous vide par un laser pulsé d'une cible composée de cristaux de matrice dans laquelle les analytes sont dispersés²⁴. La plupart des lasers utilisés dans le cadre du MALDI émettent dans l'ultra-violet (*UV*, $\lambda_{\text{émission}} = [266 ; 337 ; 355]$ nm) avec une durée de pulsation de quelques nanosecondes. Les matrices utilisées sont des petits composés organiques (M_w de 100 à 250 Da) absorbant à une longueur d'onde ($\lambda_{\text{absorption}}$ proche de $\lambda_{\text{émission}}$) dépendante de leur structure²⁴.

La préparation des échantillons est d'une importance majeure en MALDI-MS. Le choix de la matrice appropriée (en plus grandes proportions) est la clé du succès des analyses²⁵. Dans la méthode de préparation des échantillons initialement utilisée, dite « de la goutte séchée » (pour *dried droplet*)¹⁹, l'analyte en solution aqueuse est mélangé à une solution de matrice très concentrée, et des gouttes de ce mélange sont déposées sur la cible MALDI puis sont évaporées sous air sec. Les matrices les plus utilisées (pour une majorité des molécules biologiques et polymères) sont des acides carboxyliques aromatiques²⁵ : l'acide 2,5-dihydroxy-benzoïque (*DHB*), l'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique (*CHCA*), l'acide 3,5-dimethoxy-4 hydroxy-cinnamique (*SA* pour *Sinapinic Acid*) ou l'acide 3-hydroxy-picolinique (*3-HPA*). Par définition,

²¹ a) M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp ; Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 2935-2939. b) M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp ; Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1987**, 78, 53-68.

²² K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida ; Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 151-153.

²³ G. Bolbach ; Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of non-covalent complexes: Fundamentals and applications. *Curr. Pharm. Des.*, **2005**, 11, 2535-2557.

²⁴ R. Knochenmuss, R. B. Cole ; Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, 2nd ed.; R. B. Cole Ed.: John Wiley and Sons, **2010**; MALDI Ionization Mechanisms : an Overview, 149-183.

²⁵ M. Hossain, P. A. Limbach, R. B. Cole ; Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, 2nd ed.; R. B. Cole Ed.: John Wiley and Sons, **2010**; A Comparison of MALDI Matrices, 185-244.

CHAPITRE 2 :

cet environnement majoritairement composé de matrice organique acide n'est pas idéal pour la conservation de NCX au plus près des conditions physiologiques²⁵.

Afin d'être détectés, les NCX doivent survivre²⁶ : (i) au sein de la matrice jusqu'à la fin de la préparation de la cible (*i.e.*, l'évaporation complète du solvant), puis (ii) à l'irradiation laser, et enfin (iii) aux processus de désorption/ionisation sous vide. Pour la détection de NCX, l'intensité du laser est généralement maintenue aussi basse que possible, et dans le cas de complexes « protéine/ADN », les meilleurs résultats sont obtenus avec des matrices non-acides comme la 6-aza-2-thiothymine (*ATT*), et la 2,4,6-trihydroxy-acetophenone (*2,4,6-THAP*) en présence d'acétate d'ammonium et/ou de citrate d'ammonium pour atteindre une valeur de pH compatible avec la stabilité du complexe²⁶. Les solvants organiques et le séchage sous vide, qui sont souvent utilisés pour accélérer le séchage, sont donc aussi à proscrire.

II. La désorption/ionisation à pression atmosphérique par électro-nébulisation

Depuis son introduction par *Dole et al.*²⁷, et son adaptation à l'étude de biomolécules d'intérêt médical par *Fenn et al.*²⁸ (qui lui a valu le prix Nobel de Chimie en 2002)^{29,30}, la détection d'un grand nombre de NCX (protéine/protéine, protéine/ADN, peptide métal, *etc.*) a été rapportée par ESI-MS³¹ et cette technique de désorption/ionisation s'est imposée comme la technique maitresse pour l'étude des NCI³².

²⁶ W. Buchmann, J. H. Banoub, P. A. Limbach ; Mass Spectrometry of Nucleosides and Nucleic Acids ; CRC Press : Taylor and Francis Group, **2010**; Characterization of Noncovalent Complexes of Nucleic Acids with Peptides and Proteins by Mass Spectrometry, 329-369.

²⁷ M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice ; Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*, **1968**, *49*, 2240–2249.

²⁸ (a) M. Yamashita, J. B. Fenn ; Electrospray ion source, Another variation of the free-jet theme. *J. Phys. Chem.*, **1984**, *88*, 4451–4459. (b) M. Yamashita, J. B. Fenn ; Negative ion production with the electrospray ion source. *J. Phys. Chem.*, **1984**, *88*, 4671–4675.

²⁹ J.-C. Tabet, S. Rebuffat ; Prix Nobel de chimie 2002, Spectrométrie de masse et Résonance magnétique nucléaire. *Médecine/Sciences*, **2003**, *19*, 865-872.

³⁰ J. B. Fenn ; Electrospray wings for molecular elephants. “Nobel Lecture” disponible sur : http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/fenn-lecture.pdf

³¹ R. D. Smith, J. L. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, M. Busman, H. R. Udseth ; Principles and practice of electrospray ionization mass spectrometry for large peptides and proteins. *Mass Spectrom. Reviews*, **1991**, *10*, 359–451.

³² J. Laskin, C. Lifshitz ; Principles of Mass Spectrometry Applied to Biomolecules, *John Wiley & Son* (Hoboken, NJ), **2006**.

II. 1. Production des ions en phase gazeuse

La production d'ions en phase gazeuse par ESI peut être divisée en trois étapes successives^{33,34} : (a) la production de gouttelettes chargées à l'extrémité du capillaire d'électro-nébulisation, (b) le rétrécissement des gouttelettes chargées par évaporation et leur fission menant à des microgouttelettes capables de produire des agrégats chargés, et (c) la production d'agrégats chargés *i.e.*, d'ions solvatés en phase gazeuse, *via* un modèle adapté à la taille de l'analyte. Bien que les limites spatiales et temporelles de ces étapes soient plus ou moins bien définies, elles se produisent toutes dans la région à pression atmosphérique du spectromètre de masse³⁵.

II. 1. a. Formation des gouttelettes multichargées

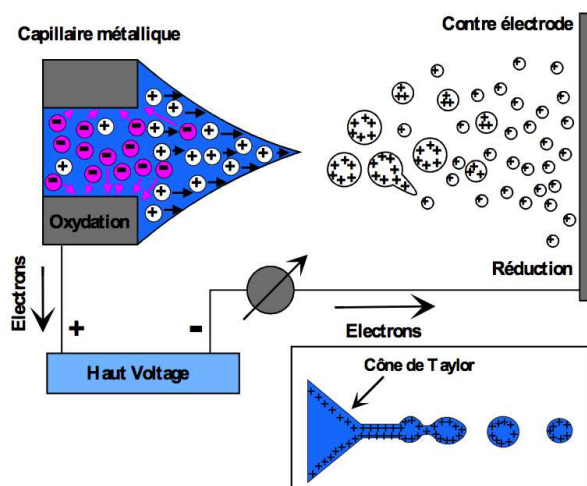


Figure 2-1. Représentation schématique de la formation de gouttelettes chargées positivement³⁵.

L'application d'une différence de potentiel de quelques kilovolts (de l'ordre de +/- 3~5 kV), entre une aiguille d'introduction (de l'échantillon) métallisée de faible diamètre (de l'ordre de 0,1~0,2 mm) et une contre-électrode distantes de quelques centimètres (de l'ordre de 1~3 cm), génère un champ électrique intense dans cette région³⁵. L'échantillon en solution introduit à faible débit (de l'ordre de 2~5 $\mu\text{L}/\text{min}$) dans cette région, *via* un capillaire en verre coaxial (et inclus) dans l'aiguille

³³ A. G. Bayley ; Electrostatic Spraying of Liquids. *John Wiley & Sons* (New York), **1988**.

³⁴ Electropray: Theory and applications. *Special issue of J. Aerosol Sci.*, **1994**, 25, 1005–1252.

³⁵ P. Kebarle, U. H. Verkerk, R. B. Cole ; Electropray and MALDI Mass Spectrometry, 2nd ed.; R. B. Cole Ed.: John Wiley and Sons, **2010**; On the Mechanism of Electropray Ionization Mass Spectrometry (ESIMS), 3-48.

CHAPITRE 2 :

d'introduction, est soumis à ce champ électrique intense³⁵. Il en résulte une séparation des charges par migration ionique déformant l'extrémité du liquide qui forme désormais un cône dit de Taylor³⁶ (**Figure 2-1**). Lorsque le champ électrique appliqué est suffisamment intense, les répulsions coulombiennes dépassent la tension superficielle de la solution induisant l'émission continue d'un jet de gouttelettes hautement chargées (ou nébulisat) à partir de la pointe du cône de Taylor³⁷. Ces gouttelettes hautement chargées sont entraînées par le gradient de potentiel dirigé vers l'orifice d'entrée du spectromètre de masse. Notons que dans certains cas, *e.g.* des composés sensibles ou l'application d'une tension trop forte, des réactions d'oxydation et de réduction peuvent survenir sur l'aiguille métallisée ou sur la contre électrode. La stabilité du nébulisat dépend³⁵ : (i) du débit de la solution, (ii) du diamètre du capillaire d'introduction, mais aussi de paramètres plus spécifiques à la solution comme (iii) sa tension superficielle, (iv) sa constante diélectrique, (v) sa conductivité, et/ou (vi) sa viscosité (**Tableau 2-1**).

Solvants	T _{eb} [°C]	Viscosité η [cP] (à 25°C)	Tension superficielle γ [mN/m] (à 25°C)	Constante diélectrique ϵ (à 25°C)
Méthanol	64,7	0,544	22,07	32,66
Acétonitrile	81,6	0,400	19,00	37,50
Eau	100	0,890	71,99	78,38

Tableau 2-1. Constantes physico-chimiques des solvants les plus couramment utilisés en ESI (issues de la base de données NIST).

Les solutions ayant une valeur de tension superficielle élevée, *e.g.* l'eau pure, forment plus difficilement un cône de Taylor et donc le jet d'émission indispensable à la formation des gouttelettes chargées³⁷. Dans ce cas, l'application d'un champ électrique plus intense est nécessaire mais peut induire des décharges (ou arcs électriques) nuisibles à l'analyse, *e.g.* risquer de nuire à l'intégrité : (i) de l'analyte *via* des réactions d'oxydation et de réduction, ou (ii) des électrodes appliquant le champ électrique qui ne sont pas conçues pour subir (très longtemps) de tels assauts. L'addition d'un solvant organique, *e.g.* méthanol ou acétonitrile, facilite la production de gouttelettes chargées en

³⁶ G. I. Taylor ; The stability of horizontal fluid interface in a vertical electric field. *J. Fluid. Mech.*, **1965**, 2, 1–15.

³⁷ J. Fernandez de la Mora ; The fluid dynamics of Taylor cones. *J. Annu. Rev. Fluid. Mech.*, **2007**, 39, 217–243.

diminuant la tension superficielle de la solution aqueuse et permet de travailler à des valeurs de tension raisonnables³⁷.

II. 1. b. Evaporations et fissions successives des gouttelettes

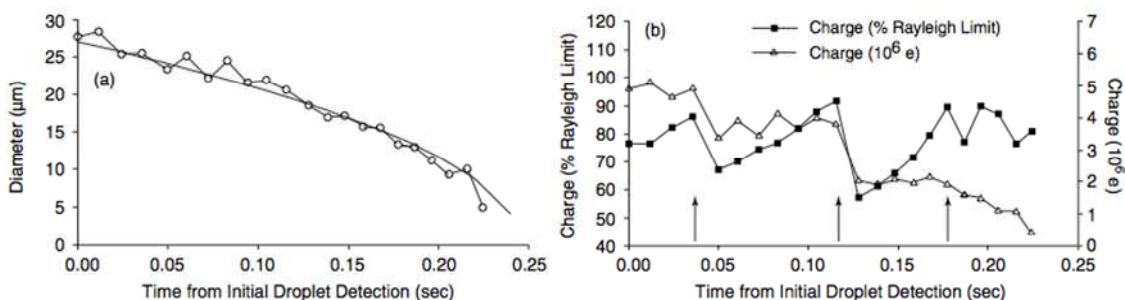


Figure 2-2. Evaporation et décharge de gouttelettes d'eau chargées positivement dans un gaz inerte chauffé (N₂; P_{atm}, 317K) et un champ électrique faible (51 V/cm). **(a)** Variation du diamètre de la gouttelette en fonction du temps. **(b)** Variation des charges de la gouttelette en fonction du temps, représentée par le nombre de charges élémentaires et par le pourcentage de la limite de Rayleigh. Les flèches indiquent les événements de décharges. Notons que les gouttelettes d'eau sont à 90% et à 65% de la limite de Rayleigh respectivement, avant et après les événements de décharges³⁸.

Une fois les gouttelettes chargées émises, l'évaporation partielle du solvant induit une réduction de la taille des gouttelettes bien que le nombre de charges reste constant³⁸ (**Figure 2-2a**). Afin de minimiser les répulsions coulombiennes, les charges (par exemple, positives par ESI(+)) se répartissent à la surface de chaque gouttelette. Ce phénomène d'évaporation se réitère jusqu'au moment où les répulsions coulombiennes deviennent égales à la tension superficielle qui maintient la cohésion de la gouttelette. Ce point, appelé la limite de Rayleigh³⁹, est décrit par l'**Equation 2-1**, où z_r est la limite de charge unitaire, e est la charge élémentaire, ϵ_0 est la permittivité du milieu, γ est la tension superficielle et R est le rayon de la gouttelette. Lorsque cette limite est dépassée, la gouttelette se déforme puis explose.

$$\text{(Eq. 2-1)} \quad z_r e = 8\pi (\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}$$

³⁸ R. L. Grimm, J. L. Beauchamp ; Dynamics of field induced droplet ionization: Time resolved studies of distortion, jetting and progeny formation from charged and neutral methanol droplets exposed to strong electric fields. *J. Chem. Phys. B*, **2005**, *109*, 8244–8250.

³⁹ Lord J. W. S. Rayleigh ; On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos. Mag. Ser. 5*, **1882**, *14*, 184–186.

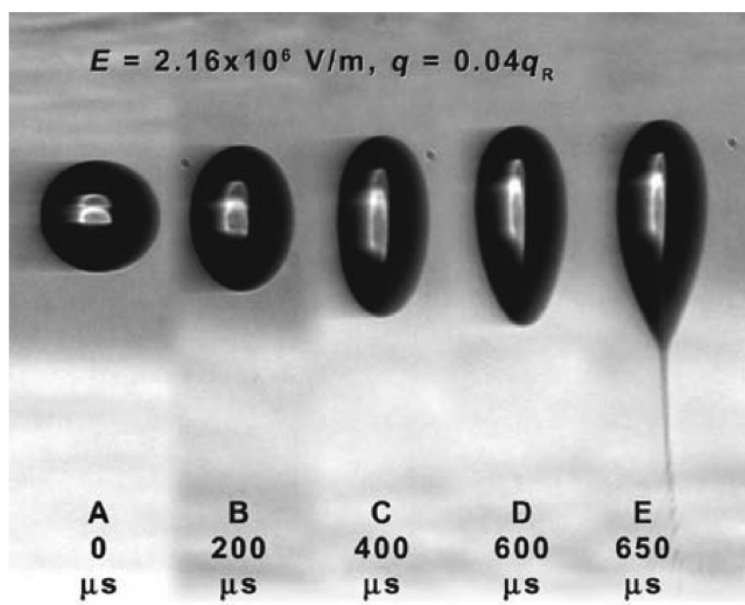


Figure 2-3. Série d'images de gouttelettes de méthanol (diamètre : 225 μm , charge : 4% de la limite de Rayleigh) subissant des distorsions asymétriques sous l'action d'un champ électrique ($2,16 \cdot 10^6$ V/m) correspondant au minimum pour lequel une « ionisation de gouttelettes induite par champ » (*FIDI* pour *Field-Induced Droplet Ionization*) est observée. Le jet de l'image E montre l'instabilité capillaire et la formation des gouttelettes filles (diamètre : ~ 10 μm)⁴⁰.

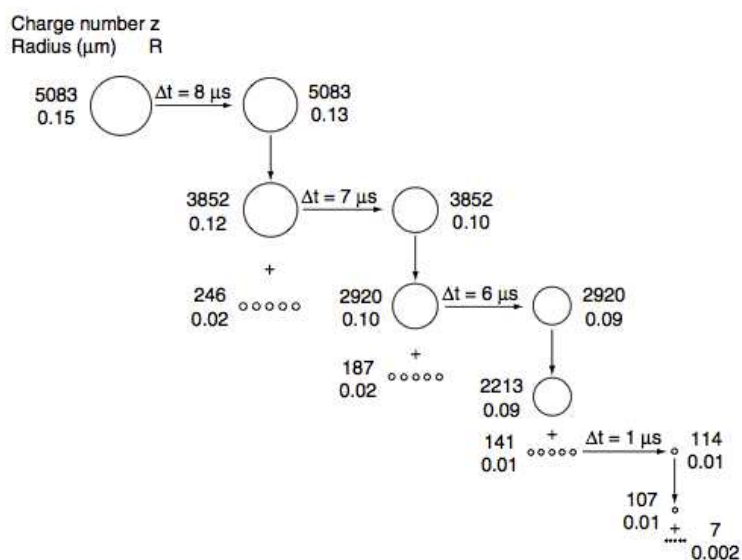


Figure 2-4. Exemple de cascade coulombienne issue de gouttelettes d'eau chargées formées par nano-ESI. z et R donnent respectivement le nombre de charges et le rayon des gouttelettes. Notons que les charges à la surface de la gouttelette parent représentent 90% et 70% de la limite de Rayleigh respectivement, avant et après fission et que les charges de la gouttelette fille nouvellement formée représentent 70% de la limite de Rayleigh⁴¹.

Les gouttelettes n'explorent pas en deux parties égales (fission symétrique), elles subissent une déformation ellipsoïdale et émettent un jet de microgouttelettes⁴⁰ (**Figure 2-3**). Les microgouttelettes, dites gouttelettes filles, n'ont ni la même taille ni la même charge (fission dissymétrique). Les fissions symétriques sont peu observées pour des solutions aqueuses et sont plus probables pour des solvants apolaires de faible conductivité, qui sont moins soumis au champ électrique. Les microgouttelettes, formées par fission dissymétrique, subissent à leur tour le phénomène d'évaporation et se scindent lorsque la limite de Rayleigh est à nouveau atteinte⁴¹ (**Figure 2-4**). Ces processus alternatifs d'évaporation et d'explosion (ou cascade d'explosions coulombiennes) se répètent jusqu'à ce que les gouttelettes filles soient suffisamment petites pour libérer des ions solvatés (ou agrégats) en phase gazeuse⁴¹.

II. 1. c. Modèles de production des agrégats chargés

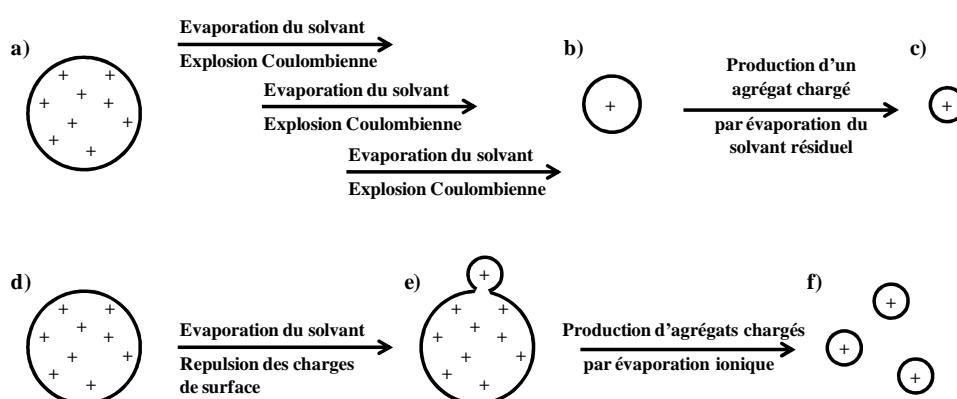


Figure 2-5. Représentation schématique de la production d'agrégats chargés en phase gazeuse par ESI (**a, b, c**) *via* CRM et (**d, e, f**) *via* IEM. Les signes (+) représentent les ions solvatés, (**a, b, d, e**) en solution et (**c, f**) en phase gazeuse, qui peuvent être multichargés de manières différentes.

Les processus de libération des ions solvatés en phase gazeuse à partir de microgouttelettes chargées ont été interprétés par plusieurs mécanismes qui ont été proposés³⁵. Deux modèles de production d'agrégats chargés se sont démarqués : (i) le

⁴⁰ R. L. Grimm, J. L. Beauchamp ; Field induced droplet ionization mass spectrometry. *J. Chem. Phys. B*, **2003**, *107*, 14161–14163.

⁴¹ M. Peschke, U. H. Verkerk, P. Kebarle ; Features of the ESI mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent complexes and the determination of the association constant by the titration method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, *15*, 1424–1434.

CHAPITRE 2 :

modèle du résidu chargé⁴² (*CRM* pour *Charged Residu Model* ; **Figure 2-5a, -5b et -5c**) et, (ii) le modèle de l'évaporation ionique⁴³ (*IEM* pour *Ion Evaporation Model* ; **Figure 2-5d, -5e, -5f**).

(i) Modèle du résidu chargé

Les premiers travaux examinant la production d'ion en phase gazeuse par désorption/ionisation de gouttelettes chargées formées par ESI ont été réalisés par *Dole et al.*⁴². Dans cette approche, lorsqu'une cascade d'explosions coulombiennes a engendré de très petites gouttelettes (de l'ordre du nanomètre) ne contenant chacune plus qu'un seul analyte (**Figure 2-5d**), quelques centaines de molécules des solvants et, éventuellement des sels, les processus d'évaporation se poursuivent (sans explosion) jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'un agrégat chargé en phase *i.e.*, un ions solvatés par un grand nombre fini de molécules de solvants (**Figure 2-5e**). Ces ions solvatés peuvent être formellement chargés, chargés par protonation ou chargés par adduction avec les sels éventuellement présents.

(ii) Modèle de l'évaporation ionique

L'autre modèle sur lequel sont fondées de nombreuses études a été proposé par *Iribarne and Thomson*⁴³. Ce modèle décrit la désorption d'agrégats chargés (ou émission ionique) directement à partir de la surface des microgouttelettes hautement chargées. Lorsque la limite Rayleigh est atteinte au rayon critique (de l'ordre de 8 nm et de 70 charges élémentaires) l'émission ionique par désorption de surface, résultant de la répulsion entre les ions (analytes et/ou électrolytes) présents à la surface de microgouttelette⁴⁴ (**Figure 2-6**), entre en compétition avec les fissions coulombiennes pour libérer le système de cet excès de charges. Le traitement théorique du modèle d'*Iribarne and Thomson*⁴³ est dit « thermique » *i.e.*, il repose sur la théorie de l'état de

⁴² M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice ; Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*, **1968**, 49, 2240–2249.

⁴³ (a) J. V. Iribarne, B. A. Thomson ; On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.*, **1976**, 64, 2287–2294. (b) B. A. Thomson, J. V. Iribarne ; Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J. Phys. Chem.*, **1979**, 71, 4451–4463.

⁴⁴ L. Tang, P. Kebarle ; Dependence of the ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3654–3668.

transition. Dans ce modèle, la constante de vitesse d'émission d'ions (k_I) à partir d'une gouttelette est donnée par l'Equation 2-2, où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température, h est la constante de Planck et ΔG^\ddagger est l'énergie libre d'activation qui a été évaluée sur les bases du modèle de la Figure 2-6.

$$\text{(Eq. 2-2)} \quad k_I = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / k_B T}$$

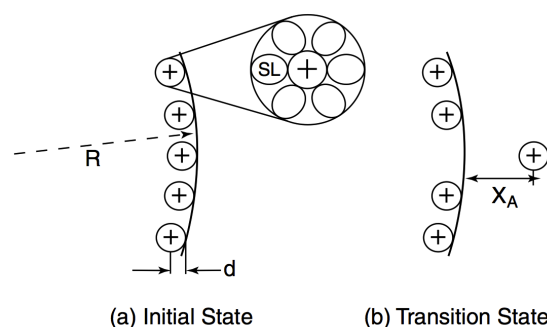


Figure 2-6. Modèle basé sur l'équation d'Iribarne et Thomson. Représentation d'une partie de gouttelette de rayon R . **(a)** Etat initial correspondant à un excès d'ions positifs (solvatés par plusieurs molécules de solvants) localisés juste en-dessous de la surface de la microgouttelette. **(b)** Etat de transition correspondant à l'éjection d'un ion (et de sa sphère de solvation) par activation thermique⁴⁴.

A ce jour, aucun de ces modèles de production d'agrégats chargés en phase gazeuse ne fait l'unanimité et chacun fait l'objet de contestations. Cependant, une implication compétitive des deux modèles^{45,46} (qui n'interfèrent que très peu) semble cohérente avec la majorité des résultats publiés dans ce domaine. *Smith and co-workers*^{47,48} et *Fernandez de la Mora and co-workers*⁴⁹ ont très tôt fourni des indices que les ions de macro-édifices (de plus faible mobilité en solution), *e.g.* des protéines et des polymères (*e.g.* des dendrimères poly-alkylamines), sont principalement produits *via*

⁴⁵ R. B. Cole ; Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 763–772.

⁴⁶ P. Kebarle ; A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 804–817.

⁴⁷ B. A. Winger, K. J. Light-Wahl, R. R. Ogorzalec-Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith ; Observations and implications of high mass-to-charge ratio ions from electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **1993**, *4*, 536–545.

⁴⁸ R. P. Tolic, G. A. Anderson, R. D. Smith, H. M. Brothers, R. Spindler, D. A. Tomalia ; Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric characterization of high molecular mass starburst (TM) dendrimers. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1997**, *165*, 405–418.

⁴⁹ J. Fernandez de la Mora ; Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *406*, 93–104.

CHAPITRE 2 :

CRM. En outre, *Fernandez de la Mora and co-workers*⁵⁰ ont montré que les plus petits analytes chargés (plus mobiles en solution^{43,51}) ont une plus grande probabilité de se trouver à la surface hautement chargée de gouttelettes et d'être émis *via* IEM. En effet, l'utilisation de l'un et/ou l'autre des modèles, dépend principalement de la taille, de la nature et de la concentration des ions, aussi bien des analytes que des électrolytes présents en solution. De plus, chacun de ces modèles mène à la production d'agrégats chargés, plus ou moins gros, en phase gazeuse.

II. 2. Désolvation des agrégats chargés en phase gazeuse

La désolvation des agrégats chargés est probablement l'étape la plus importante des processus de désorption/ionisation par ESI. C'est à ce moment *i.e.*, durant le guidage des espèces chargées au sein de l'instrument où l'énergie déposée peut être contrôlée, que les analytes acquièrent leurs charges formelles non solvatées, et par conséquent, leurs énergies internes.

II. 2. a. Conséquences de la désolvation en phase gazeuse sur le choix des grandeurs thermodynamiques utilisées

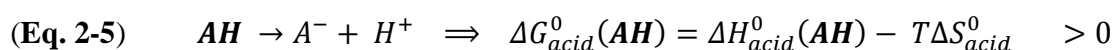
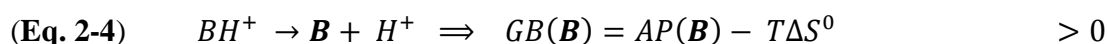
La conséquence majeure du transfert des microgouttelettes (molécules en solution) aux agrégats chargés (molécules en phase gazeuse) est la modification des grandeurs thermodynamiques à considérer pour décrire le comportement des ions. En effet, lorsque le pKa (échelle décrivant l'acidité comme la basicité, et normalisée par l'eau) et l'hydrophobicité (échelle basée sur le coefficient de partage entre un solvant polaire et un solvant apolaire) sont des grandeurs thermodynamiques qui n'ont un sens qu'en solution, les variations d'enthalpie libre standard (ΔG° ; **Equation 2-3**) des

⁵⁰ (a) I. G. Locertales, J. Fernandez de la Mora ; Experiments on the kinetics of field evaporation of small ions from droplets. *J. Chem. Phys.*, **1995**, *103*, 5041–5060. (b) M. Gamero-Castano, J. Fernandez de la Mora ; Kinetics of small ion evaporation from the charge and mass distribution of multiply charged clusters in electrosprays. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 790–803. (c) M. Gamero-Castano, J. Fernandez de la Mora ; Direct measurement of ion evaporation kinetics from electrified liquid surfaces. *J. Chem. Phys.*, **2000**, *113*, 815–832.

⁵¹ (a) S. Chapman ; Carrier mobility spectra of spray electrified liquids. *Phys. Rev.*, **1937**, *52*, 184–190. (b) S. Chapman ; Carrier mobility spectra of liquids electrified by bubbling. *Phys. Rev.*, **1938**, *54*, 520–527. (c) S. Chapman ; Interpretation of carrier mobility spectra of liquids electrified by bubbling and spraying. *Phys. Rev.*, **1938**, *54*, 528–533.

réactions de protonation⁵² (**Equation 2-4**) et de déprotonation⁵³ (**Equation 2-5**) sont des grandeurs qui définissent la stabilité des espèces chargées en phase gazeuse.

$$\text{(Eq. 2-3)} \quad \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$



Les valeurs de GB et de ΔG_{acid}^0 correspondent à la quantité d'énergie nécessaire pour les réactions de déprotonation fictives établies dans le sens endothermique⁵⁴ (**Equations 2-4 et 2-5**). Ces valeurs sont intrinsèques à une fonction chimique dans son état le moins chargé de la molécule, *e.g.* les états moléculaires **B** et **AH** dans les **Equations 2-4 et 2-5**. En phase gazeuse, toute fonction chimique ayant un proton mobile est considérée comme amphotère *i.e.*, elle possède à la fois un caractère basique (une valeur de GB) et un caractère acide (une valeur de ΔG_{acid}^0) utilisés respectivement dans le cas d'analytes positivement et négativement chargés. Cependant, il est important de souligner que (i) plus la valeur de GB (et d'AP) est grande, plus le composé est basique et que, (ii) plus la valeur de ΔG_{acid}^0 (et de ΔH_{acid}^0) est faible, plus le composé est acide.

⁵² (a) S. G. Lias, J. F. Liebman, J. L. Holmes, R. D. Levin, W. G. Mallard ; NIST Positive Ion Energetics (Version 1.0), NIST Standard Reference Database 19A, *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg (Maryland), **1990**. (b) S. G. Lias, S. E. Stein ; NIST Positive Ion Energetics (Version 2.0), NIST Standard Reference Database 19A, *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg (Maryland), **1991**. (c) S. G. Lias, S. E. Stein ; NIST Positive Ion Energetics (Version 3.0), NIST Standard Reference Database 19A, *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg (Maryland), **1993**.

⁵³ (a) J. E. Bartmess ; NIST Negative Ion Energetics (Version 1.0), NIST Standard Reference Database 19B, *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg (Maryland), **1990**. (b) J. E. Bartmess ; NIST Negative Ion Energetics (Version 2.0), NIST Standard Reference Database 19B, *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg (Maryland), **1991**. (c) J. E. Bartmess ; NIST Negative Ion Energetics (Version 3.0), NIST Standard Reference Database 19B, *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg (Maryland), **1993**.

⁵⁴ S. G. Lias, J. E. Bartmess ; Gas-phase Ion Thermochemistry. "Web-book" disponible sur : <http://webbook.nist.gov/chemistry/ion>

II. 2. b. Exemples d'échelles de basicité et d'acidité en phase gazeuse

AA _i	Affinités Protoniques de AA _i (PA[AA _i], kJ/mol)				
	Fenselau ⁵⁷	Bojesen ⁵⁸	Lias ⁶¹	Harrison ⁵⁹	Tabet ⁶²
Gly			884,5	879,9	888,2
Ala			897,9	895,4	895,3
Cys			898,7	894,5	897,1
Ser^a		908,8	906,2	899,5	905,4
Asp		914,6	905,8	904,6	909,4
Val		913,4	907,1	905,0	910,3
Leu^a		915,9	911,7	908,7	911,3
Ile		917,1	915,0	913,7	913,8
Thr^a		917,1	913,7	917,5	914,2
Phe		920,5	905,0	919,2	919,7
Tyr		923,4	929,2	923,4	921,6
Met^a		924,2	925,5	924,2	927,4
Asn		929,3	918,8	922,1	933,3
Glu		930,1	905,0	933,8	934,4
Trp^a		938,5	942,2	935,9	936,3
Pro		930,5	920,4	928,4	936,6
Gln		950,2	912,9	928,0	946,3
Lys	983,6	956,9	962,7	984,8	956,4
His	978,1	964,4	969,3	967,7	958,9
Arg	1024,9			1023,3	

Tableau 2-2. Mesures d'affinités protoniques d'acides aminés déterminées par dissociations compétitives d'hétéro-dimères.
(^a acides aminés utilisés comme bases de références)

Différentes approches expérimentales telles que les mesures à l'équilibre⁵⁵, la méthode cinétique de Cooks⁵⁶ et la méthode isentropique de Fenselau⁵⁷ ont été utilisées sur différents spectromètres de masse, comme des instruments à secteurs⁵⁸ hybrides (*e.g.* le BEqQ⁵⁹), des instruments à multiples quadripôles (*e.g.* le QqQ⁶⁰) ou des instruments à

⁵⁵ J. P. Briggs, R. Yamdagni, P. J. Kebarle ; Intrinsic Basicities of Ammonia Methylamine, Anilines and Pyridine from Gas Phase Proton Exchange Equilibria. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 5128-5130.

⁵⁶ a) R. G. Cooks, T. L. Kruger ; Intrinsic Basicity Determination Using Metastable Ions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 1279-1281. b) S. A. McLuckey, D. Cameron, R. G. Cooks ; Proton Affinities from Dissociations of Proton-Bound Dimers. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 1313-1317.

⁵⁷ a) Z. C. Wu, C. Fenselau ; Proton Affinities of Polyglycines Assessed By Using the Kinetic Method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, *3*, 863-866. b) Z. C. Wu, C. Fenselau ; Structural Determinants of Gas Phase Basicities of Peptides. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 9197-9206.

⁵⁸ J. P. Bojesen, T. Breindahl ; On the Proton Affinity of Some α -Amino Acids and the Theory of the Kinetic Method. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1994**, *2*, 1029-1037.

⁵⁹ a) X. Li, A. G. Harrison ; A kinetic approach to the proton affinities of amine bases. *Org. Mass Spectrom.*, **1993**, *28*, 366. b) A. G. Harrison ; The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acids and Peptides. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, *16*, 201-217.

⁶⁰ S. P. Mirza, S. Prabhakar, M. Vairamani ; Estimation of proton affinity of proline and tryptophan under electrospray ionization conditions using the extended kinetic method. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, *15*, 957-962.

séquences temporelles (e.g. FT-ICR⁶¹ et piège ionique^{62,63}) pour la détermination des échelles relatives et/ou absolues de basicité en phase gazeuse des acides aminés regroupées dans le **Tableau 2-2**. La méthode cinétique de Cooks⁵⁶ a aussi été utilisée en mode négatif (i) à partir d'une source FAB couplée à un tandem à secteur à géométrie inversée⁶⁴, et (ii) à partir d'une source ESI couplée à un piège ionique⁶⁵, pour la détermination d'une échelle d'acidité des acides aminés en phase gazeuse. L'estimation des valeurs $\Delta H^{\circ}_{\text{acid}}$ (**Tableau 2-3**) de chaque acide aminé a été déduite des valeurs de $\Delta G^{\circ}_{\text{acid}}$ en supposant que le terme $T\Delta S^{\circ}$ est constant *i.e.*, $T\Delta S^{\circ} = 29$ kJ/mol.

Acidités en phase gazeuse des AA _i (kJ/mol)			
AA _i	Gronert ⁶⁴		Poutsma ⁶⁵
	$\Delta G^{\circ}_{\text{acid}}$	$\Delta H^{\circ}_{\text{acid}}$	$\Delta H^{\circ}_{\text{acid}}$
Gly	1402,0	1431,0	1434
Ala	1398,5	1427,5	1430
Pro	1395,0	1424,0	1431
Val	1391,0	1420,0	1431
Leu	1390,0	1419,0	1419
Ile	1388,5	1417,5	1423
Lys	1383,0	1412,0	1416
Trp	1380,5	1409,5	1421
Phe	1379,0	1408,0	1418
Tyr	1378,5	1407,5	1413
Met	1376,0	1405,0	1407
Cys	1364,0	1393,0	1395
Ser	1363,0	1392,0	1391
Thr	1360,5	1389,5	1388
Arg	1359,5	1388,5	1381
Asn	1359,0	1388,0	1385
Gln	1359,0	1388,0	1385
His	1356,0	1385,0	1375
Glu			1348
Asp			1345

Tableau 2-3. Mesures d'acidité en phase gazeuse d'acides aminés déterminées par dissociations compétitives d'hétéro-dimères.

⁶¹ E. P. Hunter, S. G. Lias ; Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules: An Update. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1998**, *27*, 413-656.

⁶² C. Afonso, F. Modeste, P. Breton, F. Fournier, J.-C. Tabet ; Proton affinities of the commonly occurring L-amino acids by using electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2000**, *6*, 443-449.

⁶³ A. F. Kuntz, A. W. Boynton, G. A. David, K. E. Colyer, J. C. Poutsma ; The proton affinity of proline analogs using the kinetic method with full entropy analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2002**, *13*, 72-81.

⁶⁴ R. A. J. O'Hair, J. H. Bowie, S. Gronert ; Gas phase acidities of the α amino acids. *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Processes*, **1992**, *117*, 23-36.

⁶⁵ C. M. Jones, M. Bernier, E. Carson, K. E. Colyer, R. Metz, A. Pawlow, E. D. Wischow, I. Webb, E. J. Andriole, J. C. Poutsma ; Gas-phase acidities of the 20 protein amino acids. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2007**, *267*, 54-62.

Les déviations observées entre les différentes échelles de la littérature peuvent s'expliquer par d'importants effets entropiques dûs à des changements conformationnels induits par la présence d'autres sites chargés au sein d'une espèce zwitterionique⁶⁶ ou plus simplement par la méthode expérimentale employée et ses approximations.

II. 2. c. Cas de la n-ième (dé)protonation d'une molécule déjà chargée

*Bursey and Pederson*⁶⁷, suivi par Fenselau and co-workers⁶⁸, ont été les premiers à examiner le comportement d'espèces multichargées en phase gazeuse vis-à-vis des réactions de protonation. Par la suite, *Williams and co-workers*^{69,70,71,72,73,74} ont grandement discuté le modèle des « charges ponctuelles » (pour *Point Charges Model*) permettant de décrire le comportement de ces espèces multi-protonées. Dans ce modèle, les charges sont considérées comme des points fixes sur l'ion et l'influence d'une seconde charge estimée en ajoutant un potentiel de Coulomb à la valeur intrinsèque de GB (GB_{int}) de la molécule considérée⁷⁵. La variation d'enthalpie libre standard apparente (GB_{app}), de la réaction de protonation d'un cation peut donc être calculée par l'**Equation 2-6**, où $r_{i,t}$ est la distance séparant les charges en fonction du temps, ϵ_0 est la permittivité du vide et, ϵ_r est l'écrantage effectif des charges. Ce model ne s'applique qu'aux

⁶⁶ F. Fournier, C. Afonso, A. E. Fagin, S. Gronert, J.-C. Tabet ; Can Cluster Structure Affect Kinetic Method Measurements? The Curious Case of Glutamic Acid's Gas-Phase Acidity. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2008**, *19*, 1887–1896.

⁶⁷ M. M. Bursey, L. G. Pedersen ; The barrier to proton transfer from multiply protonated molecules: a quantum mechanical approach. *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, *27*, 974-975.

⁶⁸ D. Fabris, M. Kelly, C. Murphy, Z. Wu, C. Fenselau ; High-Energy Collision-Induced Dissociation of Multiply Charged Polypeptides Produced by Electrospray. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1993**, *4*, 652-661.

⁶⁹ D. S. Gross, E. R. Williams ; Experimental-Measurement of Coulomb Energy and Intrinsic Dielectric Polarizability of a Multiply Protonated Peptide Ion Using Electrospray-Ionization Fourier-Transform Mass-Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 883-890.

⁷⁰ D. S. Gross, S. E. Rodriguez-Cruz, S. Bock, E. R. Williams ; Measurement of Coulomb Energy and Dielectric Polarizability of Gas-Plate Diprotonated Diaminoalkanes. *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 4034-4038.

⁷¹ P. D. Schnier, D. S. Gross, E. R. Williams ; Electrostatic Forces and Dielectric Polarizability of Multiply Protonated Gas-Phase Cytochrome-C Ions Probed by Ion/Molecule Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 6747-6757.

⁷² D. S. Gross and E. R. Williams ; Structure of gramicidin S (M+H+X)(2+) ions (X=Li, Na, K) probed by proton transfer reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 202-204.

⁷³ P. D. Schnier, D. S. Gross, E. R. Williams ; On the Maximum Charge-State and Proton-Transfer Reactivity of Peptide and Protein Ions Formed by Electrospray-Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1995**, *6*, 1086-1097.

⁷⁴ D. S. Gross, P. D. Schnier, S. E. Rodriguez-Cruz, C. K. Fagerquist, E. R. Williams ; Conformations and folding of lysozyme ions in vacuo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 3143-3148.

⁷⁵ E. R. Williams ; Proton Transfer Reactivity of Large Multiply Charged Ions. *J. Mass Spectrom.*, **1996**, *31*, 831-842.

systèmes multichargés par des réactions acide/base (en opposition aux charges acquises par ionisation électronique).

$$(Eq. 2-6) \quad GB_{app} = GB_{int} - \sum_{i=1}^n \frac{q^2}{(4\pi \epsilon_0) \epsilon_r r_{i,t}}$$

Ce modèle a permis, entre autres, à *Fenselau and co-workers*^{76,77,78} d'adapter la méthode cinétique à la détermination de basicités successives de polypeptides et de protéines (**Figure 2-7a**). Ainsi, la valeur de GB_{app} diminue au fur et à mesure que le nombre de charges positives portées par une protéine augmente (**Figure 2-7b**), montrant qu'il est de plus en plus difficile de déposer un proton à sa surface. Réciproquement, la valeur de $\Delta^0G_{acid,app}$ augmente au fur et à mesure que le nombre de charges négatives portées par une protéine augmente, montrant qu'il est de plus en plus difficile de retirer un proton à sa surface.

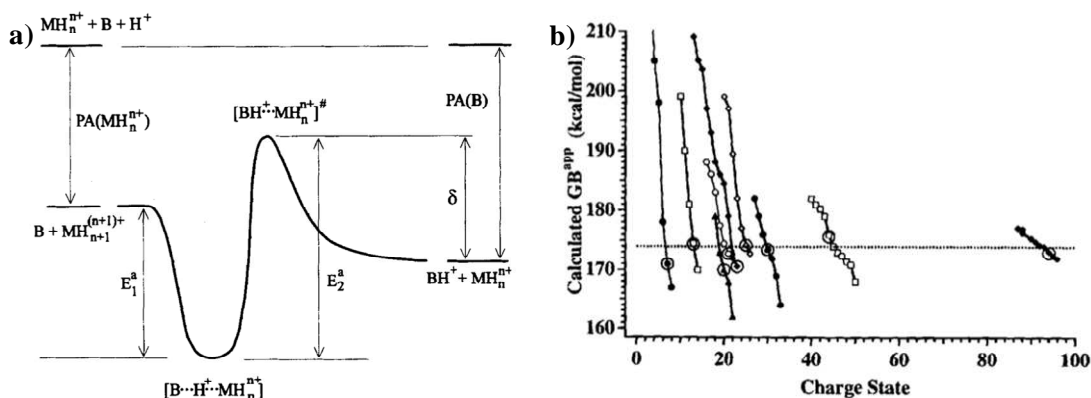


Figure 2-7. (a) Diagramme d'énergie proposé par *Fenselau and co-workers* de la dissociation unimoléculaire d'un hétéro-dimère métastable lié par un proton⁷⁸ (b) Basicités apparentes en phase gazeuse (GB_{app}) calculées (avec $\epsilon_r = 2$) en fonction de l'état de charge de neuf protéines et polypeptides modèles ; de gauche à droite, la melittine, l'ubiquitine, le cytochrome c (de thon), le cytochrome c (de cheval), la ribonucléase A, l'hémoglobine (chaîne α), la myoglobine, l'anhydrase carbonique, l'albumine de sérums bovins. La ligne pointillée indique la valeur de GB du méthanol (174,1 kcal/mol). Les points encadrés correspondent aux états de charges expérimentaux maximum rapportés dans la littérature pour chaque protéine⁷⁵.

⁷⁶ I. A. Kaltashov, D. Fabris, C. C. Fenselau ; Assessment of Gas Phase Basicities of Protonated Peptides by the Kinetic Method. *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 10046–10051.

⁷⁷ I. A. Kaltashov, C. C. Fenselau ; A Direct Comparison of "First" and "Second" Gas Phase Basicities of the Octapeptide RPPGFSPF. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9906–9910.

⁷⁸ I. A. Kaltashov, C. C. Fenselau ; Thermochemistry of Multiply Charged Melittin in the Gas Phase Determined by the Modified Kinetic Method. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 857-861.

II. 3. Application aux complexes biologiques non-covalents

La détection de NCX par ESI-MS résulte d'un équilibre fragile entre les conditions de préparation des échantillons (NCI en solution), *e.g.* la présence de solvant organique et/ou de tampon, et des paramètres instrumentaux utilisés (NCI en phase gazeuse), *e.g.* les tensions, les températures et les différences de pressions appliquées. Les processus de désorption/ionisation par ESI fournissent suffisamment peu d'énergie aux ions de NCX pour leur transfert en phase gazeuse sans nuire à la majorité des interactions maintenant leur cohésion. Le transfert en phase gazeuse implique une modification de l'environnement des NCX biologiques. Au fur et à mesure des départs successifs de molécules de solvants, les charges sont de moins en moins écrantées. Toutes les interactions électrostatiques, aussi bien les interactions attractives que les interactions répulsives, sont donc renforcées. Ainsi, selon la parité de la polarité des sites d'interaction de chacun des partenaires (intra- ou intermoléculaires), des domaines spatiaux du système peuvent se contracter (attraction de charges opposées) ou s'éloigner (répulsion de charges identiques)⁷⁹. A l'inverse, les effets hydrophobes sont perdus permettant l'ouverture de domaines spatiaux non stabilisés par des interactions électrostatiques de charges opposées⁷⁹. Il en résulte une réorganisation des interactions assurant la structure de la macromolécule biologique, qui peuvent conserver une reconnaissance de surface proche de sa conformation native. Cependant, lorsque la contribution des interactions hydrophobes à la stabilisation d'un NCX est trop grande, le NCX ne peut théoriquement pas être transféré de la solution vers la phase gazeuse. Certaines interactions électrostatiques stabilisant les NCX biologiques nécessitent donc d'être redéfinies par les grandeurs thermodynamiques de la phase gazeuse. Par exemple, les interactions de type liaison hydrogène (*HBI* pour *Hydrogen Bond Interactions*) sont définies en phase gazeuse par l'interaction entre deux fonctions chimiques similaires *i.e.*, ayant des valeurs de ΔG^0_{acid} ou de *GB* proches. Ces interactions sont d'autant plus stables que les valeurs de ΔG^0_{acid} sont hautes et que les valeurs de *GB* sont faibles. Ainsi, le proton partagé entre deux fonctions chimiques similaires n'est pas transféré et nous pouvons considérer les formes canoniques des partenaires surtout à travers des

⁷⁹ J. M. Daniel, S. D. Friess, S. Rajagopalan, S. Wendt, R. Zenobi ; Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2002**, 216, 1–27.

interactions ion-dipôle. De même, les interactions de type pont salin (*SBI* pour *Salt Bridge Interactions*) sont définies en phase gazeuse par l'interaction entre une fonction chimique très acide (valeur de ΔG^0_{acid} plus faible) et une fonction chimique très basique (valeur de ΔG^0_{base} plus haute) respectivement, sur chaque partenaire moléculaire. Ces interactions sont d'autant plus stables que les valeurs de ΔG^0_{acid} et de ΔG^0_{base} sont éloignées. Ainsi, le groupement très acide d'une molécule donne systématiquement son proton au groupement très basique du partenaire qui le retient fortement induisant une charge positive locale et une charge négative locale indépendamment de la charge formelle de l'espèce considérée.

III. Exemples d'études MS de complexes ADN/protéine

III. 1. Exemples d'études par MALDI-MS

Instrumentation MS	NCX étudiés	Conditions Expérimentales	Refs.
UV-MALDI (+) $\lambda = 337$ nm TOF mode linéaire	ssDNA (dT ₁₀ et dT ₂₀) avec des polypeptides basiques et des histones H4	Matrice : SA, acide anthralinique et acide 3-amino-pyrazine-2-carboxylique	80
UV-MALDI (+) $\lambda = 337$ nm TOF mode linéaire	ssDNA (de dT ₁₀ à dT ₂₀) avec des dipeptides basiques, de l'insuline, de l'ubiquitine, du cytochrome c, des ribonucléases et du lysozyme	Matrice : DHB	81
UV-MALDI (-) $\lambda = 337$ nm TOF mode linéaire	ssDNA et dsDNA avec des peptides basiques (le fragment 11–24 d'ACTH et un nonapeptide)	Matrice : solution saturée d'ATT dans un mélange eau/acétonitrile/citrate d'ammonium (49,5:49,5:1, v/v/v)	82
UV-MALDI (+) $\lambda = 337$ nm TOF mode linéaire	ssDNA (5-mers) avec un peptide à doigt de zinc (p55F1) en présence de Zn ²⁺	Matrice : solution aqueuse saturée de 2-amino-4-méthyl-5-nitropyridine (AMNP)	83
UV-MALDI (+/-) $\lambda = 337$ nm TOF mode linéaire	ssDNA (16-mers) avec un peptide fragment de HTH HIV-1 transcriptase inverse	Matrice : solution saturée d'ATT dans un mélange eau/acétonitrile/citrate d'ammonium (49,5:49,5:1, v/v/v)	84

Tableau 2-4. Exemples d'études de NCX ADN/peptide ou protéine détectés par MALDI-MS.

⁸⁰ P. Juhasz, K. Biemann ; Mass-spectrometric molecular-weight determination of highly acidic compounds of biological significance via their complexes with basic polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 4333–4337.

⁸¹ X. D. Tang, J. H. Callahan, P. Zhou, A. Vertes ; Noncovalent protein–oligonucleotide interactions monitored by matrix-assisted laser desorption/ionization mass-spectrometry. *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 4542–4548.

⁸² S. H. Lin, R. J. Cotter, A. S. Woods ; Detection of non-covalent interaction of single and double stranded DNA with peptides by MALDI-TOF. *Proteins-Struct. Function Genetics*, **1998**, 12–21.

⁸³ E. Lehmann, R. Zenobi ; Detection of specific noncovalent zinc finger peptide-oligodeoxynucleotide complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 3430–3432.

⁸⁴ S. H. Lin, S. R. Long, S. M. Ramirez, R. J. Cotter, A. S. Woods ; Characterization of the “helix clamp” motif of HIV-1 reverse transcriptase using MALDI-TOF MS and surface plasmon resonance. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 2635–2640.

CHAPITRE 2 :

Quelques exemples de NCX ADN/protéine ou peptide détectés par MALDI-MS sont donnés dans le **Tableau 2-4**. Dans ces études, les deux modes d'ionisation (positif et négatif) ont été utilisés avec succès (**Tableau 2-4**). De par la très grande taille de ces NCX excédant les limites du réflectron, l'analyseur à « temps de vol » (*TOF* pour *Time Of Flight*) a systématiquement été utilisé en mode linéaire.

*Juhasz and Biemann*⁸⁰ ont décrit très tôt la possibilité de détecter par MALDI-MS des NCX composés de simples brins d'ADN (*ssDNA* pour *single-stranded DNA*) et des polypeptides basiques. Ces NCX ont été transférés en phase gazeuse en présence de différentes matrices : le SA, l'acide anthralinique et l'acide 3-aminopyrazine-2-carboxylique. Il a très vite été compris que la formation de complexes en solution dépend principalement de la teneur du polypeptide en résidus arginine, la teneur en résidus histidine et en résidus lysine n'ayant qu'une importance secondaire. L'histone de type H4, qui est une protéine contenant 14 arginines et 11 lysines, s'est avérée être le meilleur agent de compléxation des oligonucléotides en solution.

L'année suivante, *Vertes and co-workers*⁸¹ ont explorés, par MALDI-TOF-MS, les NCI existants entre différents polypeptides, allant de dipeptides basiques (*e.g.* Arg-Lys et His-His) jusqu'à un choix de protéines (*e.g.* insuline, ubiquitine, cytochrome c et lysozyme), et des *ssDNA* homo-oligomériques. Les auteurs ont examiné l'influence de la composition de chacun des partenaires, le rôle de la matrice et l'effet du pH sur la nature et l'abondance des NCX *ssDNA*/protéine détectés. Parmi les quatre oligomères (dT_x , dA_x , dG_x et dC_x), des ions NCX abondants n'ont été détectés avec les dipeptides que pour les dT_x . Réciproquement, parmi les trois protéines de tailles comparables (*e.g.* le cytochrome c, la ribonucléase a et le lysozyme), le lysozyme contenant le plus grand nombre de résidus arginine a formé les NCX les plus stables avec les dT_x . La détection et l'abondance d'ions de NCX « protéine/ADN » dépend aussi du choix de la matrice. En effet, des ions de NCX n'ont été observés qu'avec les matrices DHB et 3-HPA. Le rôle particulier des unités phospho-thymidines (*pThd*) dans la compléxation « *ssDNA*/protéine » a été interprété par des processus acide/base, en prédisant le degré de protonation des résidus peptidiques et des nucléotides comme une fonction du pH. Dans les NCX, les sites basiques des résidus peptidiques (protonés en solution aqueuse

acidifiée) sont supposés occuper les sites hautement acides (*i.e.*, les groupements phosphates déprotonés en solution aqueuse de pH supérieure à leur pKa) remplaçant les possibles contre-ions alcalins. Il en résulte une concentration du signal en un seul pic, plutôt qu'en une assemblée d'ions cationisés contribuant à l'élargissement de signal.

*Woods and co-workers*⁸² ont étudiés les effets du pH, de la force ionique et de la nature de la matrice sur la détection de NCX entre différents peptides basiques et des ssDNA (de 12-mer à 25-mer) mais aussi avec les brins doubles d'ADN (*dsDNA* pour *double-stranded DNA*) correspondants. Des NCX peptide/dsDNA n'ont été observés que pour deux peptides *i.e.*, le fragment 11-24 d'ACTH (**KPVG**KRRR**PKVYP**) et un peptide synthétique (**VRKRTLRL**), pour lesquels 5 résidus basiques sont proches (les uns des autres) et séparés par des résidus aliphatiques. Les auteurs ont souligné que cet arrangement peut être comparable à la structure primaire des histones H4 (impliqués dans le compactage des dsDNA en chromatine). Des ions de NCX peptide/dsDNA n'ont été détectés qu'en présence de matrice ATT (pH 7, pour une solution saturée). Chaque mélange ADN/peptide, préparé dans une solution aqueuse dé-ionisée, a été déposé sur la plaque MALDI, puis la solution de matrice ATT a été déposée par-dessus (préparation dite « couche par couche » pour *layer by layer*). La matrice ATT a clairement favorisé le transfert en phase gazeuse des complexes intacts composés de séquences oligonucléotidiques riches en Ade et en Thy en opposition à celles riches en Gua et en Cyt. La nature ionique des interactions entre les phosphates de l'ADN chargés négativement et les résidus arginine et lysine chargés positivement a été renforcée par la disparition des signaux de NCX : (i) lorsque la valeur de pH de la solution a été diminuée à 2, ou (ii) lorsque les NCX ont été incubés en présence de 50 mM de citrate d'ammonium.

La méthode MALDI-MS n'a pas seulement le potentiel de détecter rapidement et directement des NCX ADN/peptide, elle permet aussi, lorsque les conditions expérimentales sont choisies avec attention, de refléter leurs comportements en solution. C'est ce qu'ont montré *Lehmann et Zenobi*⁸³ en examinant le comportement de ZF du type ssDNA/peptide *i.e.*, un fragment court d'ADN de séquence d(TTGTT) et une séquence peptidique de 18 résidus (appelé *p55F1*) correspondant au premier domaine ZF

CHAPITRE 2 :

de la protéine gag p55 du HIV-1. Le spectre de masses MALDI obtenu en polarité positive avec une matrice 2-amino-4-méthyl-nitropyridine (AMNP) a montré un complexe spécifique à m/z 3598 correspondant au NCX d(TTGTT)/Zn²⁺/p55F1 (1/1/1). Les auteurs ont montré que les spectres de masses MALDI reflètent le comportement en solution car la diminution de la valeur de pH (de 6,5-7 à 5-5,5) a significativement diminué l'abondance des ions du NCX spécifique d(TTGTT)/Zn²⁺/p55F1 en phase gazeuse. Ce résultat est en accord avec les données obtenues par dichroïsme circulaire qui ont montré que ce complexe est stable seulement au dessus de pH 6. Une décroissance similaire de l'abondance des ions NCX spécifiques a été observée : (i) lorsqu'un peptide de séquence différente a été utilisé, ou (ii) lorsque les cations Zn²⁺ ont été remplacés par des cations Cu²⁺. En effet, en présence de Cu²⁺, les résidus cystéine (indispensables à la stabilité du repliement de la séquence primaire) ont été oxydés et le Cu²⁺ réduit, prévenant ainsi la formation des NCX spécifiques.

III. 2. Exemples d'études par ESI-MS

Contrairement, à la technique MALDI, un grand nombre d'études examinant le comportement des dsDNA ont été réalisées par ESI. *Henion and co-workers*⁸⁵ et *Smith and co-workers*⁸⁶ ont montré, en 1993, que les dsDNA sont suffisamment stables pour être détectés par MS. La conservation en phase gazeuse de l'appariement Watson-Crick n'a été mise en évidence que plus tard^{87,88}. Quelques exemples de NCX ADN/protéine ou peptide détectés par ESI-MS sont donnés dans le **Tableau 2-5**. Dans ces études, les deux modes d'ionisation (positif et négatif) ont été utilisés avec succès (**Tableau 2-5**) sur différents analyseurs, *e.g.* de type quadrupôle, FT-ICR, EB/BE, TOF et Orbitrap. Dans la littérature, de nombreuses approches ont été utilisées (comme expériences de contrôle)

⁸⁵ B. Ganem, Y. T. Li, J. D. Henion ; Detection of oligonucleotide duplex forms by ion-spray mass-spectrometry. *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 1445–1448.

⁸⁶ K. J. Lightwahl, D. L. Springer, B. E. Winger, C. G. Edmonds, D. G. Camp, B. D. Thrall, R. D. Smith ; Observation of a small oligonucleotide duplex by electrospray ionization mass-spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 803–804.

⁸⁷ P. D. Schnier, J. S. Klassen, E. E. Strittmatter, E. R. Williams ; Activation energies for dissociation of double strand oligonucleotide anions: Evidence for Watson–Crick base pairing in vacuo. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 9605–9613.

⁸⁸ V. Gabelica, E. De Pauw ; Collision-induced dissociation of 16-mer DNA duplexes with various sequences: Evidence for conservation of the double helix conformation in the gas phase. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2002**, 219, 151–159.

pour s'assurer que les NCX détectés ne sont pas formés par agrégations non-spécifiques pendant les processus de désorption/ionisation et qu'ils reflètent bien leurs structures en solution. Ces études par ESI-MS ont permis de répondre aux questions de stœchiométries, de stabilités et d'affinités relatives entre les partenaires du NCX^{79,89}.

Instrumentation MS	NCX étudiés	Conditions Expérimentales	Refs.
ESI(-) Quadrupôle	ssDNA phosphorothioate (20-mer) avec de l'albumine de sérum bovin	Tampon : 33mM d'imidazole, 10mM de NH ₄ OAc ; pH 7	90
ESI(-) FT-ICR	ssDNA (M _w ~ 4000-5000 Da) avec la protéine du gène V du bactériophage f1	Tampon : 10mM de NH ₄ OAc ; pH 7	91
ESI(-) FT-ICR	dsDNA (17-mer) avec le domaine de reconnaissance du facteur de transcription PU.1	Tampon : 10mM de NH ₄ OAc ; pH 7	92
ESI(-) EB	dsDNA (34-mer) avec le domaine de reconnaissance de récepteur de la vitamine D et des cations Zn ²⁺	H ₂ O	93
ESI(+) TOF	dsDNA (21-mer) avec des tryptophanes et des répresseurs de tryptophane	Tampon : 5mM de NH ₄ OAc ; pH 6	94
ESI(+) Quadrupôle	dsDNA (13-mer, 24-mer, 30-mer) avec la protéine CGN4	Mélange eau/méthanol (50 : 50, v/v)	95
ESI(+) Quadrupôle	ADN en épingle à cheveux (40-mer) avec la protéine C170	Tampon : 10mM de NH ₄ OAc ; pH 7	96

Tableau 2-5. Exemples d'études de NCX ADN/peptide ou protéine détectés par ESI-MS.

⁸⁹ J. H. Banoub, R. P. Newton, E. Esmans, D. F. Ewing, G. Mackenzie ; Recent Developments in Mass Spectrometry for the Characterization of Nucleosides, Nucleotides, Oligonucleotides, and Nucleic Acids. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1869–1915.

⁹⁰ M. J. Greig, H. Gaus, L. L. Cummins, H. Sasmor, R. H. Griffey ; Measurement of macromolecular binding using electrospray mass-spectrometry-determination of dissociation-constants for oligonucleotide-serum albumin complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 10765–10766.

⁹¹ X. H. Cheng, A. C. Harms, P. N. Goudreau, T. C. Terwilliger, R. D. Smith ; Direct measurement of oligonucleotide binding stoichiometry of gene V protein by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 7022–7027.

⁹² X. H. Cheng, P. E. Morin, A. C. Harms, J. E. Bruce, Y. BenDavid, R. D. Smith ; Mass spectrometric characterization of sequence-specific complexes of DNA and transcription factor PU.1 DNA binding domain. *Anal. Biochem.*, **1996**, *239*, 35–40.

⁹³ T. D. Veenstra, L. M. Benson, T. A. Craig, A. J. Tomlinson, R. Kumar, S. Naylor ; Metal mediated sterol receptor-DNA complex association and dissociation determined by electrospray ionization mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.*, **1998**, *16*, 262–266.

⁹⁴ N. Potier, L. J. Donald, I. Chernushevich, A. Ayed, W. Ens, C. H. Arrowsmith, K. G. Standing, H. W. Duckworth ; Study of a noncovalent trp repressor: DNA operator complex by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci.*, **1998**, *7*, 1388–1395.

⁹⁵ L. J. Deterding, J., Kast, M. Przybylski, K. B. Tomer ; Molecular characterization of a tetramolecular complex between dsDNA and a DNA-binding leucine zipper peptide dimer by mass spectrometry. *Bioconjugate Chem.*, **2000**, *11*, 335–344.

⁹⁶ H. B. Kamadurai, S. Subramaniam, R. B. Jones, K. B. Green-Church, M. P. Foster ; Protein folding coupled to DNA binding in the catalytic domain of bacteriophage lambda integrase detected by mass spectrometry. *Protein Sci.*, **2003**, *12*, 620–626.

CHAPITRE 2 :

*Griffey and co-workers*⁹⁰ ont détectés, par ESI(-)-MS, les premiers NCX « ADN/protéines » en mélangeant de l'albumine de sérum bovin (BSA pour *Bovin Serum Albumin* ; $M_w \sim 66$ kDa) avec des concentrations croissantes d'oligonucléotides phosphothionates (20-mer ; GC₃A₂GCTG₂CATC₂GTCA ; $M_w = 6367$ Da) en présence d'un tampon mélange d'imidazole et d'acétate d'ammonium. Les valeurs des coefficients de dissociation (K_D) ont été calculées à partir des valeurs d'intensités relatives des signaux correspondants aux espèces libres et appariées. Les valeurs de K_D obtenues par ESI-MS ($K_{D1} \sim 3,1 \pm 0,3$ et $K_{D2} \sim 11,9 \pm 0,6$; respectivement pour le premier et le second appariement du 20-mer à la surface de la BSA) sont en accord avec les valeurs obtenues par électrophorèse capillaire ($K_{D1} \sim 2,8 \pm 0,3$ et $K_{D2} \sim 10,0 \pm 0,6$). Comme la valeur de K_D dépend de la force ionique et du pH de la solution, il a été suggéré que les forces électrostatiques contribuent grandement à l'appariement et à la stabilité des NCX étudiés.

*Smith and co-workers*⁹¹ ont étudié, par ESI(-)-MS, les stœchiométries d'appariement de la protéine du gène V ($M_w = 9688$ Da) de bactériophage f1 avec différents petits ssDNA ($M_w \sim 4000$ -5500 Da). Comme dans les conditions physiologiques, la protéine du gène V seule donne, par ESI-MS dans un tampon acétate d'ammonium (10mM ; pH 7), uniquement un homo-dimère. Dans les mêmes conditions, un mélange protéine/ssDNA donne par ESI-MS principalement un complexe 4:1 avec un 18-mer et un 16-mer, alors qu'un complexe 2:1 est majoritairement détecté avec des ssDNA plus courts (14-mer et 13-mer). Les stœchiométries obtenues par MS ont été comparées à celles obtenues par chromatographie d'exclusion stérique et ont confirmé la conservation d'un comportement proche de la solution. De plus, il résulte de l'addition d'acide et/ou de solvants organiques la disparition des ions NCX des spectres MS. Enfin, comme en solution, un appariement préférentiel de la protéine du gène V a été observé pour les ssDNA par rapport aux dsDNA.

La reconnaissance d'une protéine pour une séquence d'ADN spécifique a été examinée par la même méthode, en étudiant les NCI régissant l'appariement du domaine de reconnaissance de la protéine PU.1 (*PU1 DBD* pour *PU.1 protein DNA-Binding Domain* ; $M_w = 13534$ Da) *i.e.*, un facteur de transcription eucaryote, avec deux dsDNA différents

(17-mer et 19-mer)⁹². L'une des deux séquences de dsDNA contenait des motifs de reconnaissance GGAA (dite « *wild-type* » ; 17-mer), tandis que dans l'autre séquence (dite « *mutant* » ; 19-mer) ces motifs ont été remplacés par des motifs GCTA. Lorsque PU1 DBD a été incubée en présence d'un excès de dsDNA *wild-type* dans 10mM d'acétate d'ammonium, seuls les ions NCX dsDNA/protéine (1:1) ont été détectés. De plus, même en présence d'un mélange contenant 20 fois plus de dsDNA mutant par rapport au dsDNA *wild-type*, seul le NCX spécifique (1:1) avec le dsDNA *wild-type* a été détecté. Ces résultats, en accord avec les résultats obtenus par mobilité sur gel, montrent bien la reconnaissance spécifique de la protéine PU1 DBD pour le motif GGAA.

La nécessité de la présence de cations Zn^{2+} (ou Cd^{2+}) pour la formation de NCX entre le domaine de reconnaissance d'un récepteur de la vitamine D (*VDR DBD* pour *Vitamin D Receptor DNA-Binding Domain*) et des dsDNA a été mise en évidence par *Naylor and co-workers*⁹³. La protéine VDR DBD contient deux sites ayant une grande affinité pour les cations Zn^{2+} (i.e., deux régions à doigts de zinc). Lors de l'étude par ESI(-)-MS, les ions de protéine VDR DBD, comme les ions NCX de VDR DBD/dsDNA, contenaient deux Zn^{2+} (ou deux Cd^{2+}) par protéine VDR DBD. Aucun complexe n'a été observé en absence de cations Zn^{2+} (ou Cd^{2+}) ou en utilisant une séquence dsDNA aléatoire. Les auteurs ont aussi montré que la formation du NCX protéine/dsDNA dépend de la concentration en cation métallique. En effet, une augmentation excessive de la concentration de Zn^{2+} ou Cd^{2+} modifie et/ou empêche la formation de la conformation spécifique indispensable à la reconnaissance du dsDNA.

*Duckworth and co-workers*⁹⁴ ont choisi le système répresseur/opérateur de tryptophane d'*Escherichia coli* comme modèle pour étudier la reconnaissance d'une protéine dont l'affinité pour l'ADN est régulée par un cofacteur. Les NCI entre l'apo-répresseur de tryptophane (*TrpR* ; $M_w = 12224$ Da) i.e., une protéine impliquée dans la biosynthèse du tryptophane, son corépresseur tryptophane et trois différentes séquences de dsDNA (dites « opératrices ») ont été examinées par ESI(+)-MS. Les auteurs ont rapporté qu'aucun NCX protéine/ADN n'a été observé en présence de 5mM d'acétate d'ammonium car la protéine TrpR est partiellement dénaturée dans ces conditions ; ce qui a été confirmé par

CHAPITRE 2 :

dichroïsme circulaire. Après dialyse par paliers de pH et dilution dans le même tampon que précédemment (5mM d'acétate d'ammonium), des ions NCX « TrpR /dsDNA » (1:1, $M_w = 37,260$ Da) ont finalement été détectés par MS. Cependant, les NCX spécifiques n'ont été observés uniquement lorsque les séquences de dsDNA contenaient deux motifs CTAG et que ces motifs étaient séparés par quatre paires de base, montrant le potentiel de l'ESI-MS pour étudier la spécificité de reconnaissance de séquences au sein d'un NCX. Même si le corépresseur tryptophane n'a pas été ajouté lors de la formation du NCX « TrpR/dsDNA », l'addition spécifique de deux molécules de L-tryptophane au NCX (en opposition au D-tryptophane) a été soulignée.

La reconnaissance de l'ADN par les protéines CGN4, qui sont impliquées dans la régulation de la transcription des gènes de levures, a été examinée par *Tomer and co-workers*⁹⁵. Les protéines CGN4 contiennent un motif de glissière à leucine *i.e.*, un domaine riche en résidus leucine, et un domaine de reconnaissance de l'ADN riche en résidus basiques (**Figure 1-16c**). Dans cette étude réalisée par ESI(+)-MS, deux types de protéine CGN4 ont été utilisés : (i) la protéine CGN4-bR, ne contenant que le domaine basique de reconnaissance de l'ADN et où le motif de glissière à leucine est remplacé par un pont disulfure, et (ii) la protéine CNG4-61, contenant les deux domaines et ne complexe l'ADN que par formation d'un homo-dimère (*CNG4-61/CNG4-61*). Aucune des deux protéines n'a formé d'homo-dimère. En présence de dsDNA (13-mer, 24-mer ou 30-mer) contenant le motif ATGA(C/G)TCAT, la protéine CNG4-61 engendre spécifiquement le NCX « CNG4-61/CNG4-61/dsDNA », alors que la protéine CNG4-bR ne produit que le NCX « CNG4-bR/dsDNA ». Dans le cas de la protéine CNG4-61, aucun ion correspondant à des NCX non-spécifiques, *e.g.* CNG4-61/CNG4-61 ou CNG4-61/dsDNA. De plus, aucun appariement avec les dsDNA n'a été observé lorsque ces derniers ne contenaient pas la séquence spécifiquement reconnue, confirmant ainsi la pertinence biologique des résultats obtenus. Enfin, la comparaison des produits de digestion, par différentes endo-protéases à différents temps de réaction, de la protéine CNG4-bR seule ou liée à un dsDNA a montré que certains clivages sont significativement réduits par la présence du dsDNA. Les résidus d'acides aminés en interaction avec les dsDNA ainsi déterminés sont d'ailleurs en accord avec la structure précédemment déterminée par rayon X.

*Foster and co-workers*⁹⁶ ont étudié l'appariement de l'ADN sur le site catalytique de l'intégrase bactériophage λ (C170 ; Mw = 21119 Da) et ont rapporté une modification de la distribution d'états de charge des ions de la protéine C170 observée sur les spectres de masse lorsque cette dernière est en présence d'ADN. Il avait déjà été montré que le dépliement et/ou le repliement de protéines peut être suivi par MS *via* l'étude de la distribution d'états de charge. En effet, la modification du pH, de la température, ou l'addition de solvant organique peut dénaturer une protéine et engendrer un déplacement des états de charge observés sur les spectres de masse. En absence d'ADN, trois ions correspondant aux protéines C170 sont détectés : une conformation repliée, une conformation dépliée et un homo-dimère. En présence d'ADN, les ions provenant de la conformation dépliée disparaissent et un NCX C170/ADN (1:1 ; M_w = 33405 Da) apparaît avec une distribution d'états de charge fine représentative de conformations plus compactes. Le repliement des protéines C170, induite par l'addition d'ADN, a été attribué à la stabilisation de la conformation repliée par les interactions avec l'ADN qui agit comme un patron. Cependant, comme l'ont souligné récemment *Hall and Robinson*⁹⁷, les résultats obtenus à partir d'études des états de charge ne garantissent en rien qu'ils soient représentatifs d'une conformation unique.

⁹⁷ Z. Hall, C. V. Robinson ; Do Charge State Signatures Guarantee Protein Conformation ? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2012**, 23, 1161-1168.

CHAPITRE 2 :

CHAPITRE 3 :

Influence des agents de « superchargement » lors des processus de désolvatation des agrégats chargés

Depuis la production de protéines multichargées par ESI¹, des études ont été faites pour essayer de mieux comprendre et de contrôler la distribution d'états de charge ainsi portés². La variation de cette distribution a été montrée comme étant très sensible à des paramètres macroscopiques, *e.g.* aux variations de pH imposant aux protéines de passer de leurs états natifs repliés à des conformations plus dépliées (formes dénaturées)³. Réciproquement, la variation de distribution d'états de charge de petits peptides (plus susceptibles de rester dépliés) s'est avérée être robuste à des variations de pH extrêmes⁴. L'addition de réactifs, comme des bases azotées en solution, a été employée pour modifier la distribution d'états de charge en créant une compétition entre les sites basiques portant l'excès de protons sur la protéine et sur la base azotée introduite^{5,6}. Par exemple, sous forme de sel d'acétate ou de formate, le cation ammonium (NH_4^+) agit largement comme agent de protonation d'acides aminés. Au début des années 1990, cette compétition a été réalisée avec des additifs gazeux comme de la diméthylamine sur du Cytochrome c multiprotoné⁷, ou du 1,6-diaminohexane sur de la myoglobine multiprotonée⁸. Notons que ces études en phase gazeuse ont donné lieu à la réduction de la charge globale de la protéine par transferts de proton vers la base azotée introduite en phase gazeuse.

¹ J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse ; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989**, 246(4926), 64-71.

² Y. Li, R. B. Cole ; Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, 2nd ed.; R. B. Cole Ed.: John Wiley and Sons, **2010**; Charge State Distributions in Electrospray and MALDI, 491- 534.

³ S. K. Chowdhury, V. Katta, B. T. Chait ; Probing Conformational Changes In Proteins By Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 9012-9013.

⁴ G. Wang, R. B. Cole ; Disparity Between Solution-Phase Equilibria and Charge State Distribution in Positive-Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, **1994**, 29, 419-427.

⁵ J. C. Y. Le Blanc, J. Wang, R. Guevremont, K. Siu ; Electrospray Mass Spectra of Protein Cations Formed In Basic Solutions. *Org. Mass Spectrom.*, **1994**, 29, 587-593.

⁶ N. Felitsyn, M. Peschke, P. Kebarle ; Origin and Number of Charges Observed On Multiply-Protonated Native Proteins Produced By ESI. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2002**, 219, 39-62.

⁷ S. A. McLuckey, G. J. van Berkel, G. L. Glish ; Reactions of Dimethylamine with Multiply Charged Ions of Cytochrome c. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5668-5670.

⁸ S. A. McLuckey, G. L. Glish, G. J. van Berkel ; Charge Determination of Product Ions Formed from Collision-Induced Dissociation of Multiply Protonated Molecules via Ion/Molecule Reactions. *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 1971-1978.

CHAPITRE 3 :

Au début du 21^e siècle, le meta-nitrobenzyl alcool (*mNBA*), précédemment utilisé comme matrice pour améliorer les processus de désorption/ionisation sous vide en spectrométrie de masse par bombardement d'atomes rapides (*FAB-MS* pour *Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*)^{9,10,11,12}, a été proposé comme agent de « superchargement » en ESI(+)-MS par *Williams and co-workers*^{13,14,15,16}. A travers ces études, ils ont montré non seulement la capacité de *mNBA* à augmenter le plus haut état de charge observé (z_{high}) et l'état de charge moyen (z_{avg}) de protéines^{13,14,15,16} et de peptides¹³ multiprotonés, mais aussi sa capacité à favoriser les plus hauts états de charge de polymères cationisés, *e.g.* PEG 1500^{14,15}, en ESI(+)-MS. Ils ont rapporté une influence limitée de *mNBA* sur des chaînes A oxydées d'insuline en ESI(-)-MS¹⁶.

Ces différentes études, outre leur intérêt pour une meilleure compréhension des processus ESI, ont été menées pour le développement d'applications analytiques. Ainsi, avoir accès à de plus hauts états de charge permet l'analyse de gros systèmes biologiques lorsque la gamme de rapport m/z de l'instrument est limitée. De plus, la résolution atteinte peut aussi s'en trouver améliorée pour des instruments ayant montré une baisse de pouvoir résolutif aux plus hautes valeurs de m/z , *e.g.* le FT-ICR, l'Orbitrap. Enfin, une meilleure efficacité de capture d'électron a été observée pour de plus hauts états de charge des ions précurseurs lors de l'activation par des méthodes électroniques, *e.g.* ECD^{17,18,19} ou ETD²⁰.

⁹ M. Takayama, T. Fukai, T. Nomura ; Effect of a new matrix system for low-polar organic compounds in fast atom bombardment mass spectrometry. *Shisuryo Bunseki*, **1988**, 36(4), 169-173.

¹⁰ G. Siuzdak, S. V. Wendeborn, K. C. Nicolaou ; Cationization of organometallic carbonyl compounds by fast ion bombardment. *Int. Journ. of Mass Spectrom. And Ion Proces.*, **1992**, 112(1), 79-91.

¹¹ J. D. Reynolds, K. D. Cook, J. L. E. Burn, C. Woods ; m-Nitrobenzyl Alcohol Electrochemistry in Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, 3, 113-121.

¹² Y. M. Ahn, W.-W. Lee, J. H. Jung, S.-G. Lee, J. Hong ; Structural determination of glucosylceramides isolated from marine sponge by fast atom bombardment collision-induced dissociation linked scan at constant B/E. *J. Mass. Spectrom.*, **2009**, 44, 1698-1708.

¹³ A. T. Iavarone, J. C. Jurchen, E. R. Williams ; Supercharged Protein and Peptide Ions Formed by Electrospray Ionization. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 1455-1460.

¹⁴ A. T. Iavarone, E. R. Williams ; Supercharging in electrospray ionization: effects on signal and charge. *Int. Journ. Mass Spectrom.*, **2002**, 219, 63-72.

¹⁵ A. T. Iavarone, E. R. Williams ; Mechanism of Charging and Supercharging Molecules in Electrospray Ionization. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 2319-2327.

¹⁶ A. T. Iavarone, E. R. Williams ; Collisionally Activated Dissociation of Supercharged Proteins Formed by Electrospray Ionization. *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 4525-4533.

¹⁷ M. V. Gorshkov, C. D. Masselon, E. N. Nikolaev, H. R. Udseth, L. Pasa-Tolic, R.D. Smith ; Considerations for electron capture dissociation efficiency in FTICR mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2004**, 234, 131-136.

¹⁸ R. A. Zubarev, M. Witt, G. Baykut ; Two-Fold Efficiency Increase by Selective Excitation of Ions for Consecutive Activation by Ion-Electron Reactions and Vibrational Excitation in Tandem Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 2992-2996.

Depuis son introduction, un grand nombre d'études a été réalisé afin de mieux comprendre comment les caractéristiques physico-chimiques de *m*NBA ont mené au « superchargement ». Parmi les propriétés considérées, on peut trouver : la tension superficielle^{13-16,20,21,22}, la pression de vapeur saturante (ou le point d'ébullition)^{14-16,20-22,23,24,25,26}, la basicité en phase gazeuse^{14,16,20-25,27,28,29,30}, etc. D'après les travaux de Kebarle^{6,31,32}, ces propriétés peuvent être divisées en deux groupes correspondant aux étapes progressives d'évaporation/désolvatation de la technique ESI. La tension superficielle et la pression de vapeur saturante sont des propriétés physico-chimiques importantes dès les premières phases de décomposition de la gouttelette chargée (état macroscopique). D'autre part, les espèces moléculaires chargées en phase gazeuse, qu'elles soient partiellement solvatées (agrégats chargés en phase gazeuse) ou libre de tout solvant, apparaissent uniquement dans les dernières phases de désolvatation (état microscopique) ; d'où les variations d'enthalpie libre standard (ΔG°) des réactions de protonation et de déprotonation

¹⁹ M. A. McFarland, M. J. Chalmers, J. P. Quinn, C. L. Hendrickson, A. J. Marshall ; Evaluation and Optimization of Electron Capture Dissociation Efficiency in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, *16*, 1060-1066.

²⁰ F. Kjeldsen, A. M. B. Giessing, C. R. Ingrell, O. N. Jensen ; Peptide Sequencing and Characterization of Post-Translational Modifications by Enhanced Ion-Charging and Liquid Chromatography Electron-Transfer Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 9243-9252.

²¹ S. H. Lomeli, S. Yin, R. R. Loo, J. A. Loo ; Increasing Charge While Preserving Noncovalent Protein Complexes for ESI-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2009**, *20*, 593- 596.

²² H. J. Sterling, E. R. Williams ; Origin of Supercharging in Electrospray Ionization of Noncovalent Complexes from Aqueous Solution. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2009**, *20*, 1933-1943.

²³ S. H. Lomeli, I. X. Peng, S. Yin, R. R. Loo, J. A. Loo ; New Reagents for Increasing ESI Multiple Charging of Proteins and Protein Complexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, *21*, 127-131.

²⁴ H. J. Sterling, M. P. Daly, G. K. Feld, K. L. Thoren, A. F. Kintzer, B. A. Krantz, E. R. Williams ; Effects of Supercharging Reagents on Noncovalent Complex Structure in Electrospray Ionization from Aqueous Solutions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, *21*, 1762-1774.

²⁵ S. G. Valeja, J. D. Tipton, M. R. Emmett, A. G. Marshall ; New Reagents for Enhanced Liquid Chromatographic Separation and Charging of Intact Protein Ions for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 7515-7519.

²⁶ H. J. Sterling, E. R. Williams ; Real-Time Hydrogen/Deuterium Exchange Kinetics via Supercharged Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 9050-9057.

²⁷ C. R. Jr. Hogan, R.R. Loo, J. A. Loo, J. F. de la Mora ; Ion mobility-mass spectrometry of phosphorylase B ions generated with supercharging reagents but in charge-reducing buffer. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*, 13476-13483.

²⁸ S. Yin, J. A. Loo ; Top-down mass spectrometry of supercharged native protein-ligand complexes. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2011**, *300*, 118-122.

²⁹ H. J. Sterling, C. A. Cassou, M. J. Trnka, A. L. Burlingame, B. A. Krantz, E. R. Williams ; The role of conformational flexibility on protein supercharging in native electrospray ionization. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 18288-18296.

³⁰ K. A. Douglass, A. R. Venter ; Investigating the Role of Adducts in Protein Supercharging with Sulfolane. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2012**, *23*, 489-497.

³¹ P. Kebarle, M. Peschke ; On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, *406*, 11-35.

³² P. Kebarle ; A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 804-817.

CHAPITRE 3 :

d'espèces multichargées (respectivement, GB_{app} et $\Delta G^{\circ}_{acid,app}$) sont des grandeurs qui n'interviennent qu'à partir de cette étape des processus de désolvatation. Comme la pression de vapeur saturante de *mNBA* ($b_p = 177^{\circ}C$ à 3 Torr³³) est inférieure à celle de l'eau ($b_p = 100^{\circ}C$ à 766 Torr³³), une influence remarquable de *mNBA* est observée sur les états de charge obtenus en ESI(+) même à de faibles concentrations en solution aqueuse^{14-16,20-29}. En effet, au fur et à mesure de l'évaporation des molécules d'eau, la concentration en agents de « superchargement » augmente au sein des microgouttelettes et sa contribution devient la plus importante dans les dernières étapes de la vie de la gouttelette¹⁴. Cette forte concentration en composé hautement réactif *i.e.*, un aromatique substitué d'une fonction alcool et d'une fonction *nitro*, pourrait induire des modifications conformationnelles des macromolécules étudiées, *e.g.* des protéines^{13-16,20,25} et des complexes non-covalents constitués de protéines^{21-24,26-29}. Notons que de plus faibles valeurs de pression de vapeur saturante des solvants impliquent un refroidissement plus lent de la gouttelette qui peut aussi favoriser des modifications conformationnelles de biomolécules dues à leur plus haute énergie interne²²⁻²⁴.

Ces dernières années, la possibilité de modification conformationnelle de protéines a été étudiée en utilisant des conditions dénaturantes induites par des modifications de solvant^{30,34,35} ou des variations de températures²²⁻²⁴, mais aussi en employant la stratégie inverse *i.e.*, en « bloquant » chimiquement les structures tertiaires des protéines par l'introduction de liaisons covalentes de type pont disulfure²⁹. Bien évidemment, la présence de *mNBA* n'a pas modifié la tendance de corrélation existant pour les espèces biomoléculaires *i.e.*, plus la protéine est dépliée, plus elle peut porter de charges^{24,27,29-30}. Cependant un point n'a toujours pas été clarifié. La présence de sites chargés supplémentaires augmente-t-elle les répulsions coulombiennes menant au dépliement des protéines ou bien, le dépliement des protéines induit par la présence de *mNBA* révèle-t-il de nouveaux sites de protonation accessibles menant à l'augmentation d'état de charge observé ? Même si la valeur de GB de *mNBA* a été impliquée comme la propriété thermochimique majeure responsable de cette tendance^{21,23,28,30}, les modifications conformationnelles de l'analyte (qui peuvent ou non avoir lieu en réponse à la présence de

³³ CRC Handbook of Chemistry and Physics. In [Online] 89th ed.; D.R. Lide, Ed. 2008-2009.

³⁴ A. Kharlamova, B. M. Prentice, T.-Y. Huang, S. A. McLuckey ; Electrospray Droplet Exposure to Gaseous Acids for the Manipulation of Protein Charge State Distributions. *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 7422-7429.

³⁵ S. M. Miladinovic, L. Fornelli, Y. Lu, K. M. Piech, H. H. Girault, Y. O. Tsybin ; In-Spray Supercharging of Peptides and Proteins in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 4647-4651.

mNBA) masquent la possibilité d'attribuer sans ambiguïté les raisons sous-jacentes au succès de *mNBA* en tant qu'agent de « surchargement ».

Dans notre étude, l'influence de *mNBA* sur les processus d'évaporation et de désolvation de NCX biologiques est étudiée dans les deux modes de polarité d'ionisation. L'un des partenaires composant ces NCX étant peptidique, nous escomptons observer un effet induit par la présence de *mNBA* dans l'échantillon. Nous pourrions aussi estimer l'influence du partenaire nucléique et vérifier si l'utilisation de *mNBA* est d'intérêt pour l'étude de la stabilité des NCX biologiques en phase gazeuse.

I. Les valeurs descriptives de l'intensité des signaux et des états de charge

De tout temps, les chercheurs ont tenté de décrire le plus précisément possible leurs résultats afin de vérifier, comparer et propager l'intérêt de la méthode employée. Ils fondent leurs résultats sur les spectres de masse qu'ils interprètent *i.e.*, un graphique ayant en abscisse la dimension étudiée (la valeur du rapport m/z ; aspect qualitatif) et en ordonnée l'intensité du signal réponse observée (le nombre de fois où cette valeur m/z a été rencontrée ; aspect quantitatif). Ils peuvent donc décrire aisément leurs observations par les coordonnées de la variation observée sur le spectre.

I. 1. Les variations d'intensité du signal

I. 1. a. Valeurs descriptives de l'intensité du signal

Les analystes décrivent les spectres de masses aussi bien à l'aide de l'intensité absolue du signal *i.e.*, le nombre de collisions reçues par le détecteur (détection invasive) ou le nombre de charges induites par les ions dans le détecteur (détection non invasive spécifique au FT-ICR), ou l'intensité relative du signal donnée en pourcentage et normalisée par rapport à l'ion le plus abondant du spectre de masse (par définition à 100%). Cependant, comme l'intensité du signal observée dépend de la gamme de rapport m/z programmée (possibilité de discrimination tant à l'analyse qu'à l'affichage), les limites de la gamme de rapport m/z sont toujours précisées.

Bien qu'un rapport m/z corresponde qualitativement à un ou plusieurs ions de même valeur nominale du rapport m/z (dit isobares), l'introduction de nouveaux états de

charge accessibles par les processus de désolvatation douce de l'ESI complique l'interprétation quantitative en subdivisant le signal d'un analyte sur différentes valeurs m/z composant la distribution d'états de charge accessibles à cet analyte. De plus, l'accès à des instruments à plus hauts pouvoirs résolutifs a certes permis de lever certaines ambiguïtés qualitatives, *e.g.* en basant l'attribution des ions sur leurs compositions élémentaires, mais a compliqué l'interprétation quantitative en dévoilant un massif isotopique résolu *i.e.*, plusieurs pics représentatifs d'un même analyte à un état de charge donné.

I. 1. b. Introduction de la $SER_{1\%}$

Afin de décrire au mieux les variations induites par une seule modification du protocole expérimental *i.e.*, l'introduction de $mNBA$ (tous les autres paramètres restant les mêmes), il faut au préalable décrire le plus précisément possible chaque système *i.e.*, avant et après la modification étudiée. Nous avons décidé : (i) de travailler à haute résolution afin de permettre une identification des espèces basée sur les pics mono-isotopiques *i.e.*, les valeurs de rapport $(m/z)_m$, des différents ions simultanément étudiés (une valeur de $(m/z)_m$ par analyte et par état de charge observé) et, (ii) de calculer l'intensité totale du signal issu de l'analyte (I_{tot} ; **Equation 3-1**), correspondant au courant ionique total d'un analyte, en sommant les intensités de chaque pic des massifs isotopiques ($I_{(m+j),i+}$) pour chaque état de charge observé (I_{i+}).

$$\text{(Eq. 3-1)} \quad I_{tot} = I_{1+} + I_{2+} + I_{3+} + \dots + I_{n+} = \sum_i^n (I_{i+})$$

$$\text{avec} \quad I_{i+} = I_{(m),i+} + I_{(m+1),i+} + I_{(m+2),i+} + \dots + I_{(m+n),i+} = \sum_j^n (I_{(m+j),i+})$$

Notons que les instruments à ultra hauts pouvoirs résolutifs détectent un grand nombre de signaux, ces valeurs d'abondance sont donc généralement décrites par de grands nombres qui sont plus difficile à manipuler. Afin de faciliter la lecture et la comparaison de ces grandes valeurs numériques, nous avons choisi de définir le rapport d'amélioration du signal à 1% de $mNBA$ ($SER_{1\%}$ pour *Signal Enhancement Ratio at 1% of $mNBA$*) comme le rapport entre la valeur de I_{tot} en présence de 1% de $mNBA$ et la valeur de I_{tot} en absence de $mNBA$ (**Equation 3-2**).

$$\text{(Eq. 3-2)} \quad SER_{1\%} = \frac{\sum_i^n (I_{i+}) \text{ en présence de 1\% de mNBA}}{\sum_j^n (I_{j+}) \text{ en absence de mNBA}} = \frac{I_{tot} \text{ en présence de 1\% de mNBA}}{I_{tot} \text{ en absence de mNBA}}$$

Ainsi, une valeur de $SER_{1\%}$ supérieure à 1 montre une amélioration de l'intensité totale du signal d'un analyte donné et une valeur inférieure à 1 en montre la diminution. De plus, même si tous les autres paramètres expérimentaux et instrumentaux sont restés inchangés, le fait de réduire I_{tot} en présence de *mNBA* par I_{tot} en son absence permet de s'affranchir de la variabilité induite par les processus d'ionisation/désorption, de transfert, de stockage, d'activation et de détection des ions. La $SER_{1\%}$ permet donc de n'observer que la variation globale induite par la présence de *mNBA* et de quantifier cette variation afin de comparer les résultats inter-analytes et/ou inter-échantillons.

I. 2. Les variations d'états de charge

I. 2. a. Valeurs descriptives de l'état de charge

L'état de charge d'un analyte n'est pas accessible par une coordonnée (abscisse ou ordonnée) du spectre de masse mais doit être calculé soit : (i) à partir de la valeur de m/z lorsque la masse de l'analyte est connue, soit (ii) à partir de la différence de m/z entre deux pics consécutifs d'un massif isotopique lorsque la résolution le permet. Ce concept d'analyte multichargé a mené les analystes à se tourner vers les outils statistiques pour décrire des distributions d'états de charge (*i.e.*, plusieurs états de charge représentatifs d'un même analyte) qui, pic a pic, représentent des formes gaussiennes plus ou moins déformées. En 1994, *Cole and co-workers*³⁶ ont adapté l'équation de la moyenne pondérée (**Equation 3-3**) permettant de moyenniser une variable statistique quantitative discrète, ici l'état de charge.

$$\text{(Eq. 3-3)} \quad z_{avg} = \frac{I_{1+} + 2(I_{2+}) + 3(I_{3+}) + \dots + n(I_{n+})}{I_{1+} + I_{2+} + I_{3+} + \dots + I_{n+}} = \frac{\sum_i^n (i I_{i+})}{\sum_i^n (I_{i+})} = \frac{I_{tot,ponderee}}{I_{tot}}$$

Dans cette équation, les intensités du signal de chacun des états de charge (*i.e.*, I_{i+} les effectifs de la variable) sont pondérées par la valeur de leur état de charge (*i.e.*, i les

³⁶ G. Wang, R. B. Cole ; Effect of Solution Ionic Strength on Analyte Charge State Distributions in Positive and Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3702-3708.

CHAPITRE 3 :

valeurs discrètes de la variable) puis sommées entre elles. Cette somme d'intensités pondérées ($I_{tot,ponderee}$) est ensuite réduite par la somme des intensités non pondérées (I_{tot}).

La valeur d'état de charge moyen (z_{avg}) n'est pas la seule grandeur statistique permettant de décrire cette population d'états de charge. La médiane *i.e.*, valeur d'état de charge séparant la population en deux groupes de même effectif, permettrait aussi de décrire de tels systèmes. De plus, de par l'allure de forme gaussienne des distributions d'états de charge, ces dernières peuvent être décrites par le mode (ou classe modale) *i.e.*, la valeur d'état de charge ayant le plus grand effectif (z_{mode}), et l'étendue *i.e.*, la différence entre la plus grande (z_{high}) et la plus petite valeur (z_{low}) atteinte par la série.

I. 2. b. Introduction de la $CEC_{1\%}$

Depuis l'introduction du concept de « superchargement » par *Williams and co-workers*¹³, ce phénomène est décrit par les valeurs de z_{avg} , de z_{high} et de z_{low} avant et après la (ou les) modification(s) appliquée(s) au système. En 2009, *Loo and co-workers*²¹ ont décrit le pourcentage de charge supplémentaire (calculé à partir de l'**Equation 3-4**).

$$(Eq. 3-4) \quad \%_{sup} = \frac{(z_{avg} \text{ en présence de } mNBA) - (z_{avg} \text{ en absence de } mNBA)}{z_{avg} \text{ en absence de } mNBA} \times 100$$

Plus simplement, nous avons choisi de définir le coefficient d'augmentation de charges ($CEC_{1\%}$ pour *Charge Enhancement Coefficient at 1% of mNBA*) comme la différence entre la valeur de z_{avg} en présence de 1% de *mNBA* sur la valeur de z_{avg} en absence de *mNBA* (**Equation 3-5**).

(Eq. 3-5)

$$CEC_{1\%} = (z_{avg} \text{ en présence de } 1\% \text{ de } mNBA) - (z_{avg} \text{ en absence de } mNBA)$$

De cette manière, une valeur de $CEC_{1\%}$ positive montre une augmentation de la valeur de z_{avg} d'un analyte et une valeur négative en montre la diminution. La $CEC_{1\%}$ permet donc de n'observer que la variation induite par l'action de *mNBA* et de quantifier cette variation en nombre de charges supplémentaires ce qui facilitera la discussion de leurs localisations.

II. Influence du *mNBA* sur les processus de désorption/ionisation par ESI(+)

Ayant dorénavant les outils mathématiques nous permettant de quantifier et de comparer les variations induites par l'ajout 1% de *mNBA* dans des solutions contenant des NCX, nous avons décidé de commencer par évaluer l'effet de la présence de *mNBA* sur les peptides d'intérêt pour l'étude de la stabilité des NCX biologiques « survivants » en phase gazeuse. Nous pourrions ainsi estimer l'influence de la présence du partenaire nucléique composant ces derniers.

II. 1. Variations observées pour les peptides

Nous avons choisi, pour cette étude, deux fragments de bradykinine modifiés de séquences PPGFSPF**KK** et PPGFSPF**RR** (respectivement, notés **-KK** et **-RR** et, de masses moléculaires (M_w) égales à 1003,55 Da et 1059,56 Da), et le fragment 11-24 de l'adrénocorticotrophine (*ACTH*) de séquence **KPVG**KKRR**PVKVYP** (noté **11-24** ; M_w = 1651,04 Da). Ces peptides ont été choisis pour leurs forts caractères basiques (tant en solution qu'en phase gazeuse) favorisant la formation de SBI entre les résidus basiques du peptide et les groupements phosphates acides du brin d'ADN³⁷. En effet, les résidus d'arginine et de lysine sont, avec les résidus d'histidine, les acides aminés ayant les plus fortes affinités protoniques. De plus, dans de précédentes études de notre laboratoire^{38,39}, l'utilisation des voies de fragmentation des peptides **-KK** et **-RR** *i.e.*, la perte d'un (ou de deux) résidu(s) proline lorsque ce résidu est protoné, a permis de localiser les charges portées par ces peptides après activation par CID dans l'analyseur.

La **Figure 3-1** présente l'influence de la présence de 1% *mNBA* sur les distributions d'états de charge de peptides protonés formés par ESI en mode positif.

³⁷ K. Schug, W. Lindner ; Development of a screening technique for noncovalent complex formation between guanidinium- and phosphonate- functionalized amino acids by electrospray ionization ion trap mass spectrometry : assessing ionization and functional group interaction. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2004**, 235, 213-222.

³⁸ S. Alves, A. Woods, J.-C. Tabet ; Charge State Effect on the Zwitterion Influence on Stability of Non-covalent Interaction of Single-stranded DNA with Peptides. *J. Mass Spectrom.*, **2007**, 42, 1613-1622.

³⁹ S. Alves, A. Woods, A. Delvolve, J.-C. Tabet. Influence of Salt Bridges Interactions on the Gas-phase Stability of DNA/Peptide Complexes. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2008**, 278, 122-128.

CHAPITRE 3 :

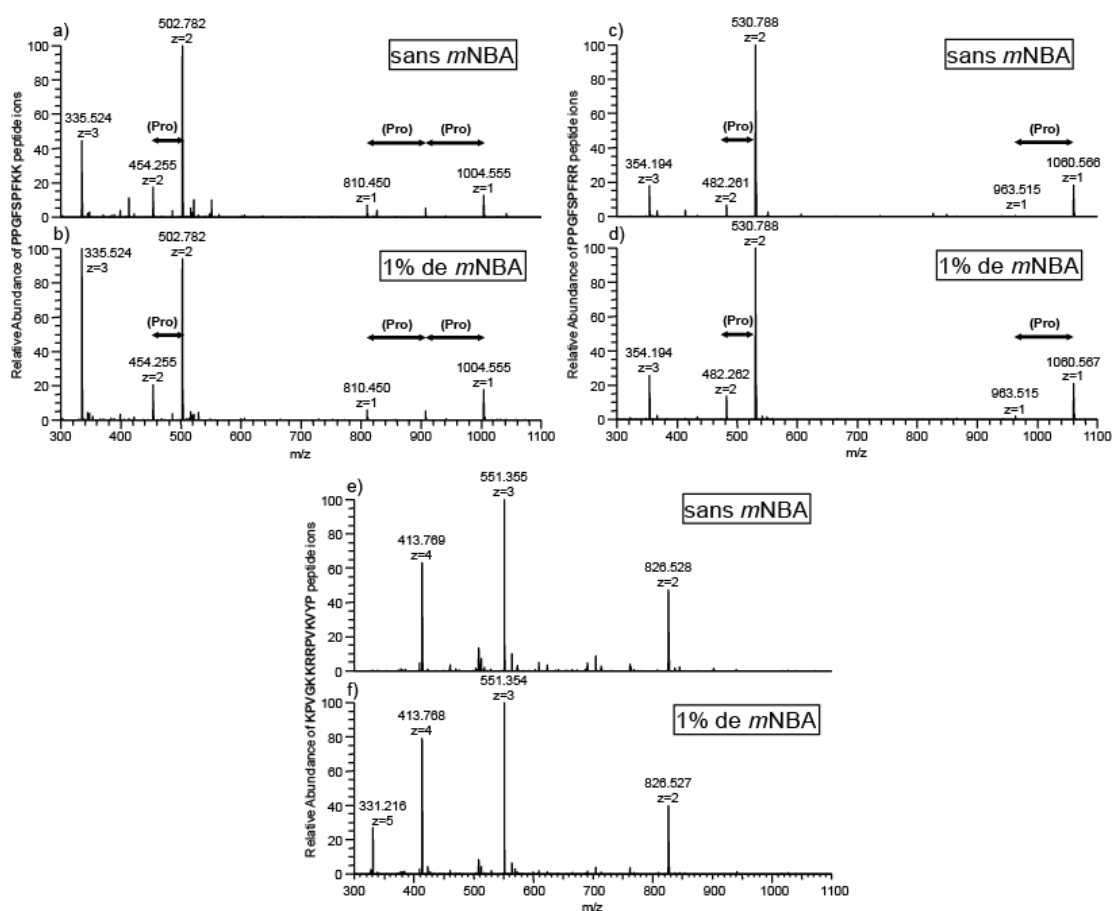


Figure 3-1. Spectres de masses de peptides protonés de séquences (a, b) PPGFSPFKK, (c, d) PPGFSPFRR et (e, f) KPVGKKRRPVKVVYP, formés par ESI en mode positif (a, c, e) en l’absence et (b, d, f) en présence de *mNBA*. **Conditions expérimentales.** Concentration : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l’acétate d’ammonium (20 mmol/L ; $\text{pH} \approx 7$). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d’ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l’interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V.

Pour les peptides $-\text{KK}$ et $-\text{RR}$, la comparaison des spectres de masses obtenus sans (Figure 3-1a et 3-1c) ou avec (Figure 3-1b et 3-1d) l’addition de *mNBA* ne montre pas de différences particulières. En effet, les valeurs de z_{high} comme celles de z_{low} sont restées inchangées. Seules les augmentations des intensités relatives des signaux de plus hauts états de charges *i.e.*, $[-\text{KK} + 3\text{H}]^{3+}$ et $[-\text{RR} + 3\text{H}]^{3+}$, montrent une augmentation de la valeur de z_{avg} . De plus, comme aucune modification des abondances relatives des pertes de résidus proline n’a été observée, nous pouvons conclure que la localisation des charges au sein des ions précurseurs ayant perdu des résidus proline (*i.e.*, $z = 1$ et $z = 2$) n’a pas été modifiée.

Pour le peptide **11-24**, la comparaison des spectres de masses obtenus sans (**Figure 3-1e**) ou avec (**Figure 3-1f**) l'addition de *mNBA* est plus représentative de l'effet (de « surchargement ») que l'on pourrait attendre. En effet, la distribution d'états de charge a été élargie par l'augmentation du z_{high} (de $z = 4$ à $z = 5$). De plus, l'intensité relative de l'ion $[\mathbf{11-24} + 4\text{H}]^{4+}$ a augmenté alors que celle de l'ion $[\mathbf{11-24} + 2\text{H}]^{2+}$ a diminué.

Le **Tableau 3-1** présente les résultats numériques permettant une description plus précise des effets induits par la présence de *mNBA* (lors des processus de désorption/ionisation par désolvatation) sur l'ionisation de peptides.

ESI(+)		PEPTIDES				
		-KK	-RR	11-24		
INTENSITES	Sans <i>mNBA</i>	1+	$9,82 \times 10^6$	$7,58 \times 10^6$	$4,08 \times 10^4$	
		2+	$8,42 \times 10^7$	$4,39 \times 10^7$	$4,95 \times 10^6$	
		3+	$3,77 \times 10^7$	$7,95 \times 10^6$	$1,05 \times 10^7$	
		4+			$6,77 \times 10^6$	
		I_{tot}	$1,32 \times 10^8$	$5,95 \times 10^7$	$2,23 \times 10^7$	
	1% de <i>mNBA</i>	1+	$2,58 \times 10^7$	$1,12 \times 10^7$	$2,98 \times 10^4$	
		2+	$1,47 \times 10^8$	$5,64 \times 10^7$	$4,73 \times 10^6$	
		3+	$1,55 \times 10^8$	$1,39 \times 10^7$	$1,19 \times 10^7$	
		4+			$9,30 \times 10^6$	
		5+			$3,12 \times 10^6$	
	I_{tot}	$3,28 \times 10^8$	$8,15 \times 10^7$	$2,91 \times 10^7$		
	SER_{1%}		2,48	1,37	1,30	
	CHARGES	Sans <i>mNBA</i>	z_{low}	1	1	1
			z_{avg}	2,21	2,01	3,08
z_{high}			3	3	4	
1% de <i>mNBA</i>		z_{low}	1	1	1	
		z_{avg}	2,39	2,03	3,37	
		z_{high}	3	3	5	
CEC_{1%}		0,18	0,02	0,29		

Tableau 3-1. Valeurs d'intensités absolues (par état de charge), des états de charge les plus bas (z_{low}) et des états de charge les plus hauts (z_{high}) obtenues à partir des spectres de masse présentés dans la **Figure 3-1** et valeurs d'intensités totales (I_{tot}), des rapports d'amélioration du signal (**SER_{1%}**), des états de charge moyens (z_{avg}) et des coefficients d'amélioration de charge (**CEC_{1%}**) calculés à partir des **Equations 3-1, 3-2, 3-3 et 3-5**.

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que, dans les mêmes conditions instrumentales, l'ajout de 1% de *mNBA* a augmenté l'intensité absolue de chaque espèce moléculaire, hormis les plus bas états de charge du peptide **11-24** (i.e., $z = 2$ et $z = 1$). En effet, les valeurs de **SER_{1%}** sont toutes supérieures à 1 (respectivement **2,48**, **1,37** et **1,30** pour **-KK**, **-RR** et **11-24**), montrant l'augmentation d' I_{tot} de chaque peptide.

CHAPITRE 3 :

Dans un second temps, nous pouvons confirmer que, dans les mêmes conditions instrumentales, l'ajout de 1% de *mNBA* a augmenté la valeur de z_{avg} de chaque peptide en favorisant leurs protonations (valeurs de $CEC_{1\%}$ égales à 0,18, 0,02 et 0,29 respectivement pour **-KK**, **-RR** et **11-24**).

II. 2. Variations observées pour les complexes non-covalents

II. 2. a. Influence de la présence de l'oligonucléotide sur l'action de *mNBA*

Comme le peptide **11-24** a montré une augmentation de la valeur de $CEC_{1\%}$ de 0,29 charge en moyenne, nous l'avons sélectionné pour estimer l'influence de l'ajout d'un partenaire nucléique. Ce peptide a aussi été choisi pour le grand nombre de résidus basiques, lui permettant potentiellement de porter des protons supplémentaires aux charges impliquées dans la (ou les) interaction(s) avec le brin d'ADN. Nous avons choisi parmi les partenaires nucléiques d'intérêt, l'oligonucléotide de séquence $T_5G_2T_3G_2$ ($M_w = 3686,62$ Da) ayant une grande acidité apparente en phase gazeuse (*i.e.*, une valeur de $\Delta G^{\circ}_{acid,app}$ plus faible), afin de favoriser la formation de SBI stabilisant les NCX biologiques, mais proposant néanmoins des sites de protonation énergétiquement accessibles sur les nombreuses guanines.

Le **Tableau 3-2** présente les résultats numériques permettant de décrire les effets induits par la présence de 1% *mNBA* (lors des processus d'ionisation) sur des NCX biologiques.

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que les valeurs de $SER_{1\%}$ des partenaires protonés (considérés individuellement dans le mélange) sont inférieures à 1 (respectivement 0,28 et 0,61 pour **11-24** et **$T_5G_2T_3G_2$**), montrant une diminution de la quantité absolue de chacun des partenaires non appariés. En considérant que la présence de *mNBA*, dans les microgouttelettes chargées (lors des processus d'évaporation) et/ou dans les agrégats chargés (lors des processus de désolvatation), augmente l'état de charge du peptide, on peut considérer que ce dernier est plus susceptible de former une (ou des)

NCI avec le brin d'ADN avec qui il peut être en interaction. D'ailleurs, cette explication est appuyée par la valeur de $SER_{1\%}$ supérieure à 1 observée pour les ions **NCX**.

ESI(+)		MELANGE			
		11-24	NCX	T ₅ G ₂ T ₃ G ₂	
INTENSITES	Sans mNBA	2+	1,70 x10 ⁶		2,44 x10 ⁴
		3+	5,25 x10 ⁶	7,21 x10 ³	1,16 x10 ⁶
		4+		2,54 x10 ⁵	
		<i>I</i> _{tot}	6,95 x10 ⁶	2,62 x10 ⁵	1,19 x10 ⁶
	1% de mNBA	2+	1,51 x10 ⁵		1,48 x10 ⁵
		3+	1,58 x10 ⁶	1,59 x10 ⁵	5,81 x10 ⁵
		4+	1,88 x10 ⁵	4,19 x10 ⁵	
		<i>I</i> _{tot}	1,91 x10 ⁶	5,78 x10 ⁵	7,29 x10 ⁵
	SER_{1%}		0,28	2,21	0,61
	CHARGES	Sans mNBA	<i>z</i> _{low}	2	3
<i>z</i> _{avg}			2,75	3,97	2,98
<i>z</i> _{high}			3	4	3
1% de mNBA		<i>z</i> _{low}	2	3	2
		<i>z</i> _{avg}	3,02	3,73	2,80
		<i>z</i> _{high}	4	4	3
CEC_{1%}		0,27	-0,25	-0,18	

Tableau 3-2. Valeurs d'intensités absolues (par états de charge), d'états de charge les plus bas (*z*_{low}) et d'états de charge les plus hauts (*z*_{high}) obtenues à partir d'un mélange équimolaire ADN/peptide dans les mêmes conditions expérimentales et instrumentales que les spectres présentés dans la **Figure 1** valeurs d'intensités totales (*I*_{tot}), des rapports d'amélioration du signal (**SER_{1%}**), d'états de charge moyens (*z*_{avg}) et des coefficients d'amélioration de charge (**CEC_{1%}**) calculés respectivement à partir des **Equations 3-1, 3-2, 3-3 et 3-5**.

Dans un second temps, nous pouvons remarquer que la valeur de *z*_{avg} des peptides non appariés a augmenté en présence de 1% de mNBA et que cette augmentation est comparable à celle obtenue en absence des brins d'ADN (**CEC_{1%}** respectivement égales à 0,27 et 0,29, dans les **Tableaux 3-2 et 3-1**). De plus, nous pouvons observer une diminution de la valeur de *z*_{avg} des ions **NCX** en présence de 1% de mNBA pouvant s'expliquer par la diminution de la valeur de *z*_{avg} des ions **T₅G₂T₃G₂** qui est également observée (valeurs de **CEC_{1%}** respectivement égales à -0,25 et à -0,18). Cette diminution pourrait donc s'expliquer par une action de mNBA directement sur les brins d'ADN. Cependant, la valeur de **CEC_{1%}** de **T₅G₂T₃G₂** (négative) peut aussi s'expliquer par la (ou les) rupture(s) de la (ou des) NCI durant le transfert à l'analyseur des ions **NCX** dont la charge a préalablement été réduite. Cela impliquerait aussi que le mNBA a un effet sur les brins d'ADN, mais seulement au sein des **NCX** donc uniquement en présence d'une entité peptidique *via* un appariement à plusieurs corps. Dans ce cas, la diminution de la valeur de *z*_{avg} observée pour les ions **T₅G₂T₃G₂** n'est que le reflet de l'augmentation de la

valeur de z_{avg} des ions **11-24** par dissociation des partenaires impliqués dans la (ou les) NCI. Afin de lever cette ambiguïté, nous avons décidé d'examiner l'effet de la présence de *mNBA* dans des solutions ne contenant que des oligonucléotides par ESI en mode positif.

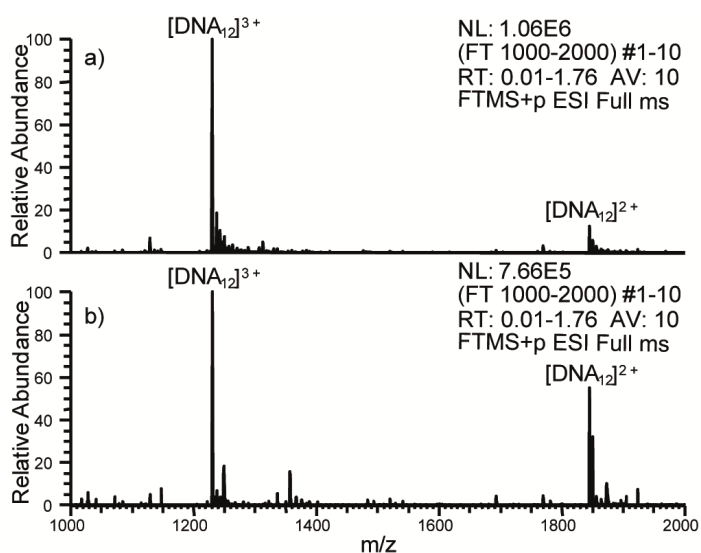


Figure 3-2. Spectres de masse des oligonucléotides de séquence $T_5G_2T_3G_2$ formés par ESI en mode positif (a) en l'absence et (b) en présence de *mNBA*. **Conditions expérimentales.** Concentration : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V.⁴⁰

La **Figure 3-2** présente l'influence de la présence de *mNBA* sur la distribution d'états de charge des ions $T_5G_2T_3G_2$ formés par ESI en mode positif. La comparaison des spectres de masse obtenus sans (**Figure 3-2a**) ou avec (**Figure 3-2b**) l'ajout de *mNBA* montre la même diminution du z_{avg} que les échantillons contenant le peptide et le brin d'ADN simultanément (valeurs de $CEC_{1\%}$ respectivement égales à -0,18 et -0,22). Nous pouvons donc conclure que les valeurs de $CEC_{1\%}$ négatives observées dans le **Tableau 3-2** sont dues à une protonation défavorable des brins d'ADN en présence de *mNBA* pendant les processus de désorption/ionisation en mode positif sans assistance d'un partenaire protéique.

⁴⁰ B. Brahim, S. Alves, R. B. Cole, J.-C. Tabet ; Charge Enhancement of Single-Stranded DNA in Negative Electrospray Ionization Using the Supercharging Reagent Meta-nitrobenzyl Alcohol. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2013**, (DOI 10.1007/s13361-013-0732-8)

II. 2. b. Influence de la présence de *mNBA* sur les voies de fragmentations

La compréhension des voies de fragmentations des NCX biologiques est essentielle à l'étude de leurs stabilités. Nous avons montré précédemment (dans les parties **II. 1.** et **II.2.**) que la présence de *mNBA* dans les solutions analysées augmente la valeur de I_{tot} d'ions peptidiques formés par ESI en mode positif. Cependant, afin de pouvoir utiliser ces augmentations d'intensités des signaux à l'étude de la stabilité des NCX biologiques, nous devons vérifier si ces ions « survivants » supplémentaires (rendus possible par la présence de *mNBA*) ne présentent aucune modification structurelle ou conformationnelle par rapport à leurs analogues formés en absence de *mNBA*. Sans entrer dans les détails (description plus exhaustive dans le **Chapitre 5**), la comparaison des dissociations (induites par collisions en source ou dans l'analyseur) d'ions précurseurs issus du transfert en phase gazeuse, sans ou en présence de *mNBA*, n'a montré aucune modification majeure de la nature ou de l'abondance des ions fragments observés.

En effet, comme nous l'avons vu auparavant (c.f. **II. 1.**), la présence de *mNBA* lors des processus d'évaporation et de désolvatation ne modifie pas les dissociations induites par collisions en source observées pour des peptides fragiles i.e., **-KK** et **-RR** (**Figure 3-1**). Par exemple, indépendamment de la présence de *mNBA*, les ions **-KK** doublement et simplement protonés (respectivement à m/z 502.78 et m/z 1004.56 sur les **Figure 3-1a** et **3-1b**) perdent respectivement un et deux résidus proline et les ions **-RR** doublement et simplement protonés (respectivement à m/z 530.79 et m/z 1060.57 sur les **Figure 3-1c** et **3-1d**) ne perdent chacun qu'un résidu proline.

La **Figure 3-3** présente l'influence de la présence de 1% de *mNBA* sur les dissociations induites par collisions (*CID* pour *Collision Induced Dissociation*) de NCX multiprotonés après une étape d'isolation dans l'analyseur.

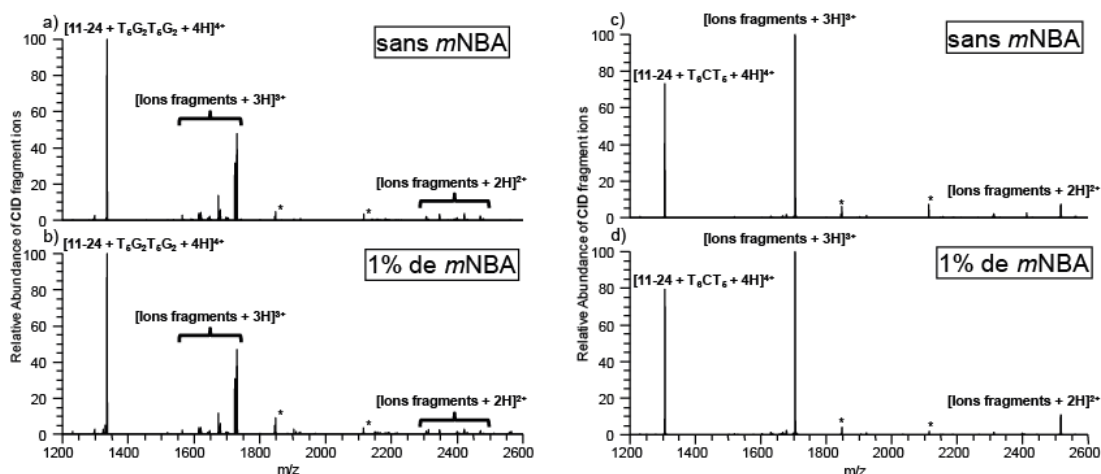


Figure 3-3. Spectres CID de NCX multiprotonés i.e., (a, b) $[11-24 + T_5G_2T_3G_2 + 4H]^{4+}$ et (c, d) $[11-24 + T_6CT_5 + 4H]^{4+}$, formés par ESI en mode positif (a, c) en l'absence et (b, d) en présence de *mNBA*. **Conditions expérimentales.** Mélange équimolaire ADN/peptide. Concentration monomères : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : CID. Fenêtre d'isolation : 3,6 (u.a.). q_z d'activation : 0,250. Energie de collision normalisée : 20 %. Temps d'activation : 1,5 ms.

La comparaison des spectres CID obtenus dans les mêmes conditions instrumentales, pour les ions $[11-24 + T_5G_2T_3G_2 + 4H]^{4+}$ sans (Figure 3-3a) ou avec (Figure 3-3b) l'ajout de *mNBA* et pour les ions $[11-24 + T_6CT_5 + 4H]^{4+}$ sans (Figure 3-3c) ou avec (Figure 3-3d) l'ajout de *mNBA*, ne montre aucune différence tant sur les voies de fragmentations que sur les intensités relatives des ions précurseurs et des ions fragments. La nature des ions NCX issus des processus de « superchargement » est donc similaire à celle des ions de références. Le *mNBA* peut donc être utilisé pour augmenter les intensités des ions NCX et ainsi faciliter leur analyse sans risque pour la véracité des résultats obtenus.

III. Influence du *mNBA* sur les processus de désorption/ionisation par ESI(-)

Dans cette partie, nous allons examiner l'influence de *mNBA* sur les processus d'évaporation des gouttelettes et de désolvatation des agrégats par ESI en mode négatif. Les nombreux groupes phosphates présents sur le squelette des oligonucléotides, et donc le caractère acide des brins d'ADN, expliquent pourquoi ces composés ont principalement été étudiés en mode

négatif^{38,41,42,43,44,45,46}. La seule étude décrivant un effet de *mNBA* sur des brins d'ADN a été réalisée en ESI(-) par *Madsen et Brodbelt*⁴⁷. Dans cette étude, il a été décrit que la présence de *mNBA* dans des solutions de duplex d'ADN augmente l'intensité du signal de ces derniers sans modifier leurs voies de fragmentation et facilite ainsi leur analyse. Il a aussi été montré, dans les informations supplémentaires, qu'en présence excessive de *mNBA*, les duplex d'ADN ont tendance à se dissocier en source, produisant ainsi les simples brins d'ADN correspondants. Notons que même si cette dernière remarque n'a pas été commentée par les auteurs, l'observation de tels phénomènes sur les duplex d'ADN (corrélant avec la dénaturation partielle observée pour les protéines étudiées par ESI en mode positif) pourrait n'être que le reflet de la perte de certaines NCI. Cependant, au vu des résultats obtenus précédemment par ESI en mode positif (c.f. **II. 2. a.**) *i.e.*, une valeur de $CEC_{1\%}$ négative, nous avons décidé d'examiner de plus près l'effet de *mNBA* sur la nature et l'intensité des signaux de simples brins d'ADN par ESI en mode négatif.

III. 1. Variations observées pour les oligonucléotides

Dans le but de mieux comprendre l'influence $\Delta G^{\circ}_{acid,app}$ des oligonucléotides sur l'action de *mNBA* durant les processus d'ionisation par ESI, différentes séquences d'ADN de longueurs variables (de 6-mer à 12-mer) ont été examinées.

La **Figure 3-4** montre l'influence de la présence de *mNBA* sur la distribution d'états de charge des ions oligonucléotidiques de séquence GT_5 (6-mer) formés par ESI en mode négatif. La comparaison des spectres de masse obtenus sans (**Figure 3-4a**) ou avec

⁴¹ P. A. Limbach, P. F. Crain, J. A. McCloskey ; Characterization of oligonucleotides and nucleic acids by mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology*, **1995**, 6, 96-102.

⁴² P. F. Crain, J. A. McCloskey ; Applications of mass spectrometry to the characterization of oligonucleotides and nucleic acids. *Current Opinion in Biotechnology*, **1998**, 9, 25-34.

⁴³ E. L. Esmans, D. Broes, I. Hoes, F. Lemiere, K. Vanhoutte ; Liquid chromatography–mass spectrometry in nucleoside, nucleotide and modified nucleotide characterization. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 794, 109-127.

⁴⁴ J. Wu, S. A. McLuckey ; Gas-phase fragmentation of oligonucleotide ions. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2004**, 237, 197-241.

⁴⁵ J. H. Banoub, R. P. Newton, E. Esmans, D. F. Ewing, G. Mackenzie ; Recent Developments in Mass Spectrometry for the Characterization of Nucleosides, Nucleotides, Oligonucleotides, and Nucleic Acids. *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1869-1915.

⁴⁶ F. Rosu, S. Pirotte, E. De Pauw, V. Gabelica ; Positive and negative ion mode ESI-MS and MS/MS for studying drug-DNA complexes. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 253, 156-171.

⁴⁷ J. A. Madsen, J. S. Brodbelt ; Asymmetric Charge Partitioning upon Dissociation of DNA Duplexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, 21, 1144-1150.

(**Figure 3-4b**) l'ajout de *mNBA* montre clairement l'effet de *mNBA* sur la distribution d'états de charge obtenue pour des simples brins d'ADN. La présence de *mNBA* a élargi la distribution d'états de charge de 1 à 4 états de charge détectés. De plus, alors que la valeur de z_{low} est restée inchangée, la présence de *mNBA* a nettement augmenté la valeur du z_{high} de $z = -2$ à $z = -5$. L'état de charge $z = -5$ correspond à la déprotonation de tous les groupements phosphates constituant ces simples brins d'ADN (6-mer) et par conséquent, à l'état de charge maximum potentiel (z_{max}). Enfin, notons que les pics satellites présents sur la **Figure 3-4b** correspondent à des ions adduits avec des métaux alcalins tandis qu'aucun adduit de *mNBA* n'a été observé.

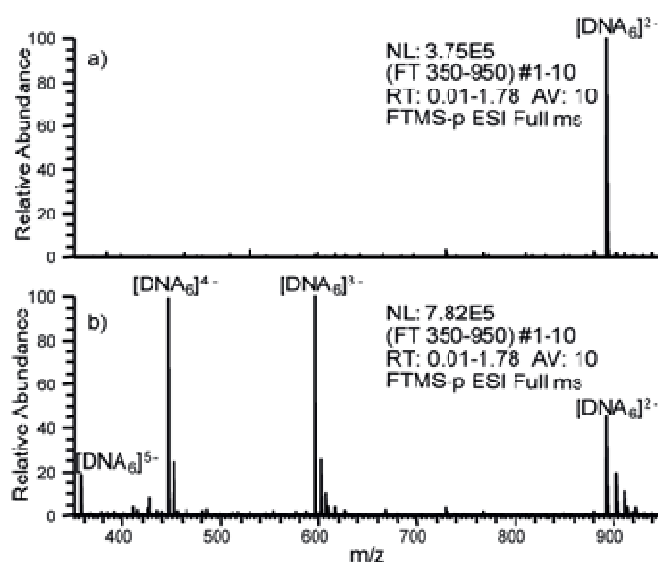


Figure 3-4. Spectres de masse de l'oligonucléotide de séquence GT₅ formés par ESI en mode négatif (a) en l'absence et (b) en présence de *mNBA*. **Conditions expérimentales.** Concentration monomères : 5 μmol/L. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH ≈ 7). **Paramètres de la source.** Instrument : LTQ-Orbitrap-XL. Mode : Infusion par ESI. Débit liquide : 5 μL/min. Tension d'ionisation : -3,5 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 280°C. Tension au capillaire de transfert : -50 V. Tension au « Tube Lens » : -110 V.⁴⁰

La **Figure 3-5** montre l'influence de la présence de *mNBA* sur la distribution d'états de charge des ions G₂A₂T₂A₂C₂A₂ (12-mer) formés par ESI en mode négatif. La comparaison des spectres de masse obtenus sans (**Figure 3-5a**) ou avec (**Figure 3-5b**) l'ajout de *mNBA* suit la même tendance que celle observée sur la distribution d'états de charge pour des brins d'ADN plus courts (6-mer). La présence de *mNBA* a élargi la distribution d'états de charge de 3 à 7 états de charge simultanément détectés. De plus, alors que la valeur de z_{low} est aussi restée inchangée, la présence de *mNBA* a provoqué

l'augmentation de la valeur du z_{high} de $z = -4$ à $z = -8$, correspondant à la déprotonation de 8 des 11 groupements phosphates constituant ces simples brins d'ADN (12-mer).

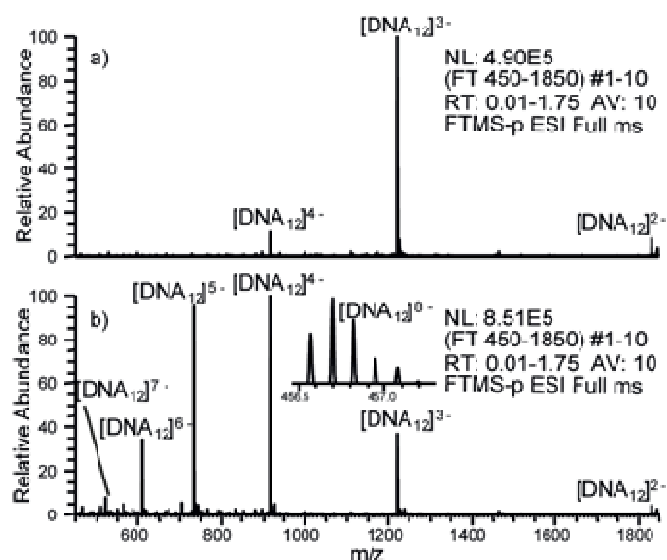


Figure 3-5. Spectres de masse des oligonucléotides de séquence G₂A₂T₂A₂C₂A₂ formés par ESI en mode négatif (a) en l'absence et (b) en présence de mNBA. **Conditions expérimentales.** Concentration monomères : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(-) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : -3,5 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 280°C. Tension au capillaire de transfert : -50 V. Tension au « Tube Lens » : -110 V.⁴⁰

Les **Tableaux 3-3** et **3-4** présentent les résultats obtenus par ESI en mode négatif pour toutes les solutions d'oligonucléotides testées en absence et en présence de 1% de mNBA.

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que les valeurs de SER_{1%} sont systématiquement supérieures à 1 (**Tableau 3-3**) indiquant que la présence de 1% de mNBA implique invariablement une amélioration du signal des simples brins d'ADN.

Dans un second temps, nous pouvons remarquer que toutes les valeurs de CEC_{1%} sont strictement positives (**Tableau 3-4**) montrant la capacité de mNBA à augmenter l'état de charge moyen de simples brins d'ADN en favorisant leurs déprotonations. De plus, les valeurs de CEC_{1%} des plus longs oligonucléotides semblent augmenter avec le nombre de nucléobases thymines et de plus faibles variations sont observées en fonction des positions de ces dernières.

CHAPITRE 3 :

ESI(-)	Sans mNBA		1% mNBA		SER _{1%}	RSD
	I_{tot}	RSD	I_{tot}	RSD		
<u>6-mer</u>						
5'-TTTTTT-3'	8.36×10^5	± 2%	4.53×10^6	± 12%	5,4	± 12%
5'-TTATTT-3'	6.17×10^5	± 3%	3.70×10^6	± 3%	6,0	± 4%
5'-TTCTTT-3'	6.55×10^5	± 2%	4.41×10^6	± 3%	6,7	± 3%
5'-GTTTTT-3'	8.60×10^5	± 4%	6.96×10^6	± 2%	8,1	± 5%
5'-GGTTTT-3'	5.61×10^5	± 1%	6.25×10^6	± 2%	11,1	± 2%
<u>12-mer</u>						
5'-AAAAACCAAAAA-3'	2.47×10^6	± 5%	8.30×10^6	± 1%	3,3	± 5%
5'-GGAATTAACCAA-3'	1.94×10^6	± 2%	7.67×10^6	± 1%	3,9	± 3%
5'-CCAATTAAGGAA-3'	2.40×10^6	± 3%	7.66×10^6	± 1%	3,2	± 3%
5'-GGGCCACAATTT-3'	2.29×10^6	± 3%	5.72×10^6	± 1%	2,5	± 3%
5'-TTTCCACAAGGG-3'	2.62×10^6	± 2%	6.33×10^6	± 3%	2,4	± 4%
5'-AAATTGTGGCCC-3'	2.13×10^6	± 4%	6.37×10^6	± 3%	3,0	± 5%
5'-CCCTTGTGGA-3'	1.74×10^6	± 5%	4.72×10^6	± 2%	2,7	± 6%
5'-TTGGTTAATTCC-3'	1.61×10^6	± 8%	9.30×10^6	± 2%	5,8	± 8%
5'-GGTTAATTCCTT-3'	3.17×10^6	± 2%	8.77×10^6	± 6%	2,8	± 6%

Tableau 3-3. Valeurs d'intensités totales (I_{tot} ; **Equation 3-1**) et des rapports d'amélioration du signal (SER_{1%} ; **Equation 3-3**) calculées à partir des résultats obtenus des spectres de masse réalisés dans les mêmes conditions expérimentales et instrumentales que les **Figures 3-4** et **3-5**. Les écarts types relatifs (RSD pour *Relative Standard Deviation*) ont été calculés à partir de 10 mesures différentes.⁴⁰

	Sans mNBA			1% mNBA			CEC _{1%}	RSD
	z_{avg}	RSD	z_{high}	z_{avg}	RSD	z_{high}		
<u>6-mer</u>								
5'-TTTTTT-3'	2,00	± 0,1%	2	3,17	± 1,5%	5	1,17	± 4,5%
5'-TTATTT-3'	2,00	± 0,1%	2	3,17	± 0,3%	5	1,18	± 1,0%
5'-TTCTTT-3'	2,00	± 0,1%	2	3,19	± 0,3%	5	1,19	± 0,9%
5'-GTTTTT-3'	2,00	± 0,1%	2	3,36	± 0,2%	5	1,36	± 0,7%
5'-GGTTTT-3'	2,04	± 0,1%	3	3,27	± 0,2%	5	1,23	± 0,5%
<u>12-mer</u>								
5'-AAAAACCAAAAA-3'	2,88	± 0,1%	4	4,22	± 0,2%	7	1,34	± 0,7%
5'-GGAATTAACCAA-3'	3,04	± 0,1%	4	4,52	± 0,1%	8	1,49	± 0,5%
5'-CCAATTAAGGAA-3'	3,05	± 0,1%	4	4,49	± 0,4%	8	1,43	± 1,9%
5'-GGGCCACAATTT-3'	3,17	± 0,1%	4	4,56	± 0,3%	7	1,38	± 1,2%
5'-TTTCCACAAGGG-3'	3,16	± 0,1%	4	4,56	± 0,2%	7	1,41	± 1,0%
5'-AAATTGTGGCCC-3'	3,09	± 0,2%	4	4,62	± 0,2%	8	1,52	± 1,0%
5'-CCCTTGTGGA-3'	3,23	± 0,1%	4	4,76	± 0,2%	8	1,54	± 1,2%
5'-TTGGTTAATTCC-3'	3,12	± 0,1%	4	4,71	± 0,3%	8	1,59	± 1,4%
5'-GGTTAATTCCTT-3'	3,13	± 0,1%	4	4,73	± 0,2%	8	1,60	± 0,9%

Tableau 3-4. Valeurs d'états de charge moyens (z_{avg} ; **Equation 3-3**), d'états de charge les plus hauts (z_{high}) et des coefficients d'amélioration de charge (CEC_{1%} ; **Equation 3-4**) calculées à partir des résultats obtenus des spectres de masse réalisés dans les mêmes conditions expérimentales et instrumentales que les **Figures 3-4** et **3-5**. Les écarts types relatifs (RSD pour *Relative Standard Deviation*) ont été calculés à partir de 10 mesures différentes.⁴⁰

III. 2. Variations observées pour les complexes non-covalents

III. 2. a. Influence de la présence du peptide sur l'action de *mNBA*

La **Figure 3-6** montre l'influence de la présence de *mNBA* sur les distributions d'états de charge issues d'une solution d'un mélange équimolaire ADN/peptide, respectivement $T_5G_2T_3G_2$ et **11-24**, formées par ESI en mode négatif. La comparaison des spectres de masse obtenus sans (**Figure 3-6a**) ou avec (**Figure 3-6c**) l'ajout de 1% de *mNBA* a montré une distribution d'états de charge des simples brins d'ADN similaire à celle obtenue pour des solutions ne contenant que ces derniers *i.e.*, son élargissement par l'augmentation de sa valeur de z_{high} . La distribution d'états de charge des ions **NCX** suit la même tendance que celle observée pour les simples brins d'ADN. En effet, la présence de *mNBA* a élargi leur distribution d'états de charge de 2 à 4 états de charge simultanément détectés. De plus, alors que la valeur de z_{low} est aussi restée inchangée, la présence de *mNBA* a augmenté la valeur du z_{high} de $z = -3$ à $z = -6$.

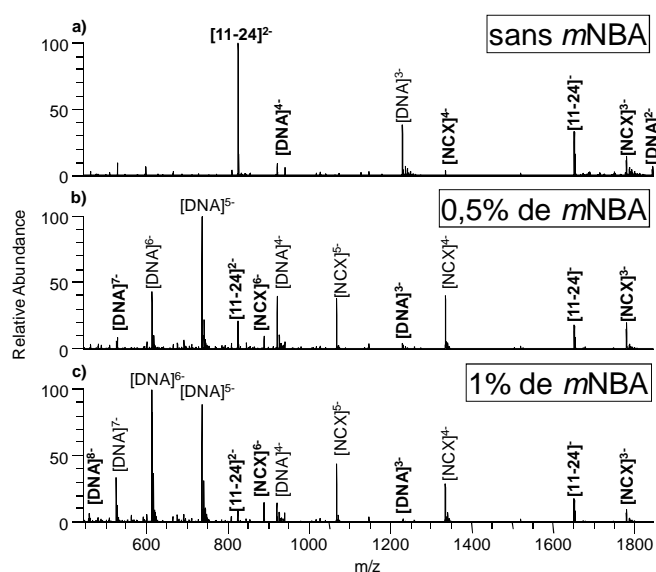


Figure 3-6. Spectres de masse d'un mélange équimolaire peptide/ADN, respectivement le fragment 11-24 d'ACTH et l'oligonucléotide de séquence $T_5G_2T_3G_2$, formés par ESI en mode négatif (**a**) en l'absence et en présence (**b**) de 0,5% et (**c**) de 1% de *mNBA*. **Conditions expérimentales.** Concentration monomères : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1 : 1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; $\text{pH} \approx 7$). **Paramètres de la source.** Instrument : LTQ-Orbitrap-XL. Mode : Infusion par ESI. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : -4,0 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : -80 V. Tension au « Tube Lens » : -130 V.

CHAPITRE 3 :

Le **Tableau 3-5** présente les résultats obtenus par ESI en mode négatif à partir de solutions de mélange équimolaire entre le fragment **11-24** d'ACTH et différents oligonucléotides, respectivement de séquence **T₅G₂T₃G₂**, **T₂G₂T₂A₂T₂C₂**, **G₂A₂T₂A₂C₂A₂** et **A₅C₂A₅**, testées en absence et en présence de 1% de *mNBA*.

ESI(-)	<i>Sans mNBA</i>		<i>1% mNBA</i>		SER _{1%}	CEC _{1%}
	<i>I_{tot}</i>	<i>z_{avg}</i>	<i>I_{tot}</i>	<i>z_{avg}</i>		
<i>5'-TTTTGGTTTGG-3'</i>	<i>7.78E+05</i>	<i>3.24</i>	<i>2.01E+06</i>	<i>5.69</i>	2.58	2.45
<i>5'-TTTTGGTTTGG-3'</i>	<i>3.09E+05</i>	<i>3.26</i>	<i>4.61E+05</i>	<i>5.67</i>	1.49	2.41
NCX	<i>6.11E+04</i>	<i>3.53</i>	<i>8.23E+05</i>	<i>4.89</i>	13.47	1.36
11-24	<i>1.77E+06</i>	<i>1.94</i>	<i>1.08E+05</i>	<i>1.47</i>	0.06	-0.47
<i>5'-TTGGTTAATTCC-3'</i>	<i>1.52E+06</i>	<i>3.3</i>	<i>3.26E+07</i>	<i>5.15</i>	21.45	1.85
<i>5'-TTGGTTAATTCC-3'</i>	<i>7.94E+05</i>	<i>3.27</i>	<i>8.26E+06</i>	<i>5.46</i>	10.40	2.19
NCX	<i>1.55E+05</i>	<i>3.41</i>	<i>5.05E+06</i>	<i>4.39</i>	32.58	0.98
11-24	<i>1.78E+06</i>	<i>1.96</i>	<i>8.30E+04</i>	<i>1.47</i>	0.05	-0.49
<i>5'-GGAATTAACCAA-3'</i>	<i>1.36E+06</i>	<i>3.21</i>	<i>2.40E+07</i>	<i>4.94</i>	17.65	1.73
<i>5'-GGAATTAACCAA-3'</i>	<i>7.30E+05</i>	<i>3.19</i>	<i>4.04E+06</i>	<i>5.19</i>	5.53	2.00
NCX	<i>1.20E+05</i>	<i>3.37</i>	<i>3.16E+06</i>	<i>4.36</i>	26.33	0.98
11-24	<i>1.79E+06</i>	<i>1.96</i>	<i>8.09E+04</i>	<i>1.52</i>	0.05	-0.44
<i>5'-AAAAACCAAAA-3'</i>	<i>1.64E+06</i>	<i>3.07</i>	<i>1.47E+07</i>	<i>4.49</i>	8.96	1.42
<i>5'-AAAAACCAAAA-3'</i>	<i>1.23E+06</i>	<i>2.97</i>	<i>5.36E+06</i>	<i>4.86</i>	4.36	1.89
NCX	<i>1.83E+05</i>	<i>3.21</i>	<i>3.94E+06</i>	<i>4.16</i>	21.53	0.95
11-24	<i>1.96E+06</i>	<i>1.92</i>	<i>1.22E+05</i>	<i>1.45</i>	0.06	-0.47

Tableau 3-5. Valeurs d'intensités totales (*I_{tot}* ; **Equation 3-1**), d'états de charge moyens (*z_{avg}* ; **Equation 3-3**), des rapports d'amélioration du signal (SER_{1%} ; **Equation 3-3**) et des coefficients d'amélioration de masse (CEC_{1%} ; **Equation 3-4**) calculées à partir des résultats obtenus des spectres de masse d'oligonucléotides seuls (séquences *en italique*) et de mélanges équimolaires peptide/oligonucléotide réalisés dans les mêmes conditions expérimentales et instrumentales que la **Figures 3-6**.

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que, contrairement aux résultats obtenus en mode positif *i.e.*, la diminution de l'intensité des signaux correspondants aux deux partenaires constituant le NCX, seules les valeurs de SER_{1%} des ions **11-24** sont inférieures à 1 par ionisation en mode négatif. De plus, même si les valeurs de SER_{1%} des oligonucléotides, en présence du peptide **11-24**, sont toutes supérieures à 1 (respectivement, *1,49*, *10,40*, *5,53* et *4,36* pour **T₅G₂T₃G₂**, **T₂G₂T₂A₂T₂C₂**, **G₂A₂T₂A₂C₂A₂** et **A₅C₂A₅**), la comparaison de ces valeurs de SER_{1%} avec celles obtenues pour des solutions de contenant que les oligonucléotides (séquences *en italique* dans le **Tableau 3-5**) montre la diminution de la quantité absolue d'oligonucléotides déprotonés en présence du peptide. De la même manière que pour les ions de peptides produits en mode positif, la présence de *mNBA* dans les microgouttelettes chargées augmente l'état de charge de l'oligonucléotide en mode négatif en favorisant sa (ou ses) déprotonation(s), on peut alors considérer que ce dernier est plus susceptible de former

une (ou des) NCI avec le peptide avec lequel il peut être en interaction. D'ailleurs, encore une fois, cette explication est appuyée par les valeurs de $SER_{1\%}$ (supérieures à 1) observées pour les ions **NCX** (respectivement 13,47, 32,58, 26,33 et 21,53 pour les NCX contenant **T₅G₂T₃G₂**, **T₂G₂T₂A₂T₂C₂**, **G₂A₂T₂A₂C₂A₂** et **A₅C₂A₅**).

Dans un second temps, nous pouvons remarquer une diminution des valeurs de z_{avg} des ions de **11-24** en présence de 1% de *mNBA* *i.e.*, des valeurs de $CEC_{1\%}$ négatives, indépendamment de la séquence du partenaire oligonucléotidique. Nous pouvons aussi remarquer, indépendamment de la présence du peptide, une augmentation des valeurs de z_{avg} (et de $CEC_{1\%}$) des oligonucléotides présentés dans le **Tableau 3-5** par rapport à ceux présentés dans le **Tableau 3-4**, attribuée aux conditions de désolvatation plus dures nécessaires au transfert des NCX de plus hauts rapports m/z jusqu'à l'analyseur.

De plus, notons que même si les ions **NCX** montrent (comme en mode d'ionisation positif) la même tendance que les simples brins d'ADN, de par la présence du peptide **11-24** au sein des ions **NCX**, leurs valeurs de $CEC_{1\%}$ (respectivement égales à 1,36, 0,98, 0,98 et 0,95 pour les NCX constitués des oligonucléotides **T₅G₂T₃G₂**, **T₂G₂T₂A₂T₂C₂**, **G₂A₂T₂A₂C₂A₂** et **A₅C₂A₅**) sont restées inférieures aux valeurs calculées pour les oligonucléotides déprotonés dans le mélange ($CEC_{1\%}$ égales à 2,41, 2,19, 2,00 et 1.89 respectivement pour **T₅G₂T₃G₂**, **T₂G₂T₂A₂T₂C₂**, **G₂A₂T₂A₂C₂A₂** et **A₅C₂A₅**).

III. 2. b. Influence de la présence de *mNBA* sur les voies de fragmentations

Comme en mode d'ionisation positif (**II. 2. b.**), afin de pouvoir utiliser les augmentations d'intensités des signaux à l'étude de la stabilité des NCX biologiques, nous devons vérifier si les ions « survivants » supplémentaires (rendus possibles par la présence de *mNBA*) ne présentent aucune modification structurale ou conformationnelle par rapport à leurs analogues formés en absence de *mNBA*. Encore une fois, la comparaison des dissociations induites par excitation résonnante dans le LTQ d'ions précurseurs formés, sans ou en présence de *mNBA*, n'a montré aucune modification significative de la nature et de l'abondance des ions fragments observés.

La **Figure 3-7** montre l'influence de la présence de 1% de *m*NBA sur les dissociations induites par excitation résonnante de brins d'ADN triplement déprotonés. La comparaison des spectres CID obtenus dans les mêmes conditions instrumentales, pour les ions $[A_5C_2A_5 - 3H]^{3-}$, sans (**Figure 3-7a**) ou avec (**Figure 3-7b**) l'ajout de *m*NBA, ne montre que l'augmentation de l'abondance des ions précurseurs sans aucune modification des voies de fragmentations détectées *i.e.*, de l'abondance relative des ions fragments les uns par rapport aux autres.

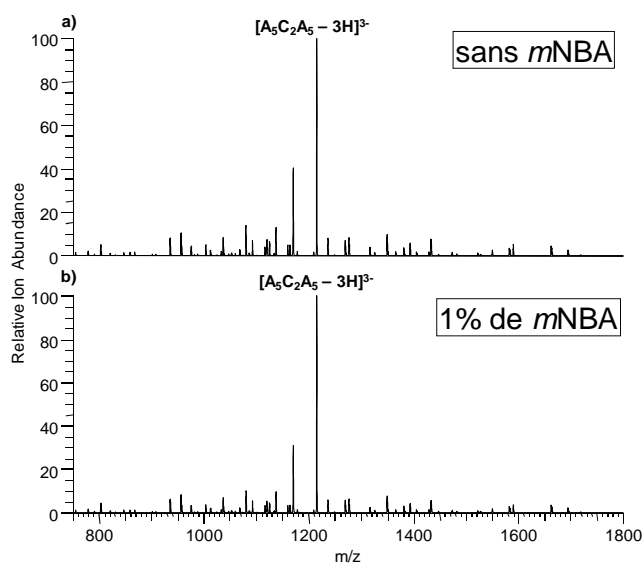


Figure 3-7. Spectres CID d'oligonucléotides triplement déprotonés *i.e.*, $[A_5C_2A_5 - 3H]^{3-}$, formés par ESI en mode négatif (a) en l'absence et (b) en présence de 1% de *m*NBA. **Conditions expérimentales.** Concentration monomères : 5 μ mol/L. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 μ L/min. Tension d'ionisation : -3,5 kV. Débit gazeux : 25 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : -50 V. Tension au « Tube Lens » : -110 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : CID. Fenêtre d'isolation : 3,6 (u.a.). q_z d'activation : 0,250. Energie de collision normalisée : 30%. Temps d'activation : 1,5 ms.

La **Figure 3-8** montre l'influence de la présence de 1% de *m*NBA sur les dissociations induites par excitation résonnante de NCX multi-déprotonés. De même que pour les simples brins d'ADN, la comparaison des spectres CID obtenus dans les mêmes conditions instrumentales, pour les ions $[11-24 + T_5G_2T_3G_2 - 4H]^{4-}$, produits par ESI sans (**Figure 3-8a**) ou avec (**Figure 3-8b**) l'ajout de *m*NBA, ne montre que l'augmentation de l'abondance des ions précurseurs sans aucune modification des voies de fragmentations détectées *i.e.*, de l'abondance relative des ions fragments les uns par rapport aux autres.

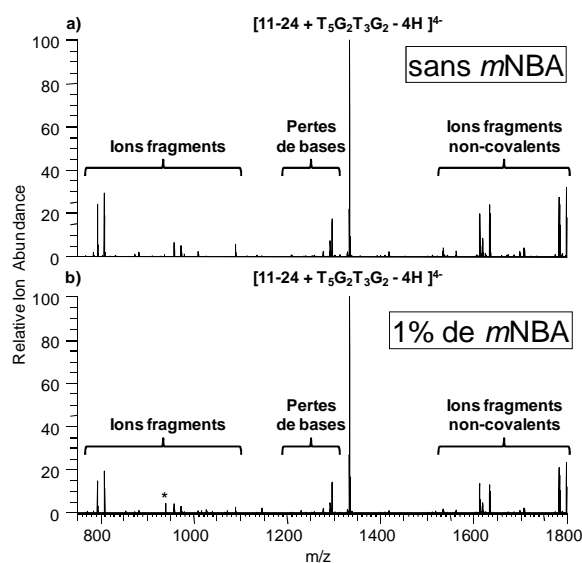


Figure 3-8. Spectres CID de NCX multi-déprotonés i.e., $[11-24 + T_5G_2T_3G_2 - 4H]^4-$, formés par ESI en mode négatif (a) en l'absence et (b) en présence de 1% de mNBA. **Conditions expérimentales.** Mélange équimolaire ADN/peptide. Concentration monomères : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : -3,5 kV. Débit gazeux : 25 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : -50 V. Tension au « Tube Lens » : -110 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : CID. Fenêtre d'isolation : 3,6 (u.a.). q_z d'activation : 0,250. Energie de collision normalisée : 30%. Temps d'activation : 1,5 ms.

Nous pouvons conclure que la nature i.e., la localisation des sites chargés (libres ou en interaction avec le partenaire), des ions NCX multi-déprotonés issus des processus ESI de « surchargement » en mode négatif est donc similaire à celle des ions de références. Le mNBA peut donc être utilisé pour augmenter les intensités des ions NCX et ainsi faciliter leur analyse sans risque pour la véracité des résultats obtenus aussi bien en mode d'ionisation positif qu'en mode d'ionisation négatif.

IV. Modèle proposé pour la désolvatation des agrégats chargés

IV. 1. Dépendance du modèle vis-à-vis de la polarité

Ces dix dernières années, le mNBA a été décrit en profondeur dans la littérature pour sa capacité à augmenter, par ESI en mode positif, l'intensité du signal¹⁴, la valeur de Z_{high} et la valeur de Z_{avg} ^{13-16,20-30,35} de peptides^{13,20,25}, de protéines^{13-16,23,25-27,29-30,35} et de NCX protéiques^{21-22,24,28}. Très tôt, *Williams and co-workers*¹⁵ ont proposé que la tension superficielle du solvant constitue un facteur macroscopique important dans le mécanisme

CHAPITRE 3 :

de « superchargement ». En effet, la limite de Rayleigh (quantifiant la cascade d'explosions Coulombienne des gouttelettes) pour une gouttelette sphérique est généralement donnée par l'**Equation 3-6**, où z_r est la limite de charge unitaire, e est la charge élémentaire, ϵ_0 est la permittivité du milieu, γ est la tension superficielle et R est le rayon de la gouttelette.

$$\text{(Eq. 3-6)} \quad z_r e = 8\pi (\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}$$

La modification de la tension superficielle induite par la présence de *mNBA*, et par conséquent, la limite (de charge) de Rayleigh résultante est supposée indépendante de la polarité des ions choisis. Par conséquent, les mêmes améliorations doivent être observées quelque soit la polarité de l'agrégat chargé lorsque les mêmes préparations d'échantillons et les mêmes conditions expérimentales sont mises en œuvre (dans la limite des possibilités de transferts de protons de l'analyte). Cependant, les valeurs de $SER_{1\%}$ obtenues pour des peptides protonés par ESI en mode positif sont toutes supérieures à 1 alors que celles obtenues en mode négatif sont toutes inférieures à 1. Réciproquement, les valeurs de $SER_{1\%}$ obtenues pour des simples brins d'ADN protonés sous ESI en mode positif sont toutes inférieures à 1 alors que celles obtenues en mode négatif sont toutes supérieures à 1. De même, les valeurs de $CEC_{1\%}$ calculées présentent deux tendances différentes selon la nature de l'analyte, indépendamment de la polarité utilisée : (i) l'addition de *mNBA* dans des solutions de peptides a augmenté le nombre de charges nettes positives (en mode positif) et a diminué le nombre de charges nettes négatives (en mode négatif), et réciproquement, (ii) l'addition de *mNBA* dans des solutions de simples brins d'ADN a diminué le nombre de charges nettes positives (en mode positif) et a augmenté le nombre de charges nettes négatives (en mode négatif).

Ce contraste des résultats obtenus pour les deux polarités d'ionisation montre que la tension superficielle du solvant n'est probablement pas le seul facteur impliqué dans le mécanisme ESI de « superchargement ». D'ailleurs, ce contraste est probablement un indice d'intérêt du mécanisme de « superchargement ». En effet, il suggère que *mNBA* favorise un transfert de proton intermoléculaire (intra-agrégat) unidirectionnel indépendant de la polarité d'ionisation résultant (i) soit dans un plus grand nombre de

résidus peptidiques basiques protonés, (ii) soit dans un plus grand nombre de phosphates déprotonés.

IV. 2. Modèle de désolvation existant pour les protéines protonées

Pour les protéines, outre les ambiguïtés non-négligeables apportées par leur dénaturation due à la présence de *mNBA* lors de leur transfert en phase gazeuse, *Loo and co-workers*^{21,23} ont montré que comme : (i) aucun ion *mNBA* protoné n'a été observé dans la région de bas rapports *m/z*, et (ii) les ions adduits de *mNBA* sur les protéines sont perdus sous forme d'espèces neutres (à de plus hautes énergies de transfert des ions vers l'analyseur) bien qu'ils conduisaient à des ions de la myoglobine « superchargés » par ESI en mode positif, le *mNBA* est supposé posséder une valeur de *GB* plus basse que les valeurs de *GB_{app}* des ions de la myoglobine multi-protonés de plus hauts états de charge. Dans le cas de nos peptides de tailles limitées, la tendance ne corrèle pas directement le nombre et la nature des sites basiques, et implicitement, leurs basicités en phase gazeuse. Bien que le peptide **11-24** (présumé le plus basique en phase gazeuse des trois peptides testés) ai obtenu la valeur de *CEC_{1%}* la plus grande (0,29 ; **Tableau 3-1**), la valeur de *CEC_{1%}* obtenue pour le peptide **-RR** est inférieure à celle obtenue pour le peptide **-KK**, bien que ce dernier soit présumé moins basique en phase gazeuse (respectivement 0,02 et 0,19 ; **Tableau 3-1**). Ce résultat s'explique par la présence de SBI intramoléculaire favorisé énergétiquement entre un groupement guanidinium de l'arginine (très basique en phase gazeuse) et le groupement acide carboxylique terminal (suffisamment acide en phase gazeuse) qui, de plus, n'est pas défavorisé entropiquement pour des résidus arginines situés à l'extrémité *C_{term}*⁴⁸. Le manque de « superchargement », s'expliquant par un site basique moins disponible, n'est donc que le reflet de la « survie » d'une SBI pendant les processus de désorption/ionisation en présence de *mNBA*. D'ailleurs, cette explication est cohérente par les valeurs de *z_{avg}* de **-RR** qui restent inférieures à celles de **-KK**, et ce, indépendamment de la présence de *mNBA*.

⁴⁸ J. S. Prell, J. T. O'Brien, J. D. Steill, J. Oomens, E. R. Williams ; Structures of Protonated Dipeptides: The Role of Arginine in Stabilizing Salt Bridges. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 11442-11449.

IV. 3. Modèle de désolvatation proposé pour les oligonucléotides déprotonés

A partir d'observations analogues à celles de *Loo and co-workers*^{21,23} mais pour nos expériences en mode négatif d'ionisation (pas de détection d'ion $[mNBA - H]^-$, ni d'adduits de *mNBA* négativement chargés sur les oligonucléotides), la valeur de ΔG°_{ac} de *mNBA* est supposée supérieure aux valeurs de $\Delta G^\circ_{acid,app}$ des oligonucléotides déprotonés une ou plusieurs fois. Cependant il est aussi possible que le *mNBA* n'interagisse pas directement avec les groupements phosphates et nécessite une assistance pour déprotoner les simples brins d'ADN. De fait, une suppression de signal est observée lorsque le tampon acétate d'ammonium n'est pas introduit dans l'échantillon durant sa préparation. L'acétate d'ammonium, communément utilisé comme tampon dans les échantillons d'ADN, ne contrôle pas uniquement le pH de la solution (e.g. limite la production indésirable de duplex), mais interagit aussi avec les groupes phosphates qui sont totalement déprotonés en solution ($pK_a < 1$) et donc génère une compétition entre les ions ammonium (NH_4^+) et les métaux alcalins pour le rôle de contre-ion (formation de sels)⁴⁹. Si un transfert de proton intermoléculaire (intra-agrégat) se produit entre *mNBA* et les ions oligonucléotides pendant les dernières étapes de désolvatation, l'augmentation d'états de charge obtenue devrait être observée en absence de contre-ion NH_4^+ . Les effets induits par la présence de *mNBA* peuvent donc être expliqués par le modèle de désolvatation précédemment établi pour le transfert d'oligonucléotides de la solution vers la phase gazeuse par *Gabelica and co-workers*^{46,50}.

Dans ce modèle, après l'évaporation complète du solvant, et durant les dernières étapes de désolvatation au niveau microscopique, un (ou des) transfert(s) de proton intermoléculaire(s) peut(vent) se produire entre les anions oligonucléotides et les cations NH_4^+ menant à la neutralisation de certains phosphates des oligonucléotides^{46,50}. Comme l'ammoniac (NH_3) n'est pas suffisamment basique pour former des SBI stables en phase

⁴⁹ R. H. Griffey, H. Sasmor, M. J. Greig ; Oligonucleotide Charge States in Negative Ionization Electrospray-Mass Spectrometry Are a Function of Solution Ammonium Ion Concentration. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **1997**, 8, 155-160.

⁵⁰ F. Rosu, E. De Pauw, V. Gabelica ; Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie*, **2008**, 90, 1074-1087.

gazeuse avec les groupements phosphates³⁹, de tels transferts de protons se produisent préférentiellement pendant les dernières étapes de désolvation et sont guidés respectivement par les valeurs de GB de NH₃ (819 kJ.mol⁻¹)⁵¹ et de $\Delta G^{\circ}_{ac,app}$ des oligonucléotides multi-déprotonés. Par définition, la valeur de ΔG°_{acid} ne peut être employée uniquement pour des ions solvatés en phase gazeuse, soit des agrégats de $[mNBA / NH_4^+ / DNA^{n-}]^{x-}$ chargés négativement libérés en phase gazeuse à partir des microgouttelettes (principalement composées de *mNBA* dont la pression de vapeur saturante est inférieure à celle de l'eau). Alors, lorsque les ions NH₄⁺ ont l'opportunité de laisser un proton à un oligonucléotide multi-déprotoné, la présence de *mNBA* semble faciliter l'autre voie de désolvation compétitive impliquant le départ direct d'un cation NH₄⁺ plutôt qu'une molécule de NH₃ neutre. Il en résulte la création d'un groupement phosphate chargé négativement supplémentaire sur l'ion oligonucléotide, et ce transfert peut être itéré plus d'une fois, jusqu'à atteindre le niveau maximum de déprotonation dicté par les valeurs de $\Delta G^{\circ}_{ac,app}$ des oligonucléotides multi-déprotonés. En considérant ce type de réaction de déprotonation consécutive d'un oligonucléotide, la valeur de $\Delta G^{\circ}_{ac,app}$ de chaque espèce multi-déprotonée augmente progressivement jusqu'au dernier transfert de proton intermoléculaire permis thermodynamiquement, éventuellement le plus haut état de charge (z_{high}) accessible. La largeur de la distribution d'états de charge des oligonucléotides en phase gazeuse corrèle donc aux gammes de valeurs de $\Delta G^{\circ}_{ac,app}$ des oligonucléotides déprotonés entre le premier et le dernier transferts de proton intermoléculaire. On a donc cherché une relation entre l'augmentation du nombre et de l'efficacité de tels transferts de protons et les valeurs de $\Delta G^{\circ}_{acid,app}$, qui sont dépendantes des séquences d'ADN et notamment du nombre de résidus phospho-thymidine (nucléotide le plus acide) présents sur les plus longs brins d'ADN (12-mer).

IV. 3. a. Cas des plus longs brins d'ADN (12-mer)

Conformément à notre modèle, l'augmentation du nombre de charge due à la présence de *mNBA* se produit durant les étapes finales de la désolvation des agrégats chargés. Le modèle peut expliquer la différence de valeurs de z_{avg} obtenues par l'ajout de

⁵¹ E. P. Hunter, S. G. Lias ; Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules: An Update. *J. Phys. Chem. Ref. Data.*, **1998**, 27(3), 413-656.

CHAPITRE 3 :

mNBA pour les différentes séquences d'ADN de la même longueur mais contenant un nombre différent de résidus phospho-thymidine (*i.e.*, nucléotide le plus acide). Indépendamment de la présence de *mNBA*, il a été observé que les valeurs de z_{avg} pour des séquences d'ADN contenant trois paires de résidus thymine adjacents (*i.e.*, trois motifs -TT-) sont plus importantes que celles obtenues pour des séquences ne contenant qu'un motif -TT-. Par exemple, les ions 5'-TTGGTTAATTCC-3' et 5'-GGTTAATTCCTT-3' ont montré respectivement des valeurs de z_{avg} de : (i) 3,119 et 3,133 sans introduction de *mNBA* et, (ii) 4,71 et 4,73 avec 1% de *mNBA* (**Tableau 3-4**) ; tandis que les ions 5'-GGAATTAACCAA-3' et 5'-CCAATTAAGGAA-3' n'ont seulement atteint respectivement que des valeurs de z_{avg} de : (i) 3,035 et 3,052 sans *mNBA* et, (ii) 4,53 et 4,49 avec 1% de *mNBA* (**Tableau 3-4**). De plus, les valeurs de $CEC_{1\%}$ des oligonucléotides déprotonés ont suivi la même tendance *i.e.*, 1,59 et 1,60 pour les mêmes séquences riches en résidus phospho-thymidine comparées à 1,49 et 1,43 pour les séquences les plus pauvres en phospho-thymidines (**Tableau 3-4**). En effet, la présence de résidus thymine supplémentaires augmente le nombre de sites acides et, par conséquent, facilite la production de plus hauts états de charge d'oligonucléotides multi-déprotonés. D'où, la première libération de NH_4^+ se produit plus tôt pendant la désolvatation (en opposition à un transfert de proton vers le simple brin d'ADN), tandis que l'apparition des charges suivantes reste guidée par la compétition entre la libération de NH_3/NH_4^+ à partir des autres nucléotides (*e.g.* G, C et A) *i.e.*, par les valeurs de $\Delta G^{\circ}_{acid,app}$ des oligonucléotides déprotonés. Par exemple, l'ion 5'-AAAAACCAAAA-3' a montré des valeurs de z_{avg} de : (i) 2,883 sans ajout de *mNBA* et, (ii) 4,22 avec 1% de *mNBA* ; donc, une valeur de $CEC_{1\%}$ de 1,34 qui est la plus petite valeur du groupe des 12-mers (**Tableau 3-4**).

Le nombre de résidus thymine n'est pas la seule composante influençant l'augmentation de charge induite par *mNBA*, leurs emplacements le long de la séquence d'ADN jouent aussi un rôle. En effet, les valeurs de $CEC_{1\%}$ obtenues pour les séquences d'ADN contenant trois résidus thymine consécutifs, *e.g.* 1,38 et 1,41, respectivement pour les ions 5'-GGGCCACAATTT-3' et 5'-TTTCCACAAGGG-3' (**Tableau 3-4**), sont inférieures à celles obtenues pour des séquences d'ADN ayant trois résidus thymine non-consécutifs, *e.g.* 1,52 et 1,54, respectivement pour les ions 5'- AAATTGTGGCCC-

3' et 5'-CCCTTGTGGAAA-3' (**Tableau 3-4**). Comme décrit précédemment, les transferts de proton intermoléculaires entre NH_4^+ et les simples brins d'ADN sont guidés par les propriétés thermochimiques, *e.g.* $\Delta G_{\text{ac,app}}^\circ$ incluant tous les effets entropiques (dont les interactions électrostatiques font partie). Ils sont donc aussi orientés par la proximité d'autres sites chargés, positivement ou négativement, qui vont localement modifier l'énergie d'activation nécessaire à un échange de proton potentiel. Pour les séquences d'ADN contenant trois résidus consécutifs de thymine, *i.e.* 5'-GGGCCACAATTT-3' et 5'-TTTCCACAAGGG-3', lorsqu'un groupement phosphate directement lié à une thymidine (site le plus acide de la séquence) porte déjà une charge négative, l'énergie requise pour stabiliser une autre charge négative sur un groupement phosphate adjacent (directement lié à une seconde thymidine) est augmentée, et la formation de cet anion voisin est donc défavorisée. Par conséquent, malgré la relativement grande acidité des résidus phospho-thymidine, leur proximité spatiale défavorise le départ consécutif de cations NH_4^+ et, au contraire, contrebalance en rendant le départ d'une molécule de NH_3 neutre plus compétitif. Notre modèle est donc en accord avec les mécanismes d'ESI précédemment proposés décrivant la désorption/ionisation d'oligonucléotides déprotonés vers la phase gazeuse^{46,50}.

IV. 3. b. Cas des brins d'ADN plus courts (6-mer)

Les exemples du groupe des 12-mers, ci-dessus, montrent que les effets entropiques induits par des charges locales peuvent exercer une influence sur l'orientation majoritaire donnée par les considérations d'acidité en phase gazeuse sur le phénomène de « superchargement ». La situation devient bien moins claire lorsque l'on considère le « superchargement » de la série des 6-mers où la plus grande différence d'augmentation est obtenue pour les ions 5'-TTATTT-3' (résidus de thymines dispersés, valeur de $\text{CEC}_{1\%}$ la plus basse) et 5'-GTTTTT-3' (résidus de thymines consécutifs, valeur de $\text{CEC}_{1\%}$ la plus haute) bien qu'ils aient un nombre de résidus de thymines identique. Donc, dans le cas de brins plus courts riches en résidus thymine, une forte densité de thymines mène à de plus hautes valeurs de $\text{CEC}_{1\%}$. L'effet entropique qui semble prendre le dessus dans ce cas est que la protonation des nucléobases guanines (valeur de GB la plus haute des nucléobases) se produisant dans les agrégats *i.e.*, la

CHAPITRE 3 :

présence d'une charge positive locale, facilite apparemment la formation de charges négatives sur le phosphate le plus proche. Pendant la suite des étapes de désolvatation, ce proton peut être perdu avec le départ des molécules de solvant, ne laissant ainsi que des charges négatives sur le simple brin d'ADN qui est dorénavant un anion hautement chargé. Le 6-mer (ci-dessus) contenant un résidu adénine (valeur de GB plus basse que les résidus guanine) ne peut apparemment pas montrer le même niveau d'influence entropique. Donc cet exemple montre que l'effet nocif d'un site acide adjacent peut être submergé par d'autres effets entropiques favorisant la déprotonation.

Le même raisonnement peut expliquer pourquoi 5'-GTTTTT-3' a une valeur de $CEC_{1\%}$ supérieure à celle de 5'-TTTTTT-3' (respectivement 1,36 et 1,17 ; **Tableau 3-4**), même si le premier a un résidu thymine en moins. Comparés aux deux brins précédents, 5'-TTCTTT-3' et 5'-TTATTT-3' montrent des valeurs de $CEC_{1\%}$ légèrement inférieures (respectivement 1,19 et 1,16 ; **Tableau 3-4**), ce qui est en accord avec notre modèle. Seul 5'-GGGTTT-3' (avec la séquence la plus pauvre en résidus de thymine) donne une valeur de $CEC_{1\%}$ (1,23 ; **Tableau 3-4**) qui apparaît inhabituellement haute, pointant à nouveau le rôle spécial que la guanine semble jouer dans les processus de « superchargement ».

IV. 4. Cas particulier des complexes non-covalents ADN/peptide

Les ions NCX ont systématiquement suivi la même tendance de déprotonation que les oligonucléotides. En effet, les valeurs de $CEC_{1\%}$ obtenues pour ces ions par ESI en mode positif sont toutes négatives et celles obtenues en mode négatif sont toutes positives. Cette tendance s'explique : (i) soit par l'excès de sites déprotonables par rapport au nombre de sites protonables présents sur chacun des partenaires composant les NCX (respectivement, 11 sites très acides sur les simples brins d'ADN (12-mers) et 7 sites basiques sur le peptide **11-24**), et ce, indépendamment du nombre de NCI stabilisant le NCX ou, (ii) soit par une action accrue du *mNBA* sur les oligonucléotides comparée à son action sur les peptides.

Notre modèle propose que la présence de résidus thymine supplémentaires augmente le nombre de sites de très forte acidité et, par conséquent, facilite la production de plus

hauts états de charge d'oligonucléotides déprotonés. Dans le cas des ions NCX composés de séquences d'ADN de la même longueur contenant différents nombres de phospho-thymidines formés par ESI en mode négatif, bien que les NCI impliquent généralement ces sites de très forte acidité des oligonucléotides, qui ont donc une grande probabilité d'être occupés, l'influence de la valeur de $\Delta G^{\circ}_{\text{acid,app}}$ (via le nombre de résidus thymine restants) semble être plus importante que l'impact des sites basiques du peptide (potentiellement non-appariés). Indépendamment de la présence de *mNBA*, il a été observé que les valeurs de z_{avg} pour des ions NCX composés de séquences d'ADN contenant un nombre croissant de thymines sont elles aussi croissantes. Par exemple, les ions NCX composés des séquences d'ADN 5'-AAAAACCAAAA-3', 5'-GGAATTAACCAA-3', 5'-TTGGTTAATTCC-3' et 5'-TTTTTGGTTTGG-3' ont montré respectivement des valeurs de z_{avg} de : (i) 3,21, 3,37, 3,41 et 3,53 sans introduction de *mNBA* et, (ii) 4,16, 4,36, 4,39 et 4,89 en présence de 1% de *mNBA* (**Tableau 3-5**). De plus, les valeurs de $\text{CEC}_{1\%}$ des oligonucléotides déprotonés ont suivi la même tendance *i.e.*, 0,95, 0,98, 0,98 et 1,36 pour les mêmes séquences d'ADN (**Tableau 3-5**).

Notre modèle propose aussi que la proximité de groupements phospho-thymidines, réciproquement, limite la production de plus hauts états de charge. En effet, en absence de *mNBA*, les ions 5'-TTTTTGGTTTGG-3' *i.e.*, la séquence d'ADN la plus riche et la plus dense en thymines, présentent des valeurs de z_{avg} inférieures à celles obtenues pour les ions 5'-TTGGTTAATTCC-3' *i.e.*, une séquence d'ADN moins riche en thymidines mais qui sont plus dispersées au sein du brin d'ADN, respectivement (i) 3,24 et 3,30 pour des solutions ne contenant que des oligonucléotides et, (ii) 3,26 et 3,27 pour des solutions contenant aussi le peptide (**Tableau 3-5**). Cependant, indépendamment de la présence de *mNBA*, les ions NCX composés de la séquence d'ADN 5'-TTTTTGGTTTGG-3' présentent des valeurs de z_{avg} supérieures à celles obtenues pour les ions NCX composés de la séquence 5'-TTGGTTAATTCC-3', respectivement (i) 3,53 et 3,41 sans introduction de *mNBA* et, (ii) 4,89 et 4,39 en présence de 1% de *mNBA*. L'effet entropique qui semble prendre le dessus dans ce cas est que la modulation d'une charge négative induite par la présence d'une NCI (préexistante en solution) facilite apparemment la formation de charges négatives sur le phosphate le plus proche en

CHAPITRE 3 :

modifiant localement l'énergie d'activation nécessaire à un échange de proton potentiel. Ainsi, lorsqu'un groupement phosphate directement lié à une thymidine (site le plus acide de la séquence) porte une charge négative modulée par la présence d'une charge positive sur le partenaire dans la NCI, l'énergie requise pour stabiliser une autre charge négative sur un groupement phosphate adjacent directement lié à une seconde thymidine est diminuée, et la formation de cet anion voisin est donc favorisée. Par conséquent, malgré la relativement haute densité des phospho-thymidines, leur grande proximité ne défavorise pas le départ consécutif de cations NH_4^+ et, au contraire, contrebalance en rendant le départ d'une molécule de NH_3 neutre plus compétitif.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons examiné les variations d'état de charge de polymères biologiques et de certains de leurs complexes induites par la présence de *mNBA* pendant les processus de désorption/ionisation par électro-nébulisation en mode positif et en mode négatif. Après avoir vérifié la tendance décrite dans la littérature, selon laquelle le *mNBA* améliore l'intensité totale du signal et augmente les valeurs de z_{avg} de protéines (et de peptides) multi-protonées formées par ESI en mode positif, nous avons observé une tendance antagoniste pour des ions oligonucléiques. Nous avons donc décidé d'étudier de plus près l'action de *mNBA* en mode d'ionisation négatif. Outre l'observation de la tendance antagoniste à celle obtenue pour les mêmes solutions de peptides en mode positif, nous avons montré que l'addition de *mNBA* à des solutions d'oligonucléotides améliore l'intensité totale de leurs signaux et augmente leurs valeurs de z_{avg} (par l'augmentation de leurs valeurs de z_{high}) obtenues par ESI en mode négatif.⁴⁰

Pour les NCX « peptide/oligonucléotide », indépendamment de la polarité d'ionisation, nous avons observé la même tendance de chargement (vis-à-vis de *mNBA*) que celle observée pour les simples brins d'ADN *i.e.*, des déprotonations accrues des ions formés par ESI. De plus, les états de charge supplémentaires obtenus par l'élargissement de leur distribution (par ionisation en mode négatif) peuvent permettre l'obtention d'informations complémentaires en comparant les voies de fragmentations empruntées par les espèces à différents états de charge. Enfin les NCX sont les seuls ions dont l'abondance a invariablement été augmentée par l'addition *mNBA*, aussi bien en mode d'ionisation positif que négatif. Ces ions « survivants » supplémentaires, attribués

à des appariements favorisés par l'augmentation de l'état de charge moyen de l'un des partenaires (selon le mode d'ionisation), ont montré une répartition de charges similaires à leurs analogues formés en absence de *mNBA* faisant de ce dernier un outil analytique d'intérêt pour l'étude de la stabilité des NCX « peptide/oligonucléotide » dont les faibles abondances limitent, dans notre cas, l'analyse par spectrométrie de masse en tandem.

L'introduction des grandeurs $SER_{1\%}$ et $CEC_{1\%}$ nous a certes, facilité la quantification des modifications spectrales dues à l'addition de 1% de *mNBA*, mais nous a surtout permis d'examiner les aspects sous-jacents des bases des mécanismes ESI, e.g. le transfert de proton lors des processus de désolvatation au sein des agrégats chargés précurseurs en phase gazeuse. Nous avons proposé un modèle soulignant le rôle des valeurs de $\Delta G^{\circ}_{acid,app}$, et donc des voies de désolvatation compétitives des agrégats chargés, dans le phénomène de « superchargement »⁴⁰. Parmi les caractéristiques examinées : (i) le nombre de thymine, (ii) la dispersion des résidus de thymine, et (iii) la présence (éphémère ou permanente) de charges positives proches spatialement ; chacune de ces composantes semble exercer des effets entropiques variables sur la tendance générale de production d'un site chargé. En outre, notre modèle souligne l'implication des cations NH_4^+ dans le mécanisme de « superchargement » dont le rôle est en accord avec les mécanismes d'ESI (précédemment établis) décrivant la désorption/ionisation de simples brins d'ADN vers la phase gazeuse. Alors qu'aucun consensus réel sur le mécanisme de « superchargement » n'a encore émergé, nous proposons cette contribution comme une brique supplémentaire pour la construction des fondations d'un mécanisme de « superchargement » commun aux deux modes d'ionisation par ESI.

CHAPITRE 3 :

CHAPITRE 4 :

Conception d'une source sans hautes tensions ; le V-EASI

Le développement de sources de désorption/ionisation à pression atmosphérique (*API* pour *Atmospheric Pressure Ionization*), telle que l'ionisation par électro-nébulisation (*ESI* pour *ElectroSpray Ionisation*)¹, a grandement simplifié les analyses par MS. Par la suite, la nécessité de préparation de l'échantillon a été éliminée (ou grandement minimisée) grâce au développement de sources API permettant l'étude d'analytes dans leur environnement (ou matrice) naturel(le) qu'il (ou elle) soit liquide ou solide. Ce champ, connu sous le nom de « source d'ionisation ambiante » (en anglais, *ambient mass spectrometry*)^{2,3,4,5}, a été introduit avec (i) l'ionisation par désorption à électro-nébulisation (*DESI* pour *Desorption ElectroSpray Ionization*)⁶ permettant la désorption/ionisation des analytes et (ii) l'analyse directe en temps réel (*DART* pour *Direct Analysis in Real Time*)⁷ permettant l'ionisation en phase gazeuse des analytes.

Il y a quelques années, *Eberlin and co-workers*⁸ ont introduit une source d'ionisation ambiante appelée ionisation ambiante par spray sonore (*EASI* pour *Easy Ambient Sonic-spray Ionization*). Descendante de l'ionisation par spray sonore (*SSI* pour *Sonic-Spray Ionization*)⁹, la source *EASI* n'est assistée par aucune tension, radiation ou chauffage et n'opère que par la seule assistance du gaz de nébulisation à haute vitesse. Comme pour la désorption/ionisation par

¹ J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S.F. Wong, C. M. Whitehouse ; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, **1989**, 246, 64-71.

² R. G. Cooks, Z. Ouyang, Z. Takats, J. M. Wiseman ; Ambient Mass Spectrometry, *Science*, **2006**, 311, 1566-1570.

³ G. A. Harris, L. Nyadong, F. M. Fernandez ; Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry, *Analyst*, **2008**, 133, 1297-1301.

⁴ D. R. Ifa, C. P. Wu, Z. Ouyang, R. G. Cooks ; Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview, *Analyst*, **2010**, 135, 669-681.

⁵ R. M. Alberici, R. C. Simas, G. S. Sanvido, W. Romao, P. M. Lalli, M. Benassi, I. B. S. Cunha, M. N. Eberlin ; Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world", *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398, 265-294.

⁶ Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks ; Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization, *Science*, **2004**, 306, 471-473.

⁷ R. B. Cody, J. A. Laramée, H. D. Durst ; Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 2297-2302.

⁸ R. Haddad, H. M. S. Milagre, R. R. Catharino, M. N. Eberlin ; Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry Combined with Thin-Layer Chromatography, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 2297-2302.

⁹ A. Hirabayashi, M. Sakairi, H. Koizumi ; Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 4557-4559.

CHAPITRE 4 :

spray thermique (*TSI* pour *ThermoSpray Ionization*)¹⁰, le spray dense formé par EASI contient simultanément des gouttelettes chargées positivement et d'autres chargées négativement dont la somme maintient l'équilibre des charges^{9,11}. Ce spray bipolaire de gouttelettes favorise la désorption et l'ionisation de molécules, que ce soit $[M + H]^+$ et/ou $[M - H]^-$, voire même certains adduits, *e.g.* avec des métaux alcalins (ou alcalino-terreux) et/ou des halogénures. Comme avec une source SSI, la formation d'ions nus en phase gazeuse ne nécessite que peu d'énergie *i.e.*, l'EASI est une méthode d'ionisation douce n'induisant que peu, ou pas, de fragmentation des ions transférés de la solution ionique à la phase gazeuse¹². Bien que les intensités absolues des signaux soient légèrement inférieures à celles obtenues en ESI (d'un ordre de grandeur), le bruit chimique dû à la désorption d'agrégats non-spécifiques d'impuretés et/ou de solvant est grandement réduit, améliorant ainsi les performances analytiques de cette source^{11,13}. En effet, la faible quantité de charges présente à la surface des gouttelettes permet une désorption/ionisation préférentielle des analytes améliorant la sensibilité en augmentant le rapport signal sur bruit (*S/N* pour *Signal-to-Noise ratio*)⁹. Cette amélioration du rapport S/N a été montrée pour des drogues¹⁴, des peptides¹⁵ ou des médicaments¹¹. Enfin, l'EASI est libre de toutes interférences électrochimiques¹⁶, pouvant entraîner des mécanismes d'ionisation compétitifs et/ou des réactions d'oxydation et de réduction non désirées.

Plus récemment, *Eberlin and co-workers*¹⁷ ont proposé une source d'ionisation améliorée par un système d'aspiration libre, c'est à dire ne nécessitant plus d'assistance pour l'injection de la solution en flux continu, *e.g.* ni pousse seringue ni système chromatographique, appelée

¹⁰ a) C. R. Blakley, J. J. Carmody, M. L. Vestal ; A New Soft Ionization Technique for Mass Spectrometry of Complex Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 5931-5933. b) C. R. Blakley, J. J. Carmody, M. L. Vestal ; Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer for Analysis of Nonvolatile Samples. *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 1636-1641. c) C. R. Blakley, J. J. Carmody, M. L. Vestal ; Combined Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer for Involatile Biological Samples. *Clin. Chem.*, **1980**, 26, 1467-1473.

¹¹ F. Zivolic, F. Zancanaro, D. Favretto, S. D. Ferrara, R. Seraglia, P. Traldi ; Pneumatically assisted desorption/ionization: Some thoughts on the possible ionization mechanisms, *J. Mass Spectrom.*, **2010**, 45, 411-420.

¹² Z. Takats, S. C. Nanita, R. G. Cooks, G. Schlosser, K. Vekey ; Amino acid clusters formed by sonic spray ionization, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 1514-1523.

¹³ A. Hirabayashi, M. Sakairi, H. Koizumi ; Sonic Spray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2878-2882.

¹⁴ R. Haddad, R. Sparrapan, M. N. Eberlin ; Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, 20, 2901-2905.

¹⁵ M. B. Sorensen, P. Aaslo, H. Egsgaard, T. Lund ; Determination of D/L-amino acids by zero needle voltage electrospray ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2008**, 22, 455-461.

¹⁶ S. P. Pasilis, V. Kertesz, G. J. Van Berkel ; Unexpected Analyte Oxidation during Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 1208-1214.

¹⁷ V. G. Santos, T. Regiani, F. F. G. Dias, W. Romao, J. L. Paz Jara, C. F. Klitzke, F. Coelho, M. N. Eberlin ; Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization. *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 1375-1380.

ionisation ambiante par spray sonore à pompage Venturi (V-EASI pour *Venturi Easy Ambient Sonic-spray Ionization*) (**Figure 4-1**).

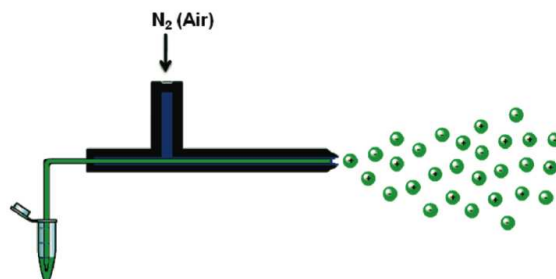


Figure 4-1 Schéma d'une source V-EASI¹⁷.

La source V-EASI a trouvé application dans des domaines aussi variés que la chimie organique (suivi de réactions chimiques en temps réel¹⁷) et/ou inorganique (caractérisation de complexes de coordination labiles et de composés sensibles à l'oxydoréduction¹⁸), la chimie du vivant (imagerie de peptides et de lipides dans un cerveau en temps réel¹⁹), la chimie environnementale (caractérisation de bois naturel²⁰) ou la pétrochimie (caractérisation de composés issus du raffinage du pétrole²¹).

Cette source permet aussi bien de nébuliser un échantillon en solution (mode direct) que de pulvériser du solvant sur un échantillon solide ou dans sa matrice naturelle (mode ambient)¹⁷. La source V-EASI suit donc les mêmes mécanismes de désorption/ionisation et de désolvatation que la source SSI ou que la source EASI (selon la nature de l'échantillon). Elle aurait donc pu s'appeler V-SSI mais comme le rappelle *M. N. Eberlin* lors de ces présentations, l'acronyme V-EASI (comme le précédent *i.e.*, EASI) a été choisi pour rappeler à quel point il est vraiment facile (*very easy* en anglais) de mettre en œuvre une source d'ionisation permettant de transférer

¹⁸ M. M. Antonakis, A. Tsigotaki, K. Kanaki, C. J. Milios, S. A. Pergantis ; Bipolar Mass Spectrometry of Labile Coordination Complexes, Redox Active Inorganic Compounds, and Proteins Using a Glass Nebulizer for Sonic-Spray Ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2013**, *24*, 1250-1259.

¹⁹ K.-C. Schafer, J. Balog, T. Szanislo, D. Szalay, G. Mezey, J. Denes, L. Bognar, M. Oertel, Z. Takats ; Real Time Analysis of Brain Tissue by Direct Combination of Ultrasonic Surgical Aspiration and Sonic Spray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 7729-7735.

²⁰ E. C. Cabral, R. C. Simas, V. G. Santos, C. L. Queiroga, V. S. da Cunha, G. F. de Sa, R. J. Daroda, M. N. Eberlin ; Wood typification by Venturi easy ambient sonic spray ionization mass spectrometry: the case of the endangered Mahogany tree, *J. Mass Spectrom.*, **2012**, (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jms.2016

²¹ R. Haddad, T. Regiani, C. F. Klitzke, G. B. Sanvido, Y. E. Corilo, D. V. Augusti, V. M. D. Pasa, R. C. C. Pereira, W. Romao, B. G. Vaz, R. Augusti, M. N. Eberlin ; Gasoline, Kerosene, and Diesel Fingerprinting via Polar Markers, *Energy Fuels*, **2012**, *26*, 3542-3547.

CHAPITRE 4 :

des analytes (sans excès d'énergie interne) sous forme d'ions « nus » d'une solution ionique vers la phase gazeuse *via* la formation d'agrégats chargés.

Toutes les composantes électriques d'une source API usuelle ayant été retirées, il paraît effectivement facile d'assembler intelligemment les composantes restantes pour construire soi-même une source V-EASI. C'est donc ce que nous nous sommes proposé de réaliser dans le but d'étudier les NCI stabilisant les NCX biologiques au moyen de cette source d'ionisation décrite comme étant plus douce que l'ESI.

I. Description de la source V-EASI

I. 1. Description de l'effet Venturi

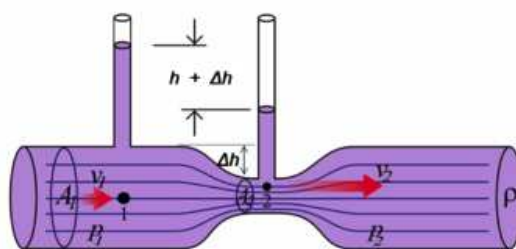


Figure 4-2 Schéma de l'effet Venturi. La pression au point 1 est plus grande qu'au point 2 car la vitesse du fluide au point 2 est plus grande qu'au point 1.

L'effet Venturi (**Figure 4-2**), découvert par le physicien italien *G. B. Venturi*, est un phénomène de la dynamique des fluides où il y a formation d'une dépression dans une zone où un fluide, composé de particules liquides ou gazeuses, est accéléré par un rétrécissement de sa zone de circulation²². Le théorème de Bernoulli permet de comprendre ce phénomène : si le débit de fluide est constant et que le diamètre diminue, la vitesse du fluide augmente nécessairement ; du fait de la conservation de l'énergie, l'augmentation d'énergie cinétique se traduit par une diminution d'énergie élastique *i.e.*, une dépression dans cette zone²³. Cependant, l'effet Venturi ne concerne que les vitesses d'écoulement subsoniques ($< \text{Mach } 1$)²⁴.

²² R. D. Zucker, O. Biblarz ; Fundamentals of gas dynamics (2nd Edition), *John Wiley & Sons, Inc.*, **2002**, 130-141

²³ R. D. Zucker, O. Biblarz ; Fundamentals of gas dynamics (2nd Edition), *John Wiley & Sons, Inc.*, **2002**, 51-66

²⁴ R. D. Zucker, O. Biblarz ; Fundamentals of gas dynamics (2nd Edition), *John Wiley & Sons, Inc.*, **2002**, 221-226

I. 2. Description de la source V-EASI dans la littérature

Lors de son introduction¹⁷, la description de la source V-EASI n'était qu'une chaîne de 5 publications, renvoyant dans un premier temps à une description simpliste de la source EASI⁸ et renvoyant finalement une description très détaillée de la source SSI¹² (**Figure 4-3**).

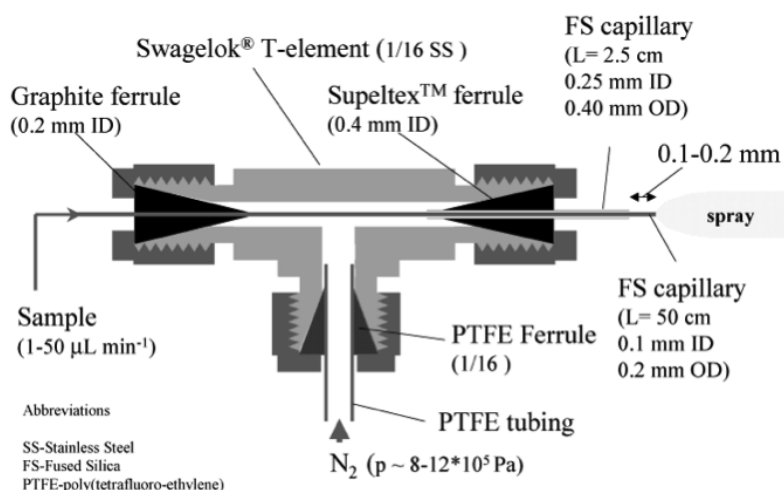


Figure 4-3 Schéma de la tranche longitudinale d'une source SSI. L'échantillon liquide est nébulisé par le débit gazeux coaxial. La surface transversale de la zone de circulation gazeuse est limitée à $0,017 \text{ mm}^2$.¹²

La **Figure 4-3** montre la tranche longitudinale d'une source SSI. Nous pouvons remarquer que la source SSI comporte déjà une restriction de la zone de circulation gazeuse induite par la faible surface transversale restante entre les deux capillaires coaxiaux. En effet, cette restriction permet l'accélération du flux gazeux assurant la formation du spray sonique (\approx Mach 1) bipolaire sans excès de charge. La source SSI utilise donc déjà l'accélération du flux gazeux induit par l'effet Venturi sans en porter le nom. Nous pouvons aussi remarquer que, comme dans toutes les sources API de désorption/ionisation par formation de spray, l'extrémité du capillaire en verre apportant l'échantillon liquide en flux continu est situé à l'extérieur de la zone de restriction ce qui favorise la formation du spray et limite les contaminations par dépôt sur la face interne du capillaire de plus grand diamètre.

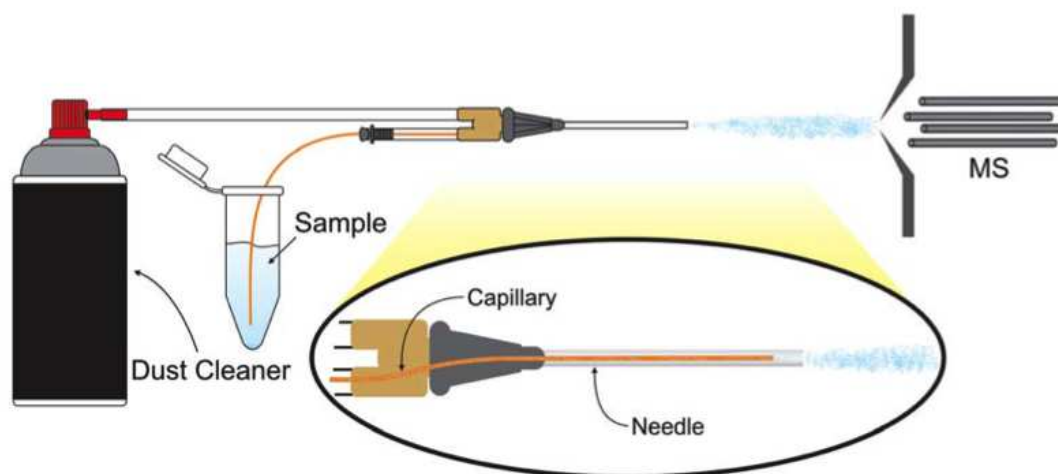


Figure 4-4 Schéma d'une source V-EASI Spartiate. L'extrémité du capillaire en verre apportant la solution est située à l'intérieur de la restriction de la zone de circulation du gaz (ou zone de dépression).²⁵

La première description réelle du pompage Venturi (**Figure 4-4**) a été publiée un an et demi (et 5 publications) après l'introduction de la source V-EASI avec la proposition de la source V-EASI Spartiate (*SV-EASI* pour *Spartan V-EASI*)²⁵. Dans cette dernière évolution, *Eberlin and co-workers* ont amélioré la transportabilité de la source et ont introduit la possibilité d'injecter la solution par impulsion plutôt qu'en flux continu. Dans cette publication, ils ont aussi révélé le « secret » du pompage Venturi ; l'extrémité du capillaire en verre apportant l'échantillon liquide est située à l'intérieur de la zone de restriction *i.e.*, dans la zone où une dépression est formée). Le pompage Venturi est donc régi par la différence de pression entre la zone de restriction (à $P < P_{atm}$) et l'échantillon (à P_{atm}). Cependant, afin de limiter les contaminations par dépôt sur la face interne de la zone de restriction, le capillaire n'est rentré que de quelques millimètres.

I. 3. Conception d'une source V-EASI

Afin de concevoir une source V-EASI au laboratoire, nous devons fixer les objectifs à atteindre pour en déduire les contraintes expérimentales qui se posent et, par conséquent, trouver les solutions appropriées. L'objectif principal est qu'un gaz pressurisé assure à la fois le pompage de la solution et la formation du spray de gouttelettes permettant aux

²⁵ N. V. Schwab, A. M. Porcari, M. B. Coelho, E. M. Schmidt, J. L. Jara, J. V. Visentainer, M. N. Eberlin ; Easy dual-mode ambient mass spectrometry with Venturi self-pumping, canned air, disposable parts and voltage-free sonic-spray ionization, *Analyst*, **2012**, *137*, 2537-2540.

analytes chargés d'atteindre l'analyseur. Un grand nombre de contraintes résulte de cet objectif. Cependant celles-ci étant souvent liées, les solutions le sont aussi.

Le pompage de la solution implique que la différence de pression, entre l'entrée et la sortie du capillaire amenant la solution, soit supérieure à la force nécessaire au transfert de masse *i.e.*, au déplacement de la solution contenue dans le capillaire. Pour faciliter ce pompage, il faut donc (i) placer la sortie du capillaire d'injection dans la zone de restriction du flux gazeux, (ii) augmenter la dépression de la zone de restriction en réduisant la surface transversale restante entre les deux capillaires coaxiaux afin d'accélérer le flux gazeux sans travailler à des débits gazeux trop importants et, (iii) favoriser le transfert de masse, *e.g.* en limitant la quantité de solution à déplacer et/ou en limitant les pertes de charges du système. La formation d'un spray sans assistance électrique implique que le gaz porteur entoure le capillaire injectant la solution et que le rapport entre les débits gazeux et liquide soit très important. Pour faciliter la nébulisation, il faut donc (i) accélérer le flux gazeux en réduisant la surface transversale restante entre les deux capillaires coaxiaux et/ou (ii) limiter le débit de la solution injectée. Le transfert d'analytes solvatés chargés de la source à l'analyseur implique (i) de pouvoir adapter la géométrie de la source afin de favoriser l'évaporation des microgouttelettes et le transfert des agrégats chargés vers l'analyseur par le capillaire de transfert (*i.e.*, l'orifice d'entrée de l'instrument) et (ii) que la source soit reconnue par l'instrument afin d'éviter tout message d'erreur du logiciel pilotant ce dernier et ainsi permettre le transfert des ions (libre de tous solvants) jusqu'à l'analyseur.

Comme la source SSI (décrite dans la **Figure 4-3**), la source V-EASI développée au laboratoire est basée sur un simple T permettant l'introduction du capillaire d'injection par les entrée/sortie opposées du T et l'introduction du flux gazeux par l'entrée orthogonale. Afin de permettre une meilleure herméticité du système, nous avons décidé de remplacer le capillaire en verre portant le flux gazeux par un tube métallique inoxydable maintenant aussi l'équilibre des charges positives et négatives. La surface transversale de la zone de restriction a été réduite en diminuant le diamètre interne du tube métallique portant le flux gazeux (initialement de 250 μm et réduit à 200 μm) mais surtout en ajustant le diamètre externe du capillaire d'injection (à 190 μm) afin

CHAPITRE 4 :

d'accentuer l'effet Venturi dans cette zone et de favoriser la formation du spray. Comme décrit par *Eberlin and co-workers*, la sortie du capillaire d'injection a été placée à 2-3 mm avant la sortie du tube métallique *i.e.*, dans la zone de dépression, afin de permettre le pompage de la solution sans contamination de la face interne du tube métallique. De plus, le diamètre interne du capillaire d'injection, initialement de 100 μm , a été limité à 50 μm afin de diminuer son volume interne et de faciliter la mise en inertie de la solution contenue. Notons que cette réduction du diamètre interne, sans modification du diamètre externe, du capillaire d'injection permet aussi d'augmenter son épaisseur et améliore grandement la résistance et la maniabilité du dispositif. Enfin, ce dispositif a été installé sur une plate-forme initialement conçue pour une source DESI *i.e.*, reconnue et compatible avec le spectromètre de masse, permettant de manipuler avec précision la position de la source V-EASI par rapport au capillaire de transfert (*i.e.*, l'orifice d'entrée de l'instrument). Cette plate-forme, munie d'une micro-vanne pour contrôler le flux gazeux, permet comme une source SV-EASI de ne pas travailler en flux continu.

Des tests préliminaires ont permis de montrer que, indépendamment de la longueur du capillaire d'injection, le pompage de notre source est maximal lorsque la pression du gaz est comprise entre 8 et 9 bars. Cependant, le débit de la solution pompée dépend de la longueur du capillaire d'injection et de la viscosité de la solution.

II. Etude énergétique des ions produits par la source V-EASI

II. 1. Notion de distribution d'énergie interne

L'énergie interne (E_{int}) déposée sur une population d'ions par spectrométrie de masse n'est pas une valeur discrète. On parle donc de « distribution d'énergie interne » (notée $\rho(E)$). Cette distribution correspond à la probabilité pour une population d'ions d'avoir une énergie donnée E . La population étudiée est généralement normalisée par la population d'ions précurseurs par intégration de la fonction $\rho(E) = f(E_{int})$ (pour des valeurs d' E_{int} allant de 0 à l'infini).

II. 2. Origines de la distribution d'énergie interne des ions en phase gazeuse

Une population d'ions à une température (T) et à pression atmosphérique (P_{atm}) possède une distribution d'énergie interne initiale dite thermique²⁶ correspondant aux vibrations des oscillateurs (ou liaisons) composant l'ion. Cette énergie interne dépend des propriétés physico-chimiques de la population²⁷, notamment de la taille des individus *i.e.*, de leur nombre d'oscillateurs (aussi appelés degrés de liberté)²⁸. En solution, les ions sont, par définition, solvatés par les molécules de solvant ; ils disposent donc de peu d'énergie interne. Durant l'étape d'évaporation des microgouttelettes et de formation des agrégats chargés en phase gazeuse, la population d'ions restant solvatée ; leur distribution d'énergie interne ne varie donc pas. Ce n'est que durant l'étape de desolvation des agrégats chargés *i.e.*, durant le guidage des espèces chargées au sein de l'instrument, que la population d'ions, peu à peu libérée des molécules de solvants par une cascade de collisions avec les molécules de gaz environnantes, acquière principalement leur distribution d'énergie interne définitive. En effet, l'énergie interne de l'ion moins solvaté augmente avec le départ des dernières molécules de solvants.

Une source de désorption/ionisation API est d'autant plus énergétique qu'elle nécessite d'énergie pour désolvater les agrégats chargés en ion « nus » en phase gazeuse. Les origines de cette énergie étant (i) thermique *i.e.*, issue du chauffage du capillaire de transfert, (ii) cinétique *i.e.*, issue de l'accélération des espèces chargées par les tensions appliquées au cône (ou skimmer), et/ou, (iii) collisionnelle *i.e.*, issue des activations/désactivation par collisions avec les molécules de gaz environnantes. Cependant, l'énergie nécessaire à la desolvation des agrégats chargés dépend de la taille et de la charge de ces derniers. En effet, plus l'agrégat est gros, plus il nécessite d'énergie pour « dénuder » totalement l'ion contenu *i.e.*, pour retirer toutes les molécules de solvant de l'agrégat. Ainsi, l'énergie cinétique grandit avec la taille des agrégats et, par conséquent, la distribution d'énergie interne des ions issus de plus gros agrégats est plus dispersée (**Figure 4-5**). Il en résulte une fragmentation préférentielle des ions issus de

²⁶ P. J. Robinson, K. A. Holbrook ; Unimolecular Reactions. Wiley, London. 1972

²⁷ P. J. Derrick, P. M. Lloyd, J. R. Christie ; *Adv. Mass Spectrom.*, **1995**, *13*, 25-52.

²⁸ L. Drahos, K. Vekey ; Determination of the thermal energy and its distribution in peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, *10*, 323-328.

CHAPITRE 4 :

gros agrégats par rapport à ceux issus d'agrégats plus petits (**Figure 4-5**). Une source de désorption/ionisation API est donc d'autant plus énergétique qu'elle engendre de gros agrégats chargés en phase gazeuse.

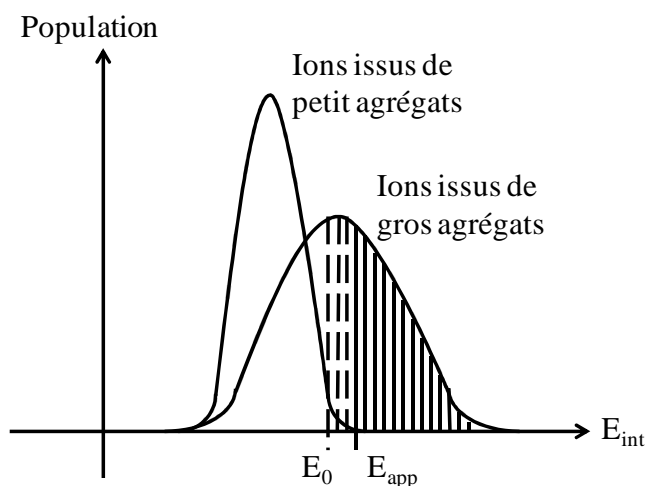


Figure 4-5 Représentation qualitative des distributions d'énergie interne de la population d'ions « nus » en phase gazeuse issue de petits et de gros agrégats chargés. La zone hachurée en pointillés correspond à la portion de la population ayant reçu suffisamment d'énergie pour théoriquement se dissocier. La zone hachurée en traits continus correspond à la portion de la population se dissociant.

Rappelons qu'en spectrométrie de masse, les réactions de dissociations se produisent sous contrôle cinétique et sont modulées par la quantité d'énergie interne reçue par l'ion précurseur. En effet, pour qu'une réaction de dissociation soit possible, cela suppose que l'ion excité doit acquérir suffisamment d'énergie interne afin d'avoir le temps de se décomposer dans la zone considérée (avant thermalisation et détection par l'instrument). De part la diffusion de l'énergie interne sur tous les oscillateurs de l'ion, une énergie supplémentaire est nécessaire à l'énergie critique de dissociation (E_0) pour observer la réaction dans la gamme de temps du spectromètre de masse imposée par les conditions instrumentales choisies. Cette énergie supplémentaire est appelée déplacement cinétique (*KS* pour *Kinetic Shift*)^{29,30}. L'énergie d'apparition (E_{app} ; **Figure 4-5** et **Equation 4-1**) constitue donc le seuil d'énergie réel conduisant à la formation d'ions fragments.

$$\text{(Eq. 4-1)} \quad E_{app} = E_0 + KS$$

²⁹ C. Lifshitz ; Time-resolved appearance energies, breakdown graphs, and mass spectra : the elusive kinetic shift. *Mass Spectrom. Rev.*, 1982, 1, 309-348.

³⁰ R. C. Dunbar ; New approaches to ion thermochemistry via dissociation and association. *Adv. Gas Phase Ion Chem.*, 1996, 2, 87-124.

Cette fragmentation en source dans la zone de desolvation, aussi appelé *in-source CID* (pour *in-source Collisionnaly Induced Dissociation*) permet, entre autres, la comparaison énergétique de différentes sources de désorption/ionisation.

II. 3. Molécules thermomètres : Les sels de benzyl-pyridiniums substitués

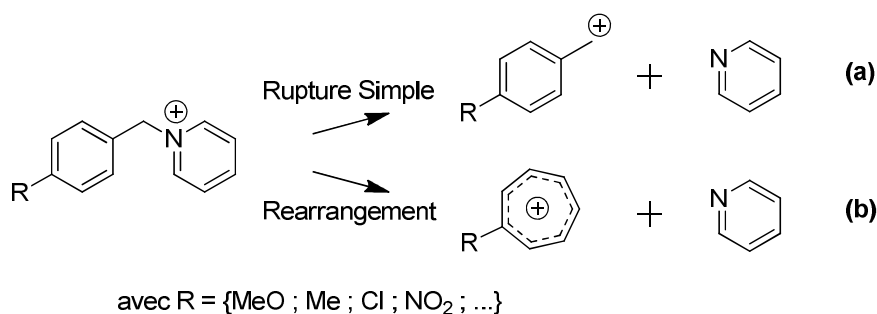


Figure 4-6. Réaction de dissociation d'un benzyl-pyridinium (a) en benzylium ou (b) en tropylium.

La famille des sels de benzyl-pyridinium (*Bz-Pyr*) fait partie du groupe des « molécules thermomètres » permettant l'étalonnage énergétique d'un spectromètre de masse. En effet, toute la famille a une voie de fragmentation majoritaire commune *i.e.*, la rupture de liaison C-N dont l'énergie peut être calculée, et la fragmentation de l'ion précurseur engendre systématiquement un ion fragment détectable issue de la perte d'une molécule de pyridine³¹. Cette perte d'une molécule de pyridine peut être obtenue *via* deux mécanismes distincts *i.e.*, une dissociation par rupture simple (*RS*) ou une dissociation par réarrangement (*RR*) et donne, respectivement, un benzylium substitué ou un ion tropylium substitué de même rapport m/z. Les énergies d'activation de ces deux chemins réactionnels sont différentes et dépendantes de la substitution. Il est donc possible d'estimer la distribution d'énergie interne de la population résultant des processus d'ionisation (ou d'activation) en se basant sur les intensités relatives de l'ion fragment et de l'ion survivant et en considérant les énergies connues de dissociation de la liaison C-N (*via RS* et/ou *via RR*) comme les seuils énergétiques de dissociation des ions précurseurs^{32,33}. Les énergies de dissociation des ions *Bz-Pyr* ont été principalement

³¹ E. L. Zins, C. Pepe, D. Schroder ; Energy-dependent dissociation of benzylpyridinium ions in an ion-trap mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.*, **2010**, 45(11), 1253–1260.

³² C. Collette, L. Drahos, E. De Pauw, K. Vekey ; Comparison of the internal energy distributions of ions produced by different electro- spray sources. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, 1673–1678.

CHAPITRE 4 :

obtenues par calculs théoriques de structures électroniques (plus ou moins précis) et ont servis de références pour estimer l'énergie résultant de différents processus d'ionisation conventionnels tels que le FAB^{34,35}, le MALDI^{36,37}, l'ESI^{38,39,40,41}, le DESI⁴² ou le DART⁴³. Dans une étude récente visant à comparer énergétiquement une source d'ionisation par nébulisation acoustique de surface (SWAN pour *Surface Acoustic Wave Nebulization*) à une source ESI⁴⁴, les auteurs ont calculé « à haut niveau » de chimie théorique (pour *high-level computational calculation*) les énergies critiques de dissociations en ions de type benzylium et tropylium (**Tableau 4-1**).

R	B3LYP/6-31+G(d,p) (eV)		CCSD(T)/6-311++G(3df,2p) (eV)	
	Benzylium	Tropylium	Benzylium	Tropylium
MeO	1.457	1.382	1.870 ^a	1.916
Me	1.808	1.575	2.303	2.139 ^a
Cl	1.947	1.756	2.407	2.301 ^a
NO ₂	2.471	2.101	2.911	2.623 ^a

Tableau 4-1. Energies critique de dissociation calculées pour des benzyl-pyridinium *para*-substitués. (^a Chemin de moindre énergie)⁴⁴

³³ C. Colette, E. De Pauw ; Calibration of the internal energy distribution of ions produced by electrospray. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12(4), 165–170.

³⁴ D. H. Williams, S. Naylor ; The internal energy distribution in fast atom bombardment/liquid secondary ion mass spectra. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1987**, 18, 1408-1409.

³⁵ F. Derwa, E. De Pauw, P. Natalis ; New basis for a method for the estimation of secondary ion internal energy distribution in soft ionization techniques. *Organic Mass Spectrometry*, **1991**, 26, 117-118.

³⁶ J. F. Greisch, V. Gabelica, F. Remacle, E. De Pauw ; Thermometer ions for matrix-enhanced laser desorption/ionization internal energy calibration. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, 17(16), 1847–1854.

³⁷ G. H. Luo, I. Marginean, A. Vertes ; Internal energy of ions generated by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Anal. Chem.*, **2002**, 74(24), 6185–6190.

³⁸ C. Colette, L. Drahos, E. De Pauw, K. Vekey ; Comparison of the internal energy distributions of ions produced by different electro- spray sources. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12(22), 1673–1678.

³⁹ J. Naban-Maillet, D. Lesage, A. Bossee, Y. Gimbert, J. Sztaray, K. Vekey, J.-C. Tabet ; Internal energy distribution in electrospray ionization. *J. Mass Spectrom.*, **2005**, 40(1), 1–8.

⁴⁰ A. Pak, D. Lesage, Y. Gimbert, K. Vekey, J.-C. Tabet ; Internal energy distribution of peptides in electrospray ionization : ESI and collision-induced dissociation spectra calculation. *J. Mass Spectrom.*, **2008**, 43, 447–455.

⁴¹ D. Touboul, M. C. Jecklin, R. Zenobi ; Ion internal energy distributions validate the charge residue model for small molecule ion formation by spray methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2008**, 22, 1062–1068.

⁴² M. Nefliu, J. N. Smith, A. Venter, R. G. Cooks ; Internal energy distributions in desorption electrospray ionization (DESI). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2008**, 19, 420–427.

⁴³ G. A. Harris, D. M. Hostetler, C. Y. Hampton, F. M. Fernandez ; Comparison of the internal energy deposition of direct analysis in real time and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, 21, 855–863.

⁴⁴ Y. Huang, S. H. Yoon, S. R. Heron, C. D. Masselon, J. S. Edgar, F. Turecek, D. R. Goodlett ; Surface Acoustic Wave Nebulization Produces Ions with Lower Internal Energy than Electrospray Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2012**, 23, 1062-1070.

II. 4. Calcul du taux d'ions survivants

Dans la littérature, le taux d'ions survivants (*SY* pour *Survival Yield*) est utilisé pour estimer la distribution d'énergie interne déposée durant la formation de l'ion « nu » en phase gazeuse (**Equation 4-2**). La méthode du taux d'ions survivants mesure la fraction de benzyl-pyridinium ayant une énergie interne en dessous du seuil de dissociation. L'utilisation de plusieurs molécules thermomètres ayant différentes énergies critiques de dissociations permet de remonter à la distribution d'énergie interne de la population d'ions « nus ».

$$\text{(Eq. 4-2)} \quad SY_{th} = \int_0^{E_0} \rho(E) dE$$

Expérimentalement, la valeur de SY est obtenue en mesurant le rapport entre l'abondance du benzyl-pyridinium résiduel et la somme des abondances du benzyl-pyridinium et de ses ions fragments de type benzylium ou tropylium (**Equation 4-3**). Dans des conditions de transfert plus énergétiques, plusieurs ions fragments consécutifs peuvent être observés. Dans ce cas, la valeur de SY est obtenue en mesurant le rapport entre l'abondance du benzyl-pyridinium résiduel et la somme des abondances du benzyl-pyridinium et de tous ses ions fragments de type benzylium et tropylium (**Equation 4-4**).

$$\text{(Eq. 4-3)} \quad SY_{exp}^1 = \frac{I(M^+)}{I(M^+) + I(F^+)} \times 100$$

$$\text{(Eq. 4-4)} \quad SY_{exp}^m = \frac{I(M^+)}{I(M^+) + \sum I(F^+)} \times 100$$

II. 5. Comparaison énergétique des sources ESI et V-EASI

Les valeurs de SY_{exp}^1 de trois sels de Bz-Pyr *para*-substitués *i.e.*, le *para*-nitro-benzyl-pyridinium (*pNO₂-Bz-Pyr* ; **Figure 4-7a** et **4-7b**), le *para*-methyl-benzyl-pyridinium (*pMe-Bz-Pyr* ; **Figure 4-7c** et **4-7d**) et, le *para*-methoxy-benzyl-pyridinium (*pOMe-Bz-Pyr* ; **Figure 4-7e** et **4-7f**), ont été calculées à partir des spectres de masse obtenus par ESI (**Figure 4-7a**, **4-7c** et **4-7e**) ou par V-EASI (**Figure 4-7b**, **4-7d** et **4-7f**) dans les mêmes conditions instrumentales de transfert. A ce niveau l'étude, nous pouvons déjà remarquer que les valeurs de SY_{exp}^1 obtenues par V-EASI sont toutes supérieures à celles obtenues par ESI.

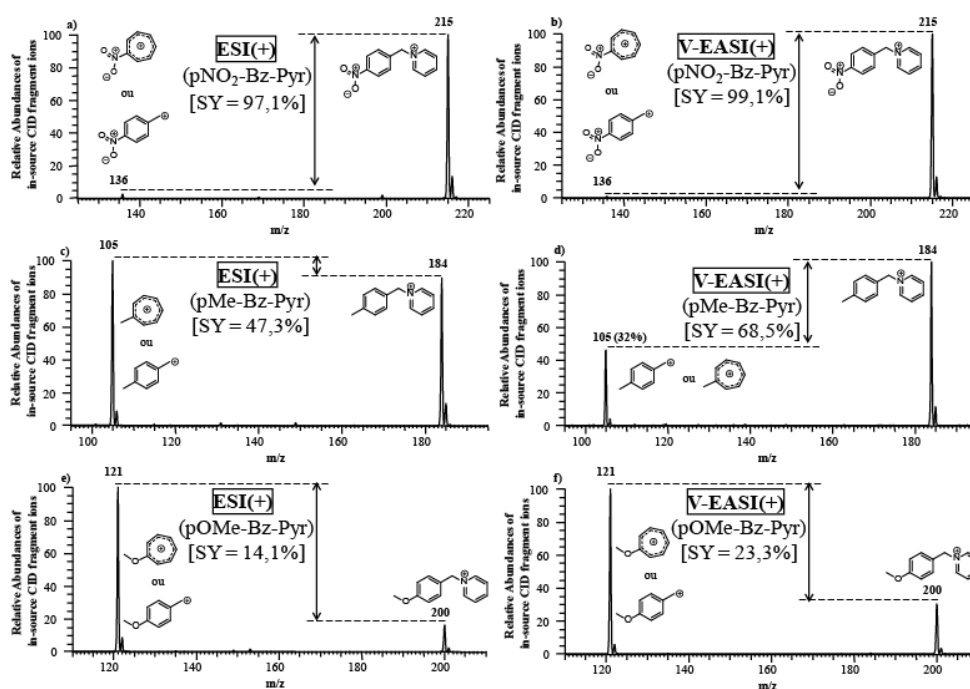


Figure 4-7. Spectres de masse avec dissociation en-source (**a, c et e**) ESI ou (**b, d et f**) V-EASI de trois sels de benzyl-pyridinium *para*-substitués : (**a et b**) le *para*-nitro-benzyl-pyridinium (*pNO₂-Bz-Pyr*), (**c et d**) le *para*-méthyl-benzyl-pyridinium (*pMe-Bz-Pyr*) et, (**e et f**) le *para*-méthoxy-benzyl-pyridinium (*pOMe-Bz-Pyr*). **Conditions expérimentales.** Concentration : 20 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source ESI.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de la source V-EASI.** Mode : V-EASI(+) par pompage. Dimensions du capillaire : longueur 20 cm, d.i. 50 μm , d.e. 190 μm . Pression du gaz : 8 bars. Débit liquide : \sim 200 nL/min. **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 10 V. Tension au « Tube Lens » : 70 V.

MassKinetics[®] est un logiciel (développé par *Vekey and co-workers*⁴⁵) basé sur la théorie RRKM. Il permet, entre autres, de remonter à la distribution d'énergie interne d'une population d'ions, à partir des conditions expérimentales utilisées et d'une description très détaillée du système étudié dont les grandeurs thermodynamiques sont connues. Ainsi, en configurant dans ce logiciel : (i) les masses et les fréquences de vibrations de l'ion précurseur (les $[3 \times n_{\text{atomes}} - 6]$ fréquences obtenues par calculs de chimie théorique pour ces systèmes non-linéaires), (ii) l'énergie critique de dissociation (obtenue par calculs de chimie théorique et dépendante du mécanisme), (iii) le temps de dissociation avant thermalisation dans l'analyseur, nous pouvons faire varier le facteur pré-exponentiel (*A*) de la loi d'Arrhenius décrivant la vitesse des réactions de dissociation (**Equation 4-5** ; où *A* est une constante appelée le facteur pré-exponentiel d'Arrhenius, E_a

⁴⁵ L. Drahos, K. Vékey ; MassKinetics, a theoretical model of mass spectra incorporating physical processes, reaction kinetics and mathematical descriptions. *J Mass Spectrom.*, **2001**, *36*, 237-263.

est l'énergie d'activation qui dans notre cas peut être assimilée à la valeur d' E_0 , R est la constante des gaz parfaits et, T est la température qui dans notre cas correspond à la température de l'ion précurseur) afin de vérifier quel chemin réactionnel est favorisé dans la gamme de temps de l'instrument.

$$\text{(Eq. 4-5)} \quad k = A e^{-E_a/R T}$$

$$\text{(Eq. 4-6)} \quad A = \frac{k_B T}{h} e^{(1+\Delta S^\ddagger)/k_B}$$

Notons que le facteur pré-exponentiel A est caractérisé par l'état de transition (comme le montre le terme entropique de l'**Equation 4-6** ; où k_B est la constante de Boltzman, T est la température effective de la molécule, h est la constante de Planck et ΔS^\ddagger est la variation d'entropie entre l'état initial et l'état de transition) et, par conséquent, du mécanisme de dissociation. Les valeurs de $\log(A.s)$ sont de l'ordre de 14 à 16 et de l'ordre de 10 à 12, respectivement pour des dissociations par RS et pour des dissociations par RR ; ce qui représente le fait qu'à plus hautes énergies internes les dissociations par RS sont systématiquement favorisées. Ainsi, la possibilité de croisement entre les deux chemins réactionnels, et la valeur d' E_{int} à laquelle il a lieu, ne dépendent que de la différence des valeurs d' E_0 de chaque chemin réactionnel *i.e.*, des points d'origines des courbes de constantes de vitesse (**Equation 4-5**). Lorsque la valeur d' E_0 de la dissociation par RS ($E_{0,RS}$) est inférieure à la valeur d' E_{crit}^0 de la dissociation par RR ($E_{0,RR}$), les deux courbes de constantes de vitesse de dissociation ne se croisent jamais. Dans ce cas, les dissociations par RS sont favorisées indépendamment du temps de dissociation et, par conséquent, de l' E_{int} de la population d'ions. La valeur de $E_{0,RS}$ est alors utilisée pour les calculs *via* MassKinetics[®]. Lorsque la valeur d' $E_{0,RS}$ est supérieure à la valeur d' $E_{0,RR}$, les deux courbes de constantes de vitesse se croisent. Dans ce cas, les dissociations par RR sont favorisées aux plus faibles valeurs d' E_{int} supérieures à $E_{0,RR}$ et les dissociations par RS sont favorisées à partir de la valeur d' E_{int} du point de croisement des courbes jusqu'aux plus hautes valeurs d' E_{int} . La valeur de E_0 à utiliser pour les calculs *via* MassKinetics[®] dépend alors des valeurs de $\log(A.s)$ de chaque chemin réactionnel et de la valeur d' E_{int} de la population d'ions *i.e.*, de son « temps » de dissociation.

CHAPITRE 4 :

Dans notre cas, les calculs de chimie théoriques (les plus précis) disponibles dans la littérature (**Tableau 4-1**) montrent que seuls les ions pMe-Bz-Pyr et pNO₂-Bz-Pyr ont une valeur d' $E_{0,RR}$ inférieure à leur valeur d' $E_{0,RS}$. Différentes valeurs de facteur de fréquence ont donc été testées afin de déterminer quelle valeur d' E_0 doit être considérée dans la gamme de temps de dissociation en-source de notre instrument qui est de l'ordre de la milliseconde (10^{-3} s). La **Figure 4-8** montre les différentes courbes de vitesses en fonction de l' E_{int} de l'ion précurseur du pMe-Bz-Pyr (**Figure 4-8a** et **4-8b**) et du pNO₂-Bz-Pyr (**Figure 4-8c** et **4-8d**). Dans la gamme de temps de notre instrument, la courbe correspondant à une dissociation par RS est strictement supérieure aux différentes courbes correspondant aux dissociations par RR (**Figure 4-8**). Ainsi, les dissociations par RS sont favorisées par notre instrument pour les trois sels de benzyl-pyridinium testés.

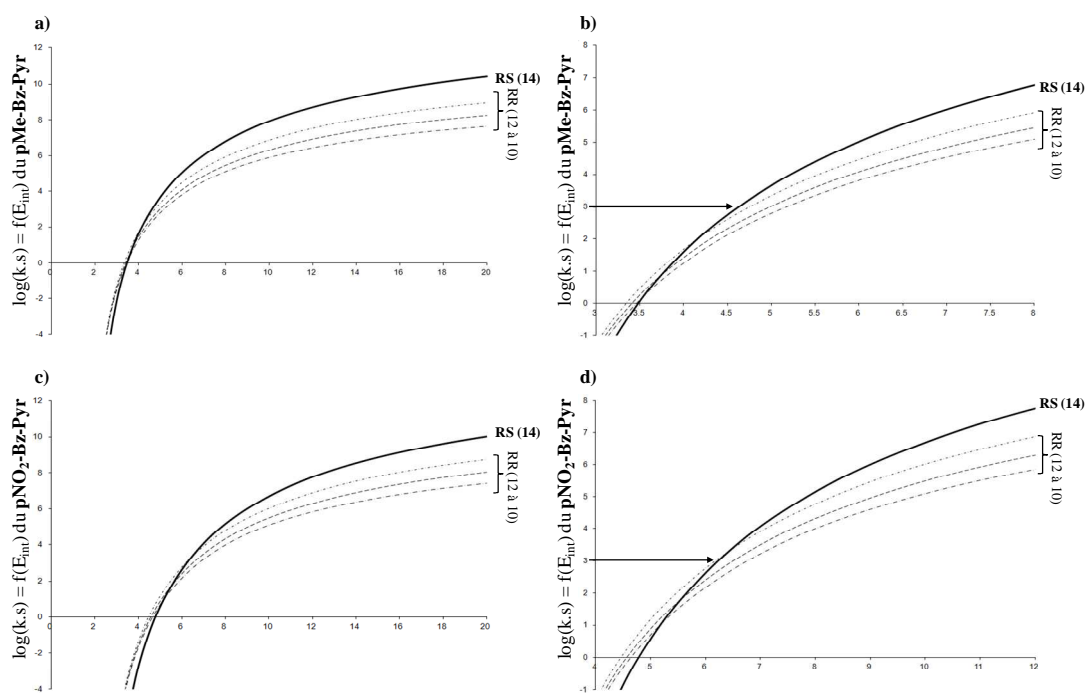


Figure 4-8. Courbes de vitesses en fonction de l' E_{int} de l'ion précurseur (**a et b**) du pMe-Bz-Pyr et (**c et d**) du pNO₂-Bz-Pyr. Les courbes en trait continu sont fonction de l' $E_{0,RS}$ du pyridinium considéré avec un facteur pré-exponentiel de 14. Les courbes en trait pointillé sont fonctions de $E_{0,RR}$ avec un facteur pré-exponentiel variable de 12 à 10. Les flèches horizontales représentent la constante de vitesse dans la gamme de temps de dissociation en source proposée par le LTQ-Orbitrap-XL.

Sachant quelles valeurs d' E_0 doivent être utilisées (*i.e.*, les valeurs d' $E_{0,RS}$), les valeurs d'énergie d'apparition des ions fragments (E_{app}) dans nos conditions expérimentales peuvent être déterminées et sont égales à 3,40 eV, 4,62 eV et 6,22 eV, respectivement pour le pOMe-Bz-Pyr, le pMe-Bz-Pyr et le pNO₂-Bz-Pyr (**Figure 4-9**).

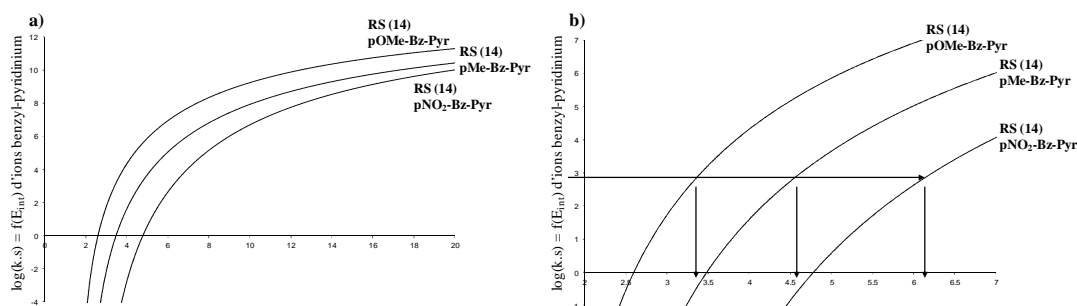


Figure 4-9. Courbes de constantes de vitesse en fonction de l' E_{int} d'ion de benzyl-pyridinium *para*-substitués pour $\log(A.s) = 14$. Les courbes continues sont fonctions de l' $E_{0,\text{RS}}$ du sel considéré avec un facteur pré-exponentiel de 14. Les flèches horizontales représentent la gamme de temps de dissociation en source proposée par le LTQ-Orbitrap-XL. Les flèches verticales indiquent les énergies d'apparition des ions fragments (E_{app}) qui sont de 3,404 eV, 4,625 eV et 6,225 eV, respectivement pour le pOMe-Bz-Pyr, le pMe-Bz-Pyr et le pNO₂-Bz-Pyr.

Les températures caractéristiques des ions précurseurs (T_{car}) induites par ESI et par V-EASI ont été déduites des valeurs d' $E_{0,\text{RS}}$ et de SY_{exp} et sont respectivement de 1346 K et de 1253 K. En outre, des calculs supplémentaires ont montré que, dans notre cas, pour atteindre la même valeur de SY : (i) une augmentation d'un facteur 10 sur le temps de dissociation de l'ion précurseur induit une diminution de la valeur de T_{eff} de ~ 100 K (e.g. $T_{\text{car}}[\text{ESI} ; 10^{-2} \text{ s}] = 1260 \text{ K}$) et, (ii) une diminution d'un facteur 10 sur le temps de dissociation de l'ion précurseur (10^{-4} s) induit une augmentation de la valeur de T_{eff} de ~ 100 K (e.g. $T_{\text{car}}[\text{ESI} ; 10^{-4} \text{ s}] = 1445 \text{ K}$).

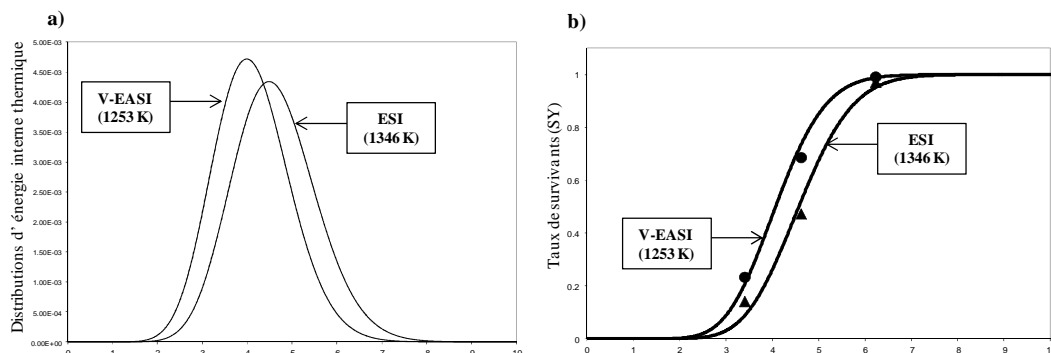


Figure 4-10. (a) Distributions d'énergie interne thermique calculées pour une valeur de T_{eff} de 1253 K (V-EASI) et de 1346 K (ESI). (b) Taux de survivants (SY) en fonction de l' E_{int} de la population d'ion. Les courbes représentent les SY_{th} calculés par intégration des distributions d' E_{int} thermiques pour la source V-EASI et la source ESI. Les points correspondent aux valeurs de SY_{exp} obtenues pour la source V-EASI (cercles) et la source ESI (triangles).

Les distributions d'énergie interne « thermique » de chaque source d'ionisation ont été obtenues de leur valeur de T_{eff} (**Figure 4-10a**) et ont été intégrées pour calculer les valeurs de SY_{th} représentées par des « courbes en S » (pour *S-curves* ; **Figure 4-10b**). La

CHAPITRE 4 :

superposition des valeurs de SY_{exp} (représentées par des cercles et des triangles, respectivement pour la source V-EASI et la source ESI ; **Figure 4-10b**) et des valeurs de SY_{th} (représentées par les courbes ; **Figure 4-10b**) montre que l'hypothèse d'une distribution d' E_{int} thermique est valide.

La source ESI induit donc plus de dissociations de la population d'ions précurseurs que la source V-EASI. Cette différence énergétique entre les sources API étudiées peut avoir deux origines : (i) la source ESI forme de plus gros agrégats chargés nécessitant plus d'énergie pour être totalement désolvatés et induisant une distribution d'énergie interne de la population d'ions plus dispersée que dans la source V-EASI, et/ou (ii) la source ESI laisse plus de temps à la population d'ions précurseurs en phase gazeuse pour se dissocier que dans la source V-EASI. Dans le cas de la dernière proposition, les calculs de la variation de T_{car} induite par une modification du temps de dissociation du système ont montrés que la source V-EASI laisse jusqu'à 10 fois plus de temps aux ions précurseurs nus en phase gazeuse pour se dissocier.

III. Applications du V-EASI aux complexes non-covalents

Ayant dorénavant une source de désorption/ionisation permettant un transfert plus doux des analytes (molécules et/ou interactions) vers la phase gazeuse sans application de tension pour assister la désorption, de nombreux phénomènes observés lors des processus de désorption et d'ionisation sous un champ électrique peuvent être réexaminés. Parmi ceux-ci, (i) l'échange de métal, (ii) la désorption/ionisation de NCX biologiques en milieu physiologique et, (iii) le surchargement des oligonucléotides par le m-NBA, l'ont brièvement été.

III. 1. La désorption/ionisation de complexes métal/ligands organiques

Le composé SK-19703 (de structure confidentielle) est un NCX « fer/ligands organiques » de la forme $Fe(Lgd)_2$. Lors de l'analyse par ESI de ce complexe non-covalent très labile, un échange de métal est systématiquement observé et la nature de ce métal dépend du spectromètre utilisé (*i.e.*, Cu ou Ag respectivement pour les instruments Thermo[®] et Bruker[®]) sans que ces métaux fassent partie du protocole de synthèse du composé ou de préparation des échantillons.

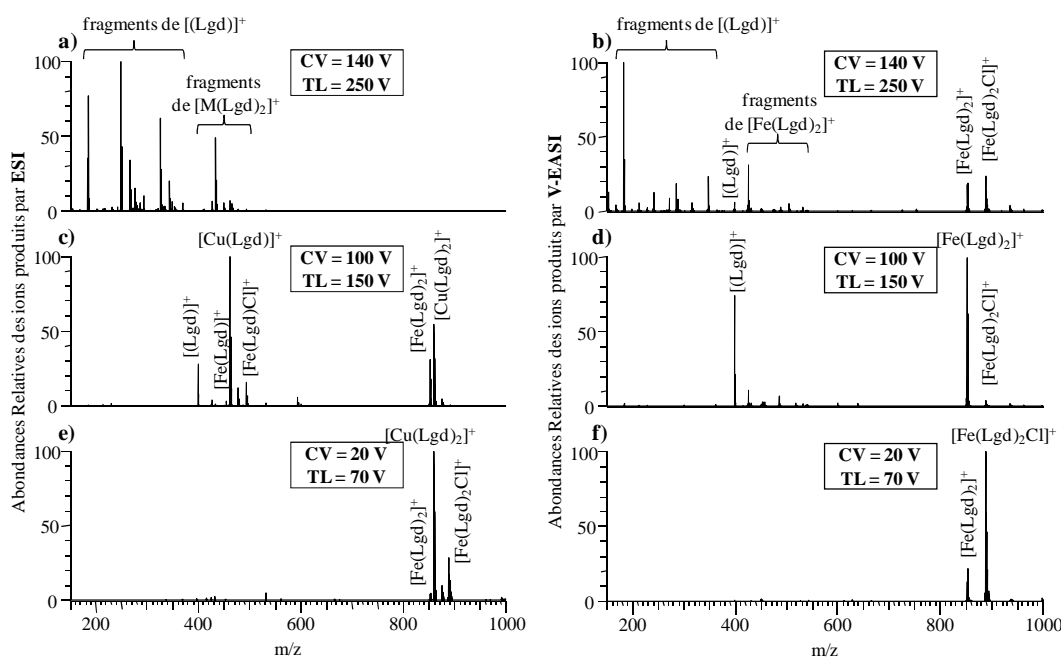


Figure 4-11. Spectre de masse d'un complexe de la forme $[\text{Fe}(\text{Lgd})_2]^+$ (le SK-19703 de structure confidentielle) obtenus (a, c et e) par ESI et (b, d et f) par V-EASI dans des conditions de désolvation (a et b) extrêmes (140 V et 250 V), (c et d) dures (100 V et 150 V) et (e et f) douces (20 V et 70 V). Les acronymes CV et TL représentent respectivement les tensions appliquées au capillaire de transfert et au « Tube Lens ». **Conditions expérimentales.** Concentration : 10 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : dichlorométhane. **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source ESI.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +4,0 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de la source V-EASI.** Mode : V-EASI(+) par pompage. Dimensions du capillaire : longueur 20 cm, d.i. 50 μm , d.e. 190 μm . Pression du gaz : 9 bars. Débit liquide : \sim 200 nL/min. **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : variables. Tension au « Tube Lens » : variables.

La **Figure 4-11** présente les spectres de masse du composé SK-19703 obtenus par ESI (**Figure 4-11a, 4-11c et 4-11e**) et par V-EASI (**Figure 4-11b, 4-11d et 4-11f**) dans des conditions de désolvation plus ou moins douces. Dans les conditions de désolvation les plus douces (i.e., CV = 20 V et TL = 70 V ; **Figure 4-11e et 4-11f**), bien que les NCX majoritairement détectés par ESI aient subi un échange de métal (Fe pour Cu ; **Figure 4-11e**), aucun échange de métal n'a été observé par V-EASI (**Figure 4-11f**). D'ailleurs cette différence est observée indépendamment de l'énergie de déposée pendant l'étape de désolvation. Dans des conditions de désolvation plus dures (i.e., CV = 100 V et TL = 150 V ; **Figure 4-11c et 4-11d**), alors que le spectre ESI-MS montre de nombreux fragment non-covalents contenant majoritairement du cuivre (**Figure 4-11c**), le spectre V-EASI-MS montre un unique fragment majoritaire correspondant à un ligand protoné (**Figure 4-11d**). Enfin, dans des conditions de désolvation extrêmes (i.e., CV = 140 V

et $TL = 250$ V, les *maxima* tolérés par l'instrument ; **Figure 4-11a** et **4-11b**), alors que le spectre ESI-MS montre de nombreux fragment contenant, ou non, un métal et aucun ion précurseur (**Figure 4-11a**), le spectre MS obtenu par V-EASI montre encore la présence des ions précurseurs. Pour toutes ces raisons, la source V-EASI a grandement facilité l'analyse des massifs isotopiques pour la détermination de l'état d'oxydation du fer au sein du complexe SK-19703 « natif » ; ce qui était indispensable à la bonne poursuite de cette étude (menée en collaboration avec une autre équipe de l'IPMC).

III. 2. La désorption/ionisation des complexes biologiques non-covalents

La compréhension des processus de désorption et d'ionisation des NCX biologiques constitue une étape importante de l'étude de la stabilité des NCI. La possibilité d'étudier ces NCX au moyen d'une source d'ionisation encore moins énergétique que les sources de désorption/ionisation par ESI permettrait de maintenir une conformation au plus proche de leur(s) état(s) natif(s). En effet, la gamme de temps proposé par les sources ESI nécessite bien souvent l'ajout d'un solvant organique afin de favoriser les processus de désorption à partir des microgouttelettes et le processus de désolvation des agrégats chargés, risquant de dénaturer d'éventuelle(s) conformation(s) native(s). La source V-EASI étant moins énergétique *i.e.*, elle produit de plus petit agrégats chargés en phase gazeuse, la désolvation de ces derniers ne nécessite donc probablement pas l'assistance d'un solvant organique initialement présent pour réduire la tension superficielle des microgouttelettes.

La **Figure 4-12** présente les spectres de masse d'un mélange ADN/peptide (4 : 1), respectivement l'oligonucléotide de séquence T₆CT₅ ($M_w = 3571,60$ Da) et le fragment 11-24 d'ACTH ($M_w = 1651,04$ Da), obtenus par V-EASI en mode positif (**Figure 4-12a**) et en mode négatif (**Figure 4-12b**). Ces spectres montrent la possibilité de transférer de la solution vers la phase gazeuse des assemblés de macromolécules biologiques stabilisées par des interactions non-covalentes ($M_w = 5222,64$ Da) dans un tampon aqueux adéquat, et ce, indépendamment de la polarité d'observation.

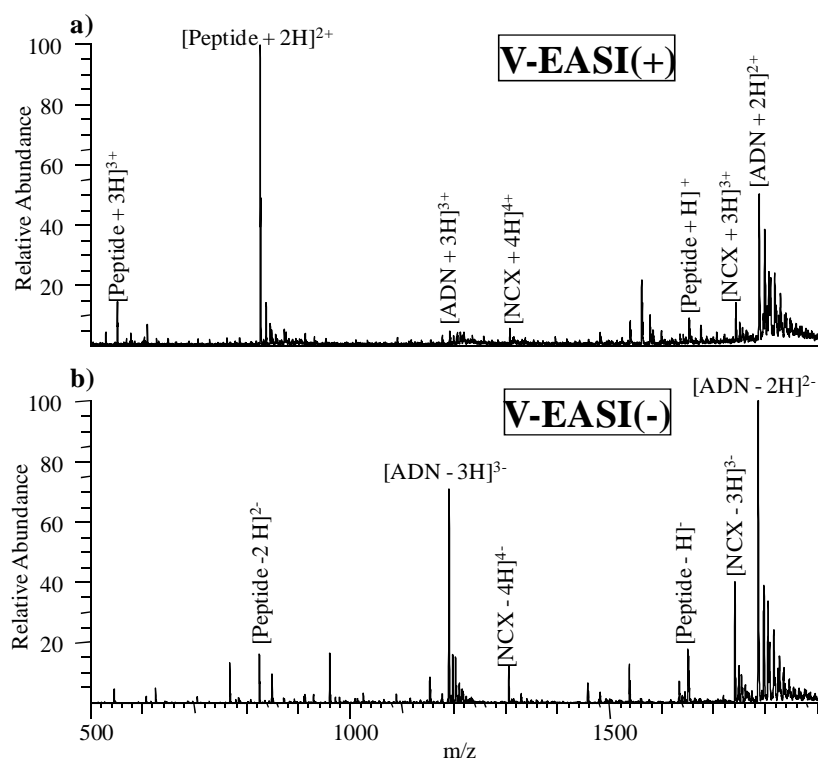


Figure 4-12. Spectres de masse d'un mélange ADN/peptide (4 : 1), respectivement T₆CT₅ et 11-24, formés par V-EASI (a) en mode positif et (b) en mode négatif. **Conditions expérimentales.** Concentrations : [ADN] = 20 μmol/L et [Peptide] = 5 μmol/L. Solvant : tampon aqueux d'acétate d'ammonium (20 μM). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source V-EASI.** Mode : V-EASI(+) et V-EASI(-) par pompage. Dimensions du capillaire : longueur 25 cm, d.i. 50 μm, d.e. 190 μm. Pression du gaz : 9 bars. Débit liquide : ~ 200 nL/min. **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : (a) 130 V et (b) -130 V. Tension au « Tube Lens » : (a) 190 V et (b) -190 V.

Comme aucun champ électrique n'est appliqué pendant la formation et l'évaporation des microgouttelettes, les charges positives et les charges négatives sont mieux réparties sur leur surface ; il est donc possible de désolvater, de guider et d'observer aussi bien en polarité positive que négative les analytes issus du même spray bipolaire. Ainsi, les répulsions de charges identiques étant réduites à la surface des microgouttelettes, les productions d'agrégats chargés par IEM sont défavorisées par rapport à celles par CRM. En effet, bien que l'observation de tels NCX a nécessité l'application de conditions de désolvatation comparable à celle utilisées en ESI mais assez dures *i.e.*, induisant un nombre non négligeable de fragmentations en source, la présence de nombreux ions adduits avec des cations alcalins caractéristique des sources API par désorption/désolvatation n'a pas pu être atténuée (**Figure 4-12a** et **4-12b**).

III. 3. Le super-chargement de simples brins d'ADN par V-EASI

Le super-chargement des oligonucléotides observé lors des processus de désorption et d'ionisation sous un champ électrique est un phénomène particulièrement d'intérêt à nos yeux⁴⁶. En ayant la possibilité, il était donc indispensable de vérifier l'influence de l'absence de champ électrique sur ce phénomène.

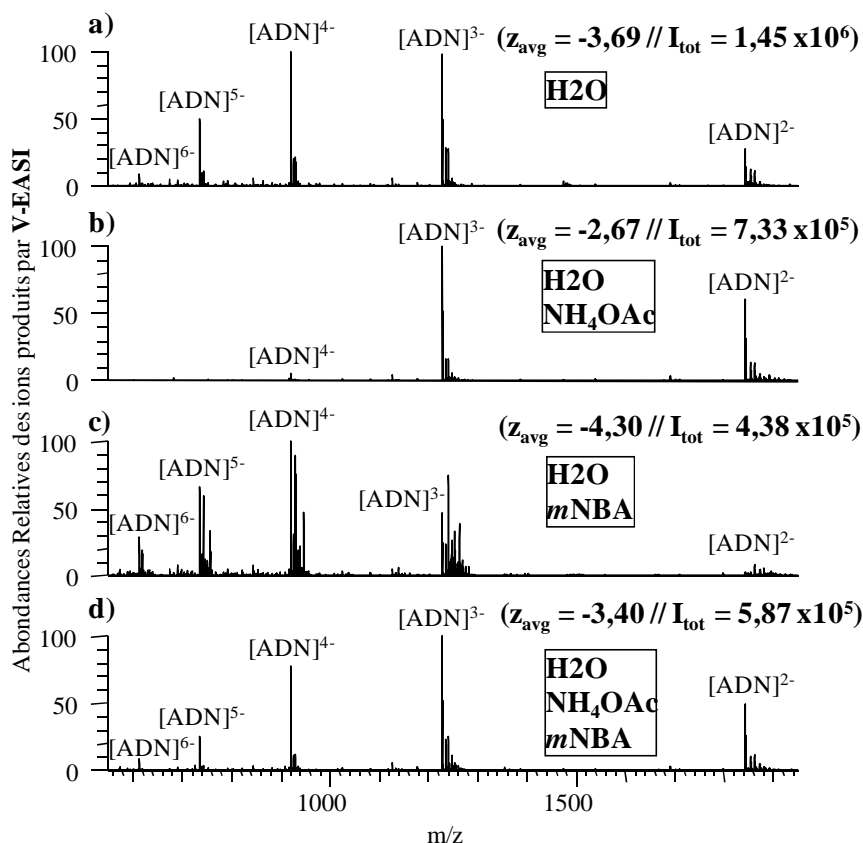


Figure 4-13. Spectres de masse V-EASI en mode négatif de simples brins d'ADN ($T_5G_2T_3G_2$; 12-mer) (a) en d'une solution aqueuse, (b) en solution aqueuse tamponnée (20 mM de NH_4OAc), (c) en solution aqueuse en présence de 1% de *mNBA*, et (d) en solution aqueuse tamponnée (20 mM de NH_4OAc) en présence de 1% de *mNBA*. **Conditions expérimentales.** Concentration : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : variable. **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source V-EASI.** Mode : V-EASI(-) par pompage. Dimensions du capillaire : longueur 30 cm, d.i. 50 μm , d.e. 190 μm . Pression du gaz : 9 bars. Débit liquide : ~ 200 nL/min. **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V.

La **Figure 4-13** présente les spectres de masse V-EASI en mode négatif de l'oligonucléotide de séquence $T_5G_2T_3G_2$ (12-mer ; $M_w = 3686,62$ Da) en solution

⁴⁶ B. Brahim, S. Alves, R. B. Cole, J.-C. Tabet ; Charge Enhancement of Single-Stranded DNA in Negative Electrospray Ionization Using the Supercharging Reagent Meta-nitrobenzyl Alcohol. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2013**, (DOI 10.1007/s13361-013-0732-8)

aqueuse (**Figure 4-13a**), en solution aqueuse tamponné par 20 mM d'acétate d'ammonium (**Figure 4-13b**), en solution aqueuse en présence de 1% de *mNBA* (**Figure 4-13c**) et, en solution aqueuse tamponné par 20 mM d'acétate d'ammonium en présence de 1% de *mNBA* (**Figure 4-13d**). *A priori*, les spectres de masse pourrait laisser penser que le spectre de masse de référence est la **Figure 4-13b**, cependant il n'en est rien ; le spectre de masse de référence est bel et bien la **Figure 4-13a** pour lequel les simples brins d'ADN sont dilués dans de l'eau pure.

L'ajout du tampon acétate d'ammonium (**Figure 4-13b**) ne contrôle pas uniquement le pH de la solution mais interagit aussi avec les groupes phosphates qui sont totalement déprotonés en solution ($pK_a < 1$) et donc génère une compétition entre les ions ammonium (NH_4^+) et les métaux alcalins pour le rôle de contre-ion (formation de sels)⁴⁷. Ainsi, durant les dernières étapes de désolvation des agrégats chargés en phase gazeuse, les ions NH_4^+ appariés à un phosphate déprotoné ont la possibilité de transférer un proton au phosphate avant qu'une molécule d'ammoniac soit libérée comme le décrit le model de désolvation des oligonucléotides proposé par *Gabelica and co-workers*^{48,49}. Il en résulte une diminution de la quantité de charges négatives portées par les oligonucléotides (de $z_{avg} = -3,69$ à $z_{avg} = -2,67$; respectivement dans les **Figure 4-13a** et **4-13b**).

L'action majeure de *mNBA* a été conservée dans cet environnement libre de champ électrique *i.e.*, l'ajout de *mNBA* a invariablement augmenté le nombre de charges négatives portées par l'oligonucléotide (de $z_{avg} = -3,69$ à $z_{avg} = -4,30$ et de $z_{avg} = -2,67$ à $z_{avg} = -3,40$; respectivement pour les **Figures 4-13a** et **4-13c** et pour les **Figures 4-13b** et **4-13d**). De plus, alors qu'une perte totale de signal était observée en absence d'acétate d'ammonium (et indépendamment de la présence de *mNBA*) par ESI, la source V-EASI semble permettre la détection d'oligonucléotides dans des solutions aqueuses non-tamponnées (**Figure 4-13a** et **4-13c**) laissant supposer que l'action de *mNBA* est

⁴⁷ R. H. Griffey, H. Sasmor, M. J. Greig ; Oligonucleotide Charge States in Negative Ionization Electrospray-Mass Spectrometry Are a Function of Solution Ammonium Ion Concentration. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **1997**, 8, 155-160.

⁴⁸ F. Rosu, S. Pirotte, E. De Pauw, V. Gabelica ; Positive and negative ion mode ESI-MS and MS/MS for studying drug-DNA complexes. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 253, 156-171.

⁴⁹ F. Rosu, E. De Pauw, V. Gabelica ; Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie*, **2008**, 90, 1074-1087.

CHAPITRE 4 :

pratiquement indépendante de la présence de cations NH_4^+ . Cependant, le superchargement des oligonucléotides induit par l'ajout de *mNBA* à une solution aqueuse non-tamponnée (**Figure 4-13c**) est accompagnée de la formation d'un grand nombre d'ions adduits avec des métaux alcalins ayant pour effet de disperser le signal observé pour chaque état de charge et, par conséquent, de diminuer d'un facteur 2 l'intensité totale des espèces moléculaires protonés (de $I_{\text{tot}} = 1,45 \times 10^6$ à $I_{\text{tot}} = 4,38 \times 10^5$; pour les **Figures 4-13a** et **4-13c**). Bien que l'ajout du tampon acétate d'ammonium à de telles solutions empêche la production d'ions adduits avec des métaux alcalins (**Figures 4-13-c** et **4-13d**), le spectre de masse obtenu reste comparable au spectre de masse de référence (**Figure 4-13a**). Ainsi, la présence de *mNBA* lors des processus de désolvatation par V-EASI ne semble avoir qu'un très faible intérêt analytique.

En effet, la **Figure 4-13a** (issue d'une solution aqueuse non-tamponnée d'oligonucléotide) présente un spectre comparable aux résultats obtenus par ESI en présence de *mNBA* dans un mélange équimolaire eau/méthanol tamponné. Il est donc possible que l'action majeure du *mNBA* soit de compenser la diminution du nombre de charges négatives sur les oligonucléotides induite par la présence des cations NH_4^+ qui, réciproquement, limite les cationisations induite par la présence de *mNBA*. Cette notion de concertation moléculaire est d'ailleurs en accord avec le model proposé dans le chapitre précédent pour expliquer le phénomène de superchargement induit par la présence de *mNBA* durant les dernières étapes du processus de désolvatation.

Outre la présence de nombreux ions adduits avec des métaux alcalins sur les oligonucléotides qui pourrait être représentative d'une affinité du *mNBA* pour ces métaux, la **Figure 4-13c** ne montre qu'une légère augmentation du nombre de charges négatives portées par l'oligonucléotide. Cette augmentation peut s'expliquer : (i) par un transfert de proton intermoléculaire (de l'oligonucléotide vers le *mNBA*) qui ne serait que partiellement favorisé, et/ou (ii) par une désolvatation du *mNBA* lente qui ne produirait des ions hautement chargés nus que très tardivement.

IV. Conclusion

La conception d'une source V-EASI au laboratoire a permis son étude énergétique par comparaison avec une source ESI. Les résultats expérimentaux ont montrés que les ions précurseurs produits par V-EASI sont moins soumis aux dissociations en-source que ceux produits par ESI. Cette différence énergétique peut avoir deux origines : (i) les agrégats chargés produits par V-EASI sont plus petits et nécessitent donc moins d'énergie pour être totalement désolvatés et produire des ions « nus » en phase gazeuse, et/ou (ii) la source V-EASI laisse moins de temps à la population d'ions précurseurs pour se dissocier que dans la source ESI.

Cette source plus douce a permis de réexaminer quelques phénomènes observés lors des processus de désorption et d'ionisation sans qu'un champ électrique soit appliqué. La source V-EASI a donc permis : (i) l'analyse de NCX métal/ligand extrêmement sensibles aux échanges de métaux, (ii) la désorption/ionisation de NCX biologiques « peptide/oligonucléotide » dont la masse moléculaire est supérieure à 5 kDa en solution tamponnée *i.e.*, plus proche de conditions physiologiques que les solvants généralement utilisés par ESI et, (iii) le phénomène de « surchargement » observé lorsque *mNBA* est ajouté à la solution étudiée. Ainsi, l'excès de charges présent à la surface des microgouttelettes produites par ESI (ce qui constitue la plus grande force de cette méthode) induit une ionisation non-sélective des composés présents dans les microgouttelettes (ce qui constitue la plus grande faiblesse de cette méthode).

L'opportunité de développer une source V-EASI ne s'est présentée que très tard dans l'avancement de ces travaux de thèse (grâce à l'invitation du Professeur Eberlin) mais le potentiel de cette source est, très certainement, bien loin d'avoir été exploité. En effet, un grand nombre de phénomènes observés lors des processus de désorption et d'ionisation sous un champ électrique peuvent encore être réexaminés, *e.g.* les réactions d'oxydation et/ou de réductions activées par un autre composé chimique, par un bombardement électronique, voir-même, par un faisceau laser.

CHAPITRE 4 :

CHAPITRE 5 :

Comportement des complexes biologiques non-covalents lors de leur activation en phase gazeuse

Il est très difficile d'examiner avec précision la nature et la position de NCI stabilisant les NCX biologiques, ou la répartition des charges sur ces derniers, par des approches basées sur un seul niveau d'analyse par MS¹. En revanche, les expériences de spectrométrie de masse « en tandem » (MS/MS) de NCX ont montrés leur capacité à répondre ces questions^{2,3}. Les expériences MS/MS englobent toutes les méthodes impliquant, au moins, deux niveaux d'analyse par MS reliés par un processus de dissociation ou une réaction chimique induisant une modification de la masse et/ou de la charge d'un ion^{4,5,6}. Les expériences MS/MS impliquent formellement un premier analyseur où les ions précurseurs sont isolés et fragmenteront par la suite (spontanément ou par activation) pour produire des ions fragments qui seront détectés lors d'une seconde analyse⁷. Il est possible d'augmenter le nombre d'étapes d'isolation/analyse jusqu'à des expériences MSⁿ où n est le nombre de la génération d'ions analysés. Les spectromètres de masse permettant des expériences MS/MS peuvent être conçus de deux manières : (i) par le couplage d'au moins deux analyseurs distincts (instruments à faisceau d'ions) ou, (ii) par l'application d'une séquence d'événements dans un même analyseur à stockage d'ions (instruments à séquence temporelle).

I. Méthodes d'activation usuelles des ions en phase gazeuse

Lorsque les ions précurseurs transférés de la solution à la phase gazeuse sont suffisamment stables, il est possible de les isoler (lors d'une première analyse) et de les « activer » en déposant

¹ J. M. Daniel, S. D. Friess, S. Rajagopalan, S. Wendt, R. Zenobi ; Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2002**, 216, 1–27.

² S. Yin, J.A. Loo. Elucidating the Site of Protein-ATP Binding by Top-Down Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, 21, 899-907.

³ K. Pagel, S.-J. Hyung, B.T. Ruotolo, C.V. Robinson. Alternative Dissociation Pathways Identified in Charge-Reduced Protein Complex Ions. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 5363-5372.

⁴ R. G. Cooks, J. H. Beynon, R. M. Capriolo, G. R. Lester ; *Metastable Ions*, Elsevier (Amsterdam), **1973**.

⁵ F. W. McLafferty ; *Tandem Mass Spectrometry* ; F. W. McLafferty Ed.: John Wiley and Sons (New York), **1983**.

⁶ K. L. Busch, G. L. Glish, S. A. McLuckey ; *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry : Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*, VCH (New York), **1988**.

⁷ E. de Hoffman ; *Tandem Mass Spectrometry : a Primer. J. Mass Spectrom.*, **1996**, 31, 129-137.

CHAPITRE 5 :

une distribution donnée d'énergie jusqu'à atteindre un état énergétiquement excité (vibrationnelle et/ou électronique) de l'ion afin d'induire des fragmentations dépendantes de la méthode de dépôt d'énergie⁸. Les méthodes d'activation d'une population d'ions en phase gazeuse peuvent donc être divisées en deux catégories : (i) l'activation « par chauffage » de la population d'ion menant généralement à des mécanismes de dissociation dits « ergodiques » *i.e.*, où la vitesse de dissociation de l'ion est inférieure à la vitesse de répartition de l'énergie sur tous les oscillateurs harmoniques de l'ion, et (ii) l'activation « par neutralisation de charge(s) » issus de transfert(s) d'électron(s) (ajout ou détachement) de la population d'ions multichargés menant généralement à des mécanismes de dissociation dits « non-ergodiques » *i.e.*, où la vitesse de dissociation de l'ion est supérieure à la vitesse de répartition de l'énergie sur tous les oscillateurs harmoniques de l'ion.

I. 1. Méthodes d'activation « par chauffage »

Les méthodes d'activation par chauffage peuvent être elles-mêmes subdivisées en deux catégories : (i) l'activation de la population d'ions par collision avec un gaz neutre inerte (les dissociations induites par collision sur une surface, *SID* pour *Surface-Induced Dissociation*⁹, ne seront pas discutées) ou, (ii) l'activation de la population d'ions par exposition à un rayonnement.

(i) Le chauffage par collision avec un gaz inerte

Différentes méthodes permettent l'activation d'une population d'ion par collision^{10,11,12}, *e.g.* les dissociations induites par collision (*CID* pour *Collision-Induced Dissociation*) aussi appelées décompositions activées par collision (*CAD* pour *Collision-Activated Decomposition*). Dans ces méthodes (dites *CxD*), la population d'ions accélérés à plus ou moins haute énergie entre en collision avec des atomes ou des molécules de gaz cibles

⁸ L. Sleno, D. A. Volmer ; Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2004**, *39*, 1091-1112.

⁹ M. A. Mabud, M. J. Dekrey, R. G. Cooks ; Surface-induced dissociation of molecular ions. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **1985**, *75*, 285-294.

¹⁰ R. G. Cooks ; Collision-Induced Dissociation : Readings and Commentary. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, *30*, 1215-1221.

¹¹ A. K. Shukla, J. H. Futrell ; Tandem mass spectrometry : dissociation of ions by collisional activation. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, *35*, 1069-1090.

¹² K. R. Jennings ; The changing impact of the collision-induced decomposition of ions on mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, *200*, 479-493.

immobiles. Dans les instruments à faisceau d'ions, une cellule de collision placée entre les deux analyseurs contient le gaz cible inerte à une pression suffisante pour favoriser les collisions avec la population d'ions ; la différence de pressions entre la cellule de collision et les analyseurs étant assurée par un pompage différentiel. Dans les instruments à séquence temporelle, l'analyseur sélectionne les ions précurseurs puis, devient la cellule de collision où les ions fragments seront produits et redevient, par la suite un analyseur afin de détecter les ions fragments. A de plus faibles énergies d'activation (de 1 à 100 eV), l'énergie interne des ions excités est principalement vibrationnelle¹³. Réciproquement, à de plus hautes énergies d'activation (de l'ordre du keV), l'énergie interne des ions excités est principalement électronique¹⁴ (transition électronique verticale) et, par la suite, est redistribuée en énergie vibrationnelle.

La fragmentation de la population d'ions résulte de trois étapes successives dont les durées ne sont pas homogènes. Dans la première étape, la population d'ions sélectionnée est soumise à une (ou de nombreuses) collision(s) avec la cible gazeuse présente dans la cellule de collision. Lors de ces collisions, une partie de l'énergie cinétique translationnelle d'un ion peut être convertie en énergie interne (collision activante de l'ion précurseur) ou peut être transférée sous forme d'énergie cinétique à une molécule de gaz inerte (collision désactivante de l'ion précurseur). Le nombre de collisions de basses énergies nécessaires pour atteindre un état excité de l'ion étant dépendant de la nature de ce dernier, de la nature de l'instrument (à faisceau d'ions ou à paquet d'ions) et des conditions instrumentales de la cellule de collision (pression, température, nature du gaz cible...). La deuxième étape est très rapide (de 10^{-14} à 10^{-16} s) et correspond à la dernière collision activante permettant à un ion d'atteindre un état excité. Enfin la dernière étape correspond à la décomposition de l'ion activé. Bien que le temps de décomposition des ions précurseurs dépende de la nature de la liaison rompue et des fragments engendrés, les ions fragments observés dépendent de la gamme de temps de l'instrument.

¹³ R. N. Schwartz, Z. I. Slawsky, K. F. Herzfeld ; Calculation of Vibrational Relaxation Times in Gases. *J. Chem. Phys.*, **1952**, 20, 1591-1599.

¹⁴ H. Yamaoka, P. Dong, J. Durup ; Energetics of the collision-Induced Dissociations. *J. Chem. Phys.*, **1969**, 51, 3465-3476.

CHAPITRE 5 :

Ainsi, en considérant que ces processus sont ergodiques : (i) le temps de dissociation de l'ion considéré est plus long que le temps d'excitation (par une collision), (ii) la vitesse de dissociation de l'ion est inférieure à la vitesse de redistribution de l'énergie issue d'une collision activante sur tous les oscillateurs harmoniques de l'ion, (iii) l'ion atteint un état d'équilibre énergétique interne où l'énergie est répartie avec une probabilité égale sur tous les oscillateurs harmoniques, et (iv) les produits de dissociations observés résultent de séries de réactions compétitives et/ou consécutives. Dans ces conditions, les voies de fragmentations empruntées par la population d'ions ne dépendent que de la quantité d'énergie déposée et mènent généralement à la rupture de la liaison de plus faible énergie par des mécanismes dirigés par la charge. Pour les mêmes raisons, les molécules composées d'un plus grand nombre d'atomes (*e.g.* les macromolécules) nécessitent plus d'énergie pour se décomposer dans la gamme de temps de l'instrument.

Les inconvénients majeurs des méthodes CxD sont : (i) la présence d'un gaz de collision à une pression supérieure aux pressions communément appliquées aux analyseurs et indispensables à leur bon fonctionnement et, (ii) la faible quantité d'énergie que l'on peut déposer sur un ion limitant les possibilités de fragmentations de l'ion aux liaisons de plus faible énergie.

(ii) Le chauffage par exposition à un rayonnement

D'autres méthodes d'activation vibrationnelle fournissent de l'énergie à une population d'ions sans compromettre le vide poussé des analyseurs. Ces méthodes permettent l'activation d'une population d'ion en l'exposant à un rayonnement infrarouge diffus ou focalisé, respectivement pour les dissociations induites par radiation infrarouge d'un corps noir (*BIRD* pour *Blackbody Infrared Radiative Dissociation*)¹⁵ et pour les dissociations induites par plusieurs photons infrarouges (*IRPMD* pour *InfraRed MultiPhoton Dissociation*)¹⁶. Dans ces méthodes (dites de photodissociation), la population d'ions est irradiée au sein de l'analyseur. Comme le chauffage par irradiation

¹⁵ P. D. Schnier, W. D. Price, R. A. Jockusch, E. R. Williams ; Blackbody Infrared Radiative Dissociation of Bradykinin and Its Analogues: Energetics, Dynamics, and Evidence for Salt-Bridge Structures in the Gas Phase. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 7178-7189.

¹⁶ D. P. Little, J. Paul Speir, M. W. Senko, P. B. O'Connor, F. W. McLafferty ; Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing. *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 2809-2815.

nécessite une exposition plus longue de la population d'ions, ces méthodes d'activation sont principalement réalisées dans des instruments de temps permettant le stockage de la population d'ions.

Le mécanisme de fragmentation par photodissociation implique l'absorption de quelques (ou plusieurs) photons par un ion. L'énergie apportée par chaque photon absorbé se répartit dans tous les oscillateurs harmoniques et l'énergie interne de l'ion s'accumule jusqu'à induire la dissociation de ce dernier avec une vitesse de dissociation suffisamment grande pour observer la production d'ions fragments dans la gamme de temps de l'instrument. Les méthodes de photodissociations sont donc aussi des méthodes d'activation ergodiques où l'énergie est redistribuée au fur et à mesure de son ajout sur l'ion, et ce, avant sa fragmentation. Ces méthodes ont l'avantage de déposer plus sélectivement l'énergie sur les ions absorbants à la longueur d'onde d'irradiation et un meilleur contrôle sur la quantité d'énergie déposée permettant d'affiner la distribution d'énergie interne de la population d'ions considérée.

Historiquement, les lasers émettant dans l'ultraviolet (*lasers UV*) et dans le visible (*lasers Vis*) ont été les premiers à être testés mais, de nos jours, les lasers émettant dans l'infrarouge (*lasers IR*) sont bien plus courants. En comparaison avec les lasers UV, les lasers IR sont moins sélectifs et moins énergétiques. Ainsi, lorsque l'absorption d'un seul photon UV fournit suffisamment d'énergie pour induire la dissociation d'un ion, l'absorption de plusieurs photons IR est nécessaire pour activer et dissocier le même ion.

I. 2. Méthodes d'activation par neutralisation de charge(s)

Les méthodes d'activation par neutralisation de charge(s) peuvent être subdivisées en deux catégories : (i) la neutralisation de charge(s) de la population d'ions par exposition à un faisceau d'électrons incidents d'énergie cinétique contrôlée ou, (ii) la neutralisation de charge(s) de la population d'ions par transfert d'un (ou de plusieurs) électron(s) *via* des réactions ion-ion intermoléculaires.

(i) *La neutralisation par exposition à un faisceau d'électrons*

Parmi les méthodes d'activation fournissant de l'énergie à une population d'ions sans compromettre le vide poussé des analyseurs, la dissociation par capture d'électron (*ECD* pour *Electron Capture Dissociation*)^{17,18} et la dissociation par détachement d'électron (*EDD* pour *Electron Detachment Dissociation*)¹⁹ permettent l'activation d'une population d'ions, respectivement multi-protonés et multi-déprotonés, en l'exposant à un faisceau d'électrons incidents, de distribution d'énergie cinétique contrôlée et de section transversale de capture suffisante produits, par une cathode émettrice. Outre, la polarité de la population d'ions étudiée, la différence majeure entre ces deux méthodes réside dans l'énergie cinétique des électrons incidents qui doit être : (i) faible pour que l'électron incident soit capturé par une espèce multi-protoné (faible énergie d'activation), ou (ii) forte pour que l'électron incident détache un électron d'une espèce multi-déprotoné (haute énergie d'activation).

La fragmentation de la population d'espèces multi-protonées par *ECD* résulte de la capture d'un (ou plusieurs) électron(s) de faible énergie cinétique (< 0,2 eV) permettant leur fragmentation. Ce processus d'activation (< 10⁻¹⁴ s) est plus rapide que les fréquences de vibration des liaisons standards ; ainsi, il permet la dissociation directe de liaisons autour du radical. Par conséquent, et contrairement aux méthodes d'activation vibrationnelle, l'*ECD* est décrit comme un processus non-ergodique ; ce qui explique pourquoi cette méthode d'activation a été appliquée avec succès à la fragmentation de macromolécules multiprotonables.

Les voies de fragmentations observées par *ECD* impliquent la dissociation d'espèces multiprotonées ayant un nombre impair d'électrons. De plus, de par la nature non-ergodique de ces processus, les voies de fragmentations empruntées par la population d'ions activée ne dépendent que de la position du radical. Elles mènent généralement à la

¹⁷ R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty ; Electron capture dissociation of multiply charged protein cations A nonergodic process. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 3265-3266.

¹⁸ R. A. Zubarev, K. F. Haselmann, B. Budnik, F. Kjeldsen, F. Jensen ; Towards an understanding of the mechanism of electron capture dissociation: a historical perspective and modern ideas. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2002**, 8, 337-349.

¹⁹ B. A. Budnik, K. F. Haselmann, R. A. Zubarev ; Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon. *Chem. Phys. Lett.*, **2001**, 342, 299-302.

rupture d'une liaison qui n'est pas forcément la plus faible mais qui est proche de la charge neutralisée par la capture d'un électron *via* des mécanismes dirigés par le radical permettant l'observation d'ions fragments différents de ceux observés par activation ergodique. Cependant, le faible diamètre du faisceau d'électrons n'expose qu'une petite partie du volume où la population d'ions est confinée. Ainsi, l'efficacité de fragmentation de la population d'ions est bien inférieure à celle observée par activation collisionnelle. De plus, il est très difficile de réaliser des expériences ECD dans un analyseur de type piège à ions (*IT* pour *Ion Trap*). En effet, les forts champs électriques appliqués sur le piège perturbent le mouvement des électrons dans le piège et limitent grandement la durée d'interaction avec les ions. C'est pourquoi, d'autres méthodes d'activation basées sur le transfert intermoléculaire d'électron par des réactions ion/ion ont été développées pour ces analyseurs.

(ii) *La neutralisation par transfert intermoléculaire d'électron*

Historiquement, le transfert intermoléculaire d'électron en phase gazeuse a été proposé par *Stephenson and McLuckey*²⁰ *via* la réduction du nombre de charges portées par des oligonucléotides multi-déprotonés en interaction avec des cations radicaux de xénon. De nos jours, la principale méthode permettant l'activation d'une population d'ions par transfert d'électron est la dissociation par transfert d'électron (*ETD* pour *Electron Transfer Dissociation*)²¹. Dans cette méthode, la population d'espèces multi-protonées étudiée est mise en interaction avec une population d'anions radicalaires (*e.g.* des anions radicalaires de fluoranthène). Ce type de réaction ion-ion n'est possible que dans des instruments à piégeage d'ions permettant aux ions positifs et négatifs de coexister dans un domaine particulier du diagramme de stabilité ($a_z = f(q_z)$)²².

²⁰ J. L. Jr. Stephenson, S. A. McLuckey ; Charge reduction of oligonucleotide anions via gas-phase electron transfer to xenon cations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, *11*, 875-880.

²¹ 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.*, **2004**, *101*, 9528-9533.

²² J.-C. Mathurin, S. Gregoire, A. Brunot, J.-C. Tabet, R. E. March, S. Catinella, P. Traldi ; Investigation of Space Charge Interactions Which Arise During Simultaneous Confinement of Positive and Negative Ions in an Ion Trap Mass Spectrometer, *Journal of mass Spectrometry*, **1997**, *32*, 829-837.

CHAPITRE 5 :

La fragmentation de la population d'ions lors des réactions de transfert d'électron en ETD se déroule en plusieurs étapes²³. Tout d'abord, les espèces multi-protonées et les anions radicalaires s'apparient. Cette étape nécessite la rencontre des partenaires (défavorisée entropiquement) qui sont porteurs de charges opposées (favorisée enthalpiquement) ; cette étape est donc plus rapide que dans une réaction ion/molécule mais reste l'étape la plus longue des réactions de transfert électronique. Une fois les partenaires appariés, un électron est transféré de l'anion radicalaire vers l'espèce multi-protonée (de plus grande réactivité due à la présence de plusieurs charges positives sur les ions précurseurs). Il en résulte la réduction de l'état de charge de l'espèce multiprotonée et la neutralisation de l'anion radicalaire en molécule (processus exothermiques). Comme l'état final du système est plus stable que son état initial, cette étape est enthalpiquement favorisée *i.e.*, elle est très « rapide ». Ce n'est que lors de la dissociation du complexe ion/molécule résultant que l'ion acquiert un excès d'énergie interne. L'ion activé par un radical peut alors, selon la position de ce dernier, se décomposer et/ou répartir cet excès d'énergie interne sur tous ses oscillateurs harmoniques. Ainsi, les voies de fragmentation et les ions fragments observés sont analogues à ceux observés par ECD.

I. 2. Nomenclature des ions fragments

Afin de faciliter la compréhension de la suite de ce chapitre, la nomenclature des ions fragments issue des polymères biologiques étudiés est rappelée.

I. 2. a. Fragmentation des peptides en phase gazeuse

La nomenclature la plus utilisée pour décrire la fragmentation de peptides linéaires est celle proposée par *Roepstorff and Fohlman*²⁴ (**Figure 5-1**). Le clivage de la chaîne peptidique peut avoir lieu à trois niveaux d'un même résidu d'acide aminé engendrant donc six différents types de fragments (**Figure 5-1**). Ainsi, lorsqu'au moins une charge est portée par le côté N-terminal des ions fragments a_n , b_n et c_n sont observés et, lorsqu'au moins une charge est portée par le côté C-terminal des ions fragments x_m , y_m

²³ S. J. Pitteri, P. A. Chrisman, S. A. McLuckey ; Electron-Transfer Ion/Ion Reactions of Doubly Protonated Peptides : Effect of Elevated Bath Gas Temperature. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 5662-5669.

²⁴ P. Roepstorff, J. Fohlman ; Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, **1984**, 11, 601.

et z_m sont observés (**Figure 5-1**). Les méthodes d'activation vibrationnelle de basse énergie induisent la dissociation de la liaison de plus basse énergie correspondant à la liaison amide engendrant des ions fragments b_n et y_m .

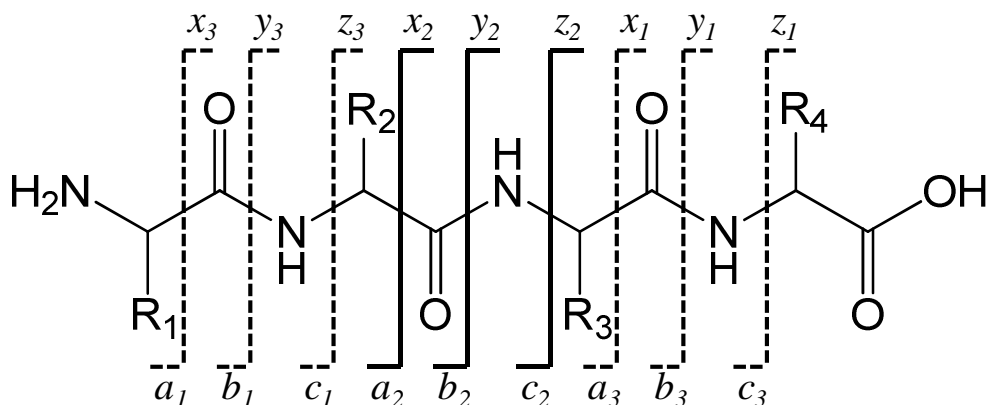


Figure 5-1. Voies de fragmentation séquentielles d'un tétra-peptide selon la nomenclature de *Roepstorff and Fohlman*²⁴. Le groupement R_n correspond à la chaîne latérale du n-ième acide aminé.

Les voies de dissociations des peptides en phase gazeuse sont aussi dépendantes de la nature des groupements latéraux des résidus d'acides aminés les composant. Ainsi, la présence de groupements latéraux basiques protonés du côté N-terminal ou C-terminal favorise aussi la détection en mode positif de leurs ions fragments respectifs. Réciproquement, la présence de groupements latéraux acides déprotonés du côté N-terminal ou C-terminal favorise aussi la détection en mode négatif de leurs ions fragments respectifs.

I. 2. b. Fragmentation des brins d'ADN en phase gazeuse

La nomenclature la plus utilisée pour décrire la fragmentation (à basse et à haute énergie) d'oligonucléotides linéaires est celle proposée par *McLuckey et al.*²⁵. Le clivage du squelette oligonucléotidique peut avoir lieu à quatre niveaux autour d'un même groupement phosphodiester engendrant donc huit différents types d'ions fragments (**Figure 5-2**). Ainsi, lorsqu'au moins une charge est portée par le côté 5' des ions fragments a_n, b_n, c_n et d_n (**Figure 5-1**) sont observés et, lorsqu'au moins une charge est portée par le côté 3' des ions fragments w_m, x_m, y_m et z_m (**Figure 5-2**) sont observés. Les

²⁵ S. A. McLuckey, G. J. van Berkel, G. L. Glish ; Tandem mass spectrometry of small multiply charged oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, 3, 60-70.

méthodes d'activation vibrationnelle induisent la dissociation de la liaison de plus basse énergie critique correspondant à la liaison « C_{3'}-O(PO₃R) » engendrant des ions fragments (a_n - B_n) et w_n ; des ions fragments d_n et z_n, correspondant à la rupture d'une liaison « (RO₃P)O-C_{5'} », sont aussi observés.

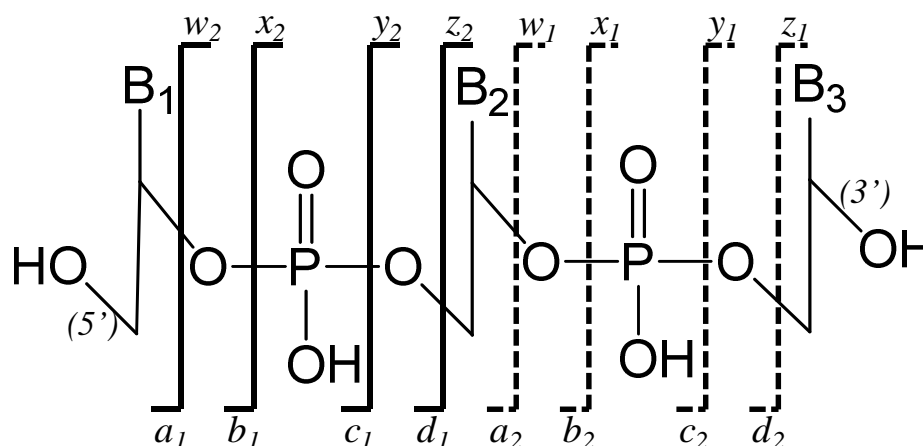


Figure 5-2. Voies de fragmentation séquentielles d'un tri-nucléotide selon la nomenclature de McLuckey *et al.*²⁵. Le groupement B_n correspond à la base nucléotidique du n-ième nucléotide.

Les voies de dissociations des oligonucléotides en phase gazeuse sont aussi dépendantes de la nature des bases nucléiques les composant. De nombreux mécanismes expliquant la formation des ions fragments issus d'une population d'oligonucléotides positivement chargée ont été proposés dans la littérature^{26,27,28,29,30,31,32}. Dans la majorité des mécanismes proposés, les pertes de base nucléique protonée initient la fragmentation du squelette oligonucléotidique. En effet, les bases nucléiques sont des bons nucléofuges (ou groupes partants) ; elles peuvent donc être perdues sous forme de molécules dont la

²⁶ M. T. Rodgers, S. Campbell, E. M. Marzluff, J. L. Beauchamp ; Site-specific protonation directs low-energy dissociation pathways of dinucleotides in the gas phase. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1995**, *148*, 1-23.

²⁷ J. Ni, M. A. A. Mathews, J. A. McCloskey ; Collision-induced dissociation of polyprotonated oligonucleotides produced by electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, *11*, 535-540.

²⁸ P. Wang, M. G. Bartlett, L. B. Martin ; Electrospray collision-induced dissociation mass spectra of positively charged oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, *11*, 846-856.

²⁹ A. Weimann, P. Iannitti-Tito, M. M. Sheil ; Characterisation of product ions in high-energy tandem mass spectra of protonated oligonucleotides formed by electrospray ionization. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, *194*, 269-288.

³⁰ A. K. Vrkic, R. A. J. O'Hair, S. Foote, G. E. Reid ; Fragmentation reactions of all 64 protonated trimer oligodeoxynucleotides and 16 mixed base tetramer oligodeoxynucleotides via tandem mass spectrometry in an ion trap. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, *194*, 145-164.

³¹ K. Hakansson, R. R. Hudgins, A. G. Marshall, R. A. J. O'Hair ; Electron Capture Dissociation and Infrared Multiphoton Dissociation of Oligodeoxynucleotide Dications. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2003**, *14*, 23-41.

³² J. Wu, S. A. McLuckey ; Gas-phase fragmentation of oligonucleotide ions. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2004**, *237*, 197-241.

basicité en phase gazeuse est suffisante pour se protoner à nouveau via un complexe ion-molécule. Les bases nucléiques peuvent donc être perdues neutres ou chargées. Ainsi, la probabilité d'observer des fragments de séquences augmente avec la basicité en phase gazeuse de la base nucléique la plus proche. Des échelles de basicité en phase gazeuses des bases nucléiques sont rappelées :

- (i) Gua > Cyt > Ade >> Thy,³³ pour des bases nucléiques seules,
- (ii) dGuo > dAdo > dCyd > Thd,³⁴ pour des désoxynucléosides et,
- (iii) dAMP > dGMP > dCMP > TMP,³⁵ pour des désoxynucléotides.

D'autres mécanismes expliquant la formation des ions fragments issus d'une population d'ions négativement chargés ont été proposés dans la littérature^{32,36,37,38,39,40,41,42}.

³³ N. Russo, M. Toscano, A. Grand, F. Jolibois ; Protonation of thymine, cytosine, adenine, and guanine DNA nucleic acid bases: Theoretical investigation into the framework of density functional theory. *J. Comput. Chem.*, **1998**, *19*, 989-1000.

³⁴ F. Greco, A. Liguori, G. Sindona, N. Uccella ; Gas-phase proton affinity of deoxyribonucleosides and related nucleobases by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 9092-9096.

³⁵ K. B. Green-Church, P. A. Limbach ; Mononucleotide gas-phase proton affinities as determined by the kinetic method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, *11*, 24-32.

³⁶ R. L. Cerny, M. L. Gross, L. Grotjahn ; Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the study of dinucleotides. *Anal. Biochem.*, **1986**, *156*, 424-435.

³⁷ M. T. Rodgers, S. Campbell, E. M. Marzluff, J. L. Beauchamp ; Low- energy collision-induced dissociation of deprotonated dinucleotides : determination of the energetically favored dissociation pathways and the relative acidities of the nucleic acid bases. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1994**, *137*, 121-149.

³⁸ S. A. McLuckey, G. Vaidyanathan, S. Habibi-Goudarzi ; Charged vs. neutral nucleobase loss from multiply charged oligoribonucleotide anions. *J. Mass Spectrom.*, **1995**, *30*, 1222-1229.

³⁹ S. Habibi-Goudarzi, S. A. McLuckey ; Ion trap collisional activation of the deprotonated deoxymononucleoside and deoxydinucleoside monophosphates. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1995**, *6*, 102-113.

⁴⁰ S. A. McLuckey, G. Vaidyanathan ; Charge state effects in the decompositions of single-nucleobase oligonucleotide polyanions. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1997**, *162*, 1-16.

⁴¹ D. Balbeur, D. Dehareng, E. De Pauw ; Identification of Fragmentation Channels of Dinucleotides Using Deuterium Labeling. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, *21*, 23-33.

⁴² A. De Nino, A. Liguori, L. M. T. Marino, A. Procopio, G. Sindona ; Participation of the nucleobases in the regioselective backbone fragmentation of nucleic acids. A molecular dynamics and tandem mass spectrometric investigation on a model dinucleoside phosphotriester. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1997**, *8*, 1257-1261.

II. Fragmentations des complexes biologiques « par chauffage »

II. 1. Comportement des complexes « peptide/oligonucléotide »

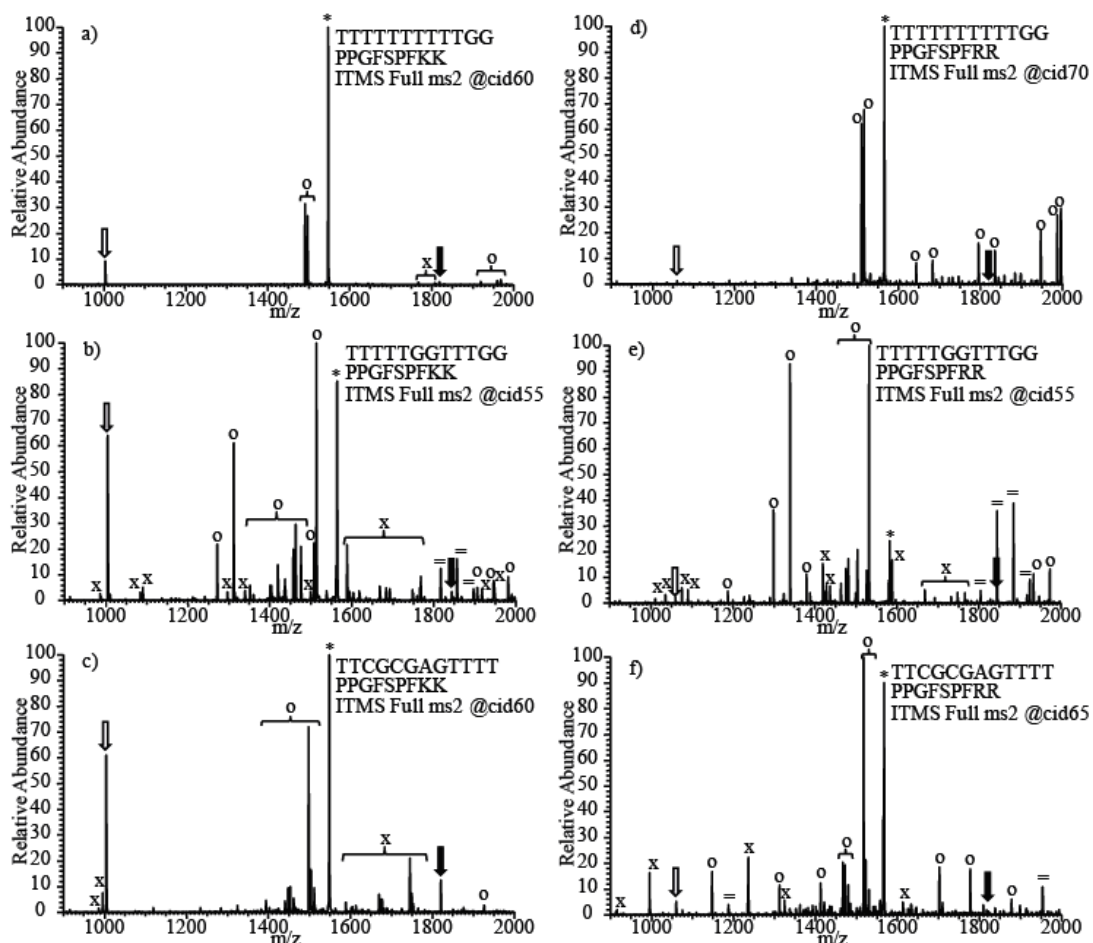


Figure 5-3. Spectres CID des complexes « peptide/oligonucléotide » triplement protonés $[(-KK) + (DNA) + 3H]^{3+}$ formés avec les oligonucléotides de séquence **(a)** $T_{10}G_2$, **(b)** $T_5G_2T_3G_2$, **(c)** $T_2(CG)_2AGT_4$, et des complexes « peptide/oligonucléotide » triplement protonés $[(-RR) + (DNA) + 3H]^{3+}$ formés avec les oligonucléotides de séquence **(a)** $T_{10}G_2$, **(b)** $T_5G_2T_3G_2$, **(c)** $T_2(CG)_2AGT_4$. Les ions précurseurs sont marqués d'une étoile « * ». Les flèches blanches (« \Rightarrow »), les flèches noires (« \rightarrow ») et les croix (« X ») marquent les ions fragments résultants de la rupture des NCI et correspondent respectivement au peptide simplement protoné, à l'oligonucléotide doublement protoné et à des ions fragments d'ADN résultants de dissociations consécutives. Les cercles (« O ») et les signes égaux (« = ») marquent les ions fragments résultants de la dissociation de l'oligonucléotide sans rupture de NCI. Les accolades sont utilisées pour les annotations communes de pics. **Conditions expérimentales.** Mélange équimolaire ADN/peptide. Concentration monomères : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : CID. Fenêtre d'isolation : 2 (u.a.). q_z d'activation : 0,250. Energie de collision normalisée : variable. Temps d'activation : 1,5 ms. **Analyseur des ions produits.** LTQ.

Les spectres de masses obtenus par ESI en mode positif à partir de mélanges peptide/oligonucléotide ont montré différents états de charge (i) des monomères (peptide et oligonucléotides) et (ii) des NCX peptide/oligonucléotide. La **Figure 5-3** présente les spectres CID de NCX triplement protonés (espèces les plus abondantes) formé par ESI en mode positif entre les peptides basiques **-KK** (**Figures 5-3a, 5-3b et 5-3c**) ou avec **-RR** (**Figures 5-3d, 5-3e et 5-3f**), respectivement de séquence PPGFSPFKK et PPGFSPFKK, et différents oligonucléotides, respectivement de séquence T₁₀G₂, T₅G₂T₃G₂ et T₂(CG)₂AGT₄.

II. 1. a. Influence de la basicité en phase gazeuse du peptide

La comparaison des spectres CID de NCX composés d'oligonucléotides de même séquence mais de peptides variant uniquement par leur basicité en phase gazeuse (*i.e.*, la valeur de GB de **-RR** est plus haute que celle de **-KK**)^{43,44} a mis en évidence deux types majoritaires de voies de fragmentation des NCX : (i) les voies de fragmentations engendrant la dissociation du NCX par rupture des NCI et (ii) les voies de fragmentations engendrant la dissociation du NCX par rupture de liaisons covalentes de l'oligonucléotide mais préservant des NCI. Par exemple, l'ion précurseur [**(-KK)** + T₂(CG)₂AGT₄ + 3H]³⁺ (marqué d'une étoile à m/z 1548,2 ; **Figure 5-3c**) se dissocie principalement par la rupture des NCI. Le peptide simplement protoné (marqué d'une flèche blanche à m/z 1004,6 ; **Figure 5-3c**), l'oligonucléotide doublement protoné (marqué d'une flèche noire à m/z 1821,3 ; **Figure 5-3c**) et, des séries d'ions fragments (a_i-B_i) et (w_i) simplement chargés (marqués d'une croix ; **Figure 5-3c, Table S3** de l'**Annexe 2**) sont majoritairement détectés. Réciproquement, l'ion précurseur [**(-RR)** + T₂(CG)₂AGT₄ + 3H]³⁺ (marqué d'une étoile à m/z 1566,8 ; **Figure 5-3f**) se dissocie principalement par la rupture de liaisons covalentes de l'oligonucléotide avec préservation de NCI engendrant des ions fragments non-covalents (marqués d'un cercle ou d'un signe égal ; **Figure 5-3f** , **Table S3** de l'**Annexe 2**). Ces expériences CID ont démontré la plus grande stabilité en

⁴³ a) Z. C. Wu, C. Fenselau ; Proton Affinities of Polyglycines Assessed By Using the Kinetic Method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, 3, 863-866. b) Z. C. Wu, C. Fenselau ; Structural Determinants of Gas Phase Basicities of Peptides. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 9197-9206.

⁴⁴ a) X. Li, A. G. Harrison ; A kinetic approach to the proton affinities of amine bases. *Org. Mass Spectrom.*, **1993**, 28, 366. b) A. G. Harrison ; The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acids and Peptides. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, 16, 201-217.

phase gazeuse des NCX impliquant des résidus d'arginine plus basiques (i.e., le peptide –**RR**) par rapport à ceux contenant des résidus de lysine (i.e., le peptide –**KK**) en interaction avec l'oligonucléotide. De telles voies de fragmentation avait été rapportées, dans de précédentes études de notre laboratoire, pour des complexes peptide/ADN multi-déprotonés analogues^{45,46}, où la grande stabilisation des NCX induite par la présence de résidus d'arginine avait aussi été soulignée.

L'augmentation de la production d'ions fragments non-covalents (marqués d'un cercle ou d'un signe égal ; **Figure 5-3**, **Tables S1**, **S2** et **S3** de l'**Annexe 2**) constatée pour des peptides contenant des résidus d'arginine reflète le renforcement des interactions de type pont salin (impliquant le site protoné de plus grande valeur de GB) qui assure la stabilité du complexe peptide/oligonucléotide multi-protoné. Dans la littérature, la stabilité accrue de NCX impliquant des résidus peptidiques de plus grande basicité en phase gazeuse a été décrite pour des complexes peptide/oligonucléotide^[SA] et des complexes polyamines/oligonucléotide⁴⁷ multi-déprotonés et pour des complexes peptide/peptide^{48,49} positivement chargés. La principale différence entre les expériences CID réalisées sur les ions NCX peptide/oligonucléotides multi-protonés (**Figure 5-3**) et leurs analogues multi-déprotonés^{45,46} est une fragmentation préférentielle des oligonucléotides observée en mode positif.

II. 1. b. Influence de la séquence de l'oligonucléotide

Les oligonucléotides utilisés pour ces études ne diffèrent que par leurs séquences. Dans leurs états multichargés, ils sont donc caractérisés par différentes valeurs de $\Delta G^{\circ}_{app}(acid)$. Par conséquent, la stabilité des interactions de type pont salin, qui est dépendante de la charge du système, diffère elle-aussi ; une grande stabilité des NCI est

⁴⁵ S. Alves, A. Woods, J.-C. Tabet ; Charge State Effect on the Zwitterion Influence on Stability of Non-covalent Interaction of Single-stranded DNA with Peptides. *J. Mass Spectrom.*, **2007**, *42*, 1613-1622.

⁴⁶ S. Alves, A. Woods, A. Delvolve, J.-C. Tabet. Influence of Salt Bridges Interactions on the Gas-phase Stability of DNA/Peptide Complexes. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2008**, *278*, 122-128.

⁴⁷ P. Terrier, J. Tortajada, G. Zin, W. Buchmann ; Noncovalent Complexes Between DNA and Basic Polypeptides or Polyamines by MALDI-TOF. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1977-1989.

⁴⁸ A. S. Woods, K. Fuhrer, M. Gonin, T. Egan, M. Ugarov, K. J. Gillig, J. A. Schultz ; Angiotensin II–Acetylcholine Non-covalent Complexes Analyzed With MALDI– Ion Mobility–TOF MS. *Journal of Biomolecular Techniques* **2003**, *14*, 1-8.

⁴⁹ A. S. Woods, M. A. Huestis ; A Study of Peptide–Peptide Interaction by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 88-96.

observée pour les NCX impliquant un oligonucléotide riche en résidus thymines, *e.g.* les ions précurseurs $[(-RR) + T_{10}G_2 + 3H]^{3+}$ (**Figure 5-3d**). Les oligonucléotides multichargés sont aussi caractérisés par différentes valeurs de GB_{app} . Par conséquent, les voies de fragmentation empruntées par ces derniers sont différentes.

Dans notre étude, l'excès de charges positives favorise la protonation des bases nucléiques et, par conséquent, la fragmentation du squelette oligonucléotidique sans rupture des NCI stabilisant le complexe. Les ions fragments non-covalents les plus abondants correspondent à des ruptures de liaisons covalentes du squelette oligonucléotidique initiées par la perte de bases nucléiques protonées les plus basiques en phase gazeuse (*i.e.*, Gua > Cyt > Ade). Tous les NCX triplement protonés contenant le peptide -RR se sont dissociés préférentiellement en des séries d'ions fragments non-covalents simplement ou doublement chargés de types $[(\text{Peptide}) + (d_i) + nH]^{n+}$, $[(\text{Peptide}) + (a_i-B_i) + nH]^{n+}$ et $[(\text{Peptide}) + (w_j) + nH]^{n+}$. Les ions fragments oligonucléotidiques (toujours en interaction avec le peptide) composant les ions fragments non-covalents étaient systématiquement composés de Thy, *e.g.* l'ion fragment non-covalent $[(-RR) + (d_{10}-T) + 2H]^{2+}$ (marqué d'un cercle à m/z 1997,0 ; **Figure 5-3d**, **Table S1** de l'**Annexe 2**) pour le NCX impliquant le brin $T_{10}G_2$, les ions fragments non-covalents $[(-RR) + (d_5) + 2H]^{2+}$ et $[-RR + (a_6-G) + 2H]^{2+}$ (marqués d'un cercle respectivement à m/z 1299,9 et à m/z 1339,9 ; **Figure 5-3e**, **Table S2** de l'**Annexe 2**) pour le NCX impliquant le brin $T_5G_2T_3G_2$ et, les ions fragments non-covalents $[(-RR) + (w_4) + 2H]^{2+}$ et $[(-RR) + (w_6) + 2H]^{2+}$ (marqués d'un cercle respectivement à m/z 1147,9 et à m/z 1468,9 ; **Figure 5-3f**, **Table S3** de l'**Annexe 2**) pour le NCX impliquant le brin $T_2(CG)_2AGT_4$.

Étonnamment, aucune fragmentation du squelette peptique conservant les NCI n'a été observée en mode positif, alors que la perte d'un motif PP a été rapportée pour des complexes analogues étudiés en mode négatif ^[SA]. Une telle perte inattendue dans un NCX peptide/oligonucléotide en mode négatif a été expliquée par la présence de protons sur le NCX négativement chargé montrant l'existence de structures zwitterioniques. Comme l'excès de protons en mode positif est supposé charger préférentiellement les résidus les plus basiques localisés sur le peptide (*e.g.* les résidus d'arginine et de proline

pour le peptide –RR), l'absence de fragmentation peptidique suggère que les charges portées par le peptide sont sûrement engagées dans des interactions de type pont salin avec les sites très acides de l'oligonucléotide. Par conséquent, les charges positives localisées sur les bases nucléiques protonées sont les seules charges libres pour induire les fragmentations du squelette oligonucléotidique engendrant les nombreux ions fragments non-covalents contenant un peptide intact observés (**Figure 5-3d**, **5-3e** et **5-3f**).

Ces résultats confirment que la stabilité des NCX peptide/oligonucléotide est assurée par des interactions de type pont salin stables impliquant préférentiellement le site déprotoné le plus acide localisé sur l'oligonucléotide (*i.e.*, le groupement phosphate des résidus de phospho-thymidines) et le site protoné le plus basique localisé sur le peptide (*i.e.*, le groupement guanidinium des résidus d'arginine) *via* des interactions ion-ion.

II. 1. c. Localisation des interactions ioniques *via* la production d'ions fragments non-covalents « à trois corps »

Des preuves d'intérêt de la position des NCI ont été obtenues de la clarification d'une attribution de pic ambiguë permise par la détection à haute résolution (Orbitrap). La **Figure 5-4** présente les spectres CID du NCX triplement protoné $[(-RR) + (T_5G_2T_3G_2) + 3H]^{3+}$ détecté dans l'analyseur à haute résolution (Orbitrap ; **Figure 5-4a**) et dans l'analyseur à basse résolution (LTQ ; **Figure 5-4b**), élargis et centrés sur le pic à m/z 1844,8. A partir du spectre CID à basse résolution (**Figure 5-4b**), ce pic a été attribué à l'oligonucléotide doublement protoné $[(T_5G_2T_3G_2) + 2H]^{2+}$; $(m/z)_m$ 1844,3 et $(m/z)_{avg}$ 1845,2) produit par rupture des NCI. En fait, la détection à haute résolution a révélé une valeur de $(m/z)_m$ de 1844,97 (**Table S2** de l'**Annexe 2**) *i.e.*, un ion fragment obtenu par la perte absolue de 1058,24 Da à partir de l'ion précurseur. Cette perte de 1058,24 Da correspond à la rupture de multiples liaisons covalentes de l'oligonucléotide avec la conservation de suffisamment de NCI pour maintenir la cohésion des différents fragments *i.e.*, les deux ions fragments non-covalents isomères $[(-RR) + (a_6-G) + (w_5_d_{10}) + 2H]^{2+}$ et/ou $[(-RR) + (d_5) + (w_5_a_{11}-G) + 2H]^{2+}$ correspondant à la perte d'un

fragment interne et d'un fragment terminal de l'oligonucléotide, respectivement des fragments $[(w_6_a_7) + (Gua) + (z_2)]$ and $[(z_7_a_7) + (w_1) + (Gua)]$.

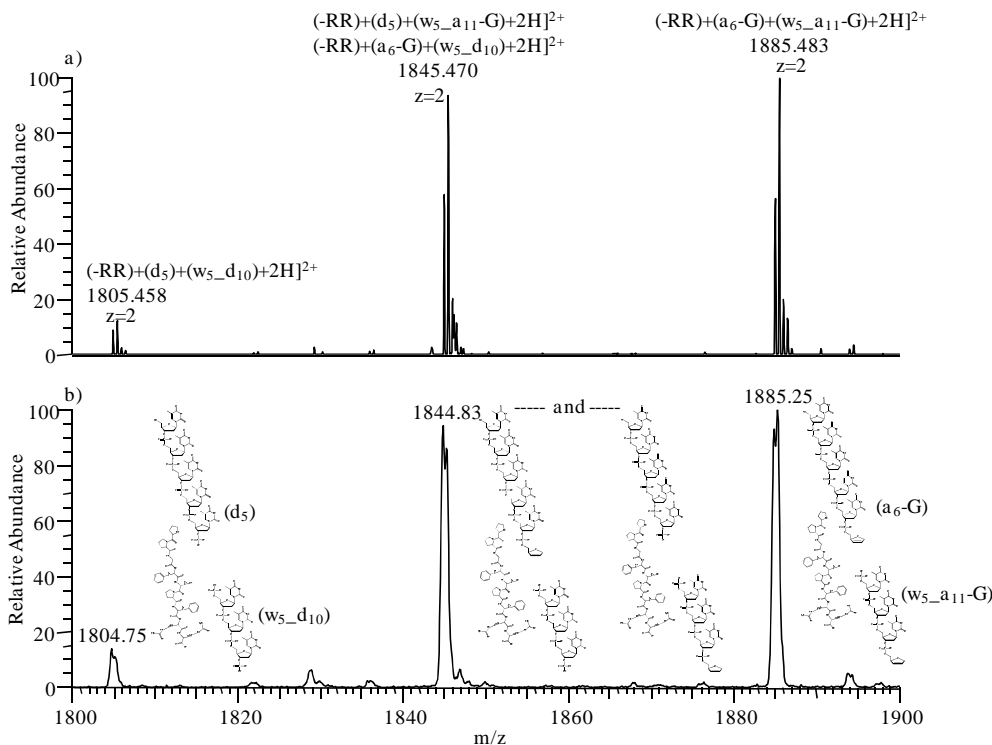


Figure 5-4. Spectre de masse CID du complexe peptide/oligonucléotide triplement protoné $[(-RR) + (T_5G_2T_3G_2) + 3H]^{3+}$ zoomé et centré sur m/z 1850 **(a)** détecté dans l'analyseur à haute résolution (Orbitrap) et **(b)** détecté dans l'analyseur à basse résolution (LTQ). **Conditions expérimentales.** Mélange équimolaire ADN/peptide. Concentration monomères : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; $\text{pH} \approx 7$). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : CID. Fenêtre d'isolation : 2 (u.a.). q_z d'activation : 0,250. Energie de collision normalisée : 55%. Temps d'activation : 1,5 ms.

L'attribution de ce pic a été confirmée par les pics observés aux alentours à plus et moins 80,01 Da, qui peuvent aussi être attribués à des pertes analogues de plusieurs groupements oligonucléotidiques, respectivement aux ions fragments non-covalents $[(-RR) + (a_6-G) + (w_5_a_{11}-G) + 2H]^{2+}$ à $(m/z)_m$ 1884,98 (**Table S2** de l'**Annexe 2**) et $[(-RR) + (d_5) + (w_5_d_{10}) + 2H]^{2+}$ à $(m/z)_m$ 1804,96 (**Table S2** de l'**Annexe 2**). L'observation de telles dissociations multiples du squelette de l'oligonucléotide implique que chaque fragment du brin d'ADN reste encore lié au peptide par des NCI *i.e.*, au moins deux NCI fortes. Comme les ions fragments non-covalents plus communs (*i.e.*, un seul ion fragment oligonucléotidique en interaction avec un ion peptidique), ces ions fragments non-

covalents « à trois corps » sont principalement composés d'unités phospho-thymidines impliquant certainement des interactions de type pont salin très fortes avec les peptides très basiques.

II. 1. d. Influence de la taille du peptide sur la production d'ions fragments non-covalents « à trois corps »

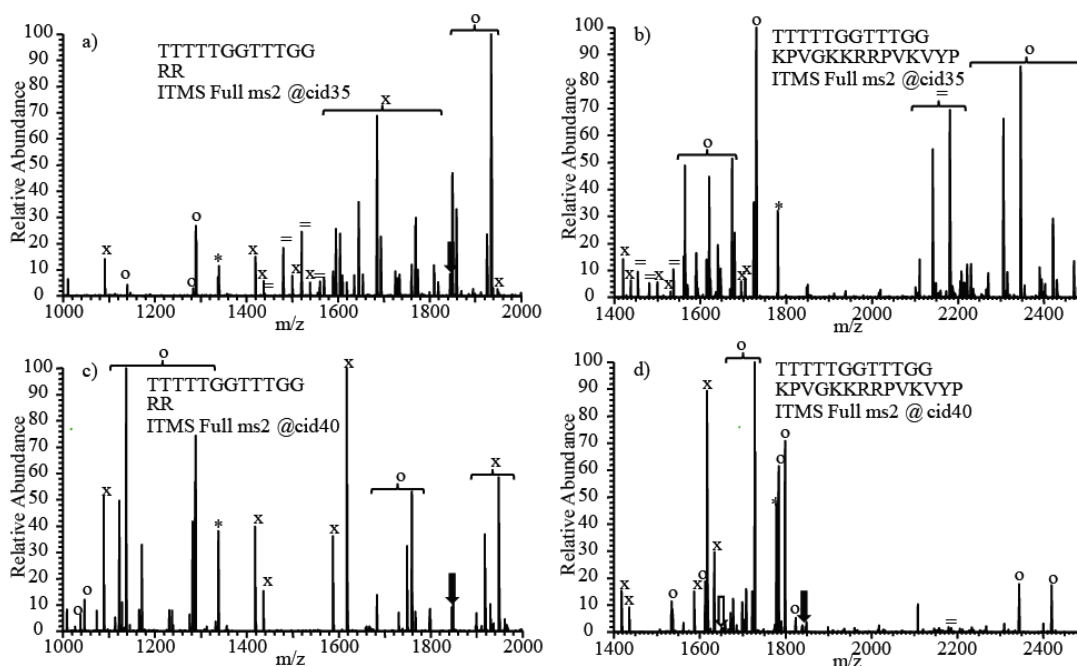


Figure 5-5. Spectres de masse CID des complexes « peptide/oligonucléotide » triplement protonés [(Peptide) + (T₅G₂T₃G₂) + 3H]³⁺ formés avec (a) le dipeptide RR ou (b) le fragment 11-24 d'ACTH (de séquence KPVGKKRRPVKVYP) et des complexes analogues triplement déprotonés [(Peptide) + (T₅G₂T₃G₂) + 3H]³⁺ formés avec (c) le dipeptide RR ou (d) le fragment 11-24 d'ACTH. Les ions précurseurs sont marqués d'une étoile « * ». Les flèches blanches (« ⇔ »), les flèches noires (« → ») et les croix (« X ») marquent les ions fragments résultant de la rupture des NCI et correspondent respectivement au peptide simplement protoné, à l'oligonucléotide doublement protoné et à des ions fragments d'ADN résultant de dissociations consécutives. Les cercles (« O ») et les signes égaux (« = ») marquent les ions fragments résultant de la dissociation de l'oligonucléotide sans rupture des NCI. Les accolades sont utilisées pour les annotations communes de pics. **Conditions expérimentales.** Mélange équimolaire ADN/peptide. Concentration monomères : 5 μmol/L. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH ≈ 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) et ESI(-) par infusion. Débit liquide : 5 μL/min. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : CID. Fenêtre d'isolation : 2 (u.a.). q_z d'activation : 0,250. Énergie de collision normalisée : variable. Temps d'activation : 1,5 ms. **Analyseur.** Orbitrap.

La **Figure 5-5** présente les spectres CID de NCX triplement protonés et triplement déprotonés respectivement formés par ESI en mode positif et en mode négatif

entre l'oligonucléotide de séquence T₅G₂T₃G₂ et différents peptides basiques contenant deux résidus d'arginine consécutifs *i.e.*, le dipeptide **RR** et le fragment **11-24** d'ACTH (de séquence KPVGKKRRVKVYP). Ces peptides ont été choisis pour mettre en évidence l'influence de la taille du peptide sur la production éventuelle d'ions fragments non-covalents lors d'expériences CID. Le fragment de bradykinine modifié **-RR** (9 résidus) et le dipeptide **RR** ne diffèrent que par le nombre de résidus espaçant les sites de protonation préférentielle (*i.e.*, le groupement N-terminal et les deux résidus d'arginine consécutifs) permettant l'établissement d'interactions de type ion-ion avec les sites déprotonés de l'oligonucléotide. D'autre part, le fragment **11-24** d'ACTH (plus long ; 14 résidus) propose plus de sites basiques répartis sur toute sa longueur pour éventuellement établir plus d'interactions de type ion-ion avec l'oligonucléotide. Indépendamment de la séquence ou de la longueur du peptide, les spectres CID des NCX triplement protonés [(**Peptide**) + (T₅G₂T₃G₂) + 3H]³⁺ ont tous montré des ions fragments non-covalents « à trois corps » (marqués d'un signe égal ; **Figure 5-5, Tables S4 et S5 de l'Annexe 2**). Curieusement, même les ions NCX impliquant le dipeptide **RR** interagissent fortement avec l'oligonucléotide, *via* (au moins) deux NCI fortes, et mènent à la production d'ions fragments non-covalents « à trois corps » contenant le peptide et une majorité de résidus phospho-thymidines, *e.g.* l'ion [(**RR**) + (d₅) + (w₅_d₁₀) + 2H]²⁺ (marqués d'un signe égal à m/z 1440,29 ; **Figure 5-5a, Table S4 de l'Annexe 2**). La plus grande abondance d'ions fragments non-covalents (notamment ceux « à trois corps » marqués d'un signe égal ; **Figure 5-5b, Table S5 de l'Annexe 2**) constatée sur les spectres de masse CID de NCX impliquant le fragment **11-24** d'ACTH reflète le renforcement des interactions de type pont salin pour ce peptide plus long et ayant un plus grand nombre de résidus basiques. De plus, la perte de multiples fragments de l'oligonucléotide engendrant des ions fragments non-covalents « à trois corps », *e.g.* les ions [(**11-24**) + (a₆-G) + (w₅_a₁₁-G) - 3H]³⁻ (marqués d'un signe égal à (m/z)_{mono} 2178,69 ; **Figure 5-5d, Table S5 de l'Annexe 2**), ont aussi été détectés pour des NCX (très stables) négativement chargés *i.e.*, les ions précurseurs [(**11-24**) + (T₅G₂T₃G₂) - 3H]³⁻, mais restent bien moins abondants que leurs analogues positivement chargés.

II. 1. e. Influence de l'état de charge du complexe sur la production d'ions fragments non-covalents « à trois corps »

Des expériences CID additionnelles réalisées sur des NCX analogues portant une charge négative supplémentaire *i.e.*, les ions précurseurs [(11-24) + (T₅G₂T₃G₂) - 4H]⁴⁻, n'ont montré aucun ion fragment « à trois corps » mais des séries d'ions fragments non-covalents « communs » analogues à ceux observés pour l'ion précurseur [(11-24) + (T₅G₂T₃G₂) - 3H]³⁻ (Tables S6 et S5 de l'Annexe 2). Réciproquement, les expériences CID réalisées sur les ions précurseurs [(11-24) + (T₅G₂T₃G₂) + 4H]⁴⁺ ont montré des séries d'ions fragments non-covalents identiques à celles obtenues pour les ions précurseurs [(11-24) + (T₅G₂T₃G₂) + 3H]³⁺ avec une plus grande abondance des ions fragments non-covalents « à trois corps » (Tables S6 et S5 de l'Annexe 2). Ces expériences montrent la préservation de NCI stables en présence d'un excès de protons et la déstabilisation de ces mêmes NCI lorsque les protons sont plus rares. De plus, les nombreuses fragmentations de l'oligonucléotide sans aucune fragmentation du peptide impliquent que l'excès de protons en mode positif est localisé sur les bases nucléiques. Par conséquent, nous proposons que, indépendamment de la polarité d'ionisation, les ions fragments non-covalents « à trois corps » proviennent de mécanismes de dissociation similaires impliquant la protonation des bases nucléiques qui est bien plus favorisée en mode positif qu'en mode négatif.

II. 1. f. Conclusion

Ainsi, indépendamment de leurs abondances relatives, des séries d'ions fragments quasiment identiques sont observées à partir d'ions NCX produits par ESI en mode positif et en mode négatif. Toutes ces observations expérimentales démontrent la présence d'interactions ion-ion extrêmement fortes, donc de type pont salin, indépendamment de la polarité d'ionisation mais, surtout, localisées aux mêmes positions *i.e.*, entre les résidus d'arginine (sites les plus basiques) et les résidus de phosphothymidines (sites les plus acides).

II. 2. Comportement des complexes « peptide/duplex »

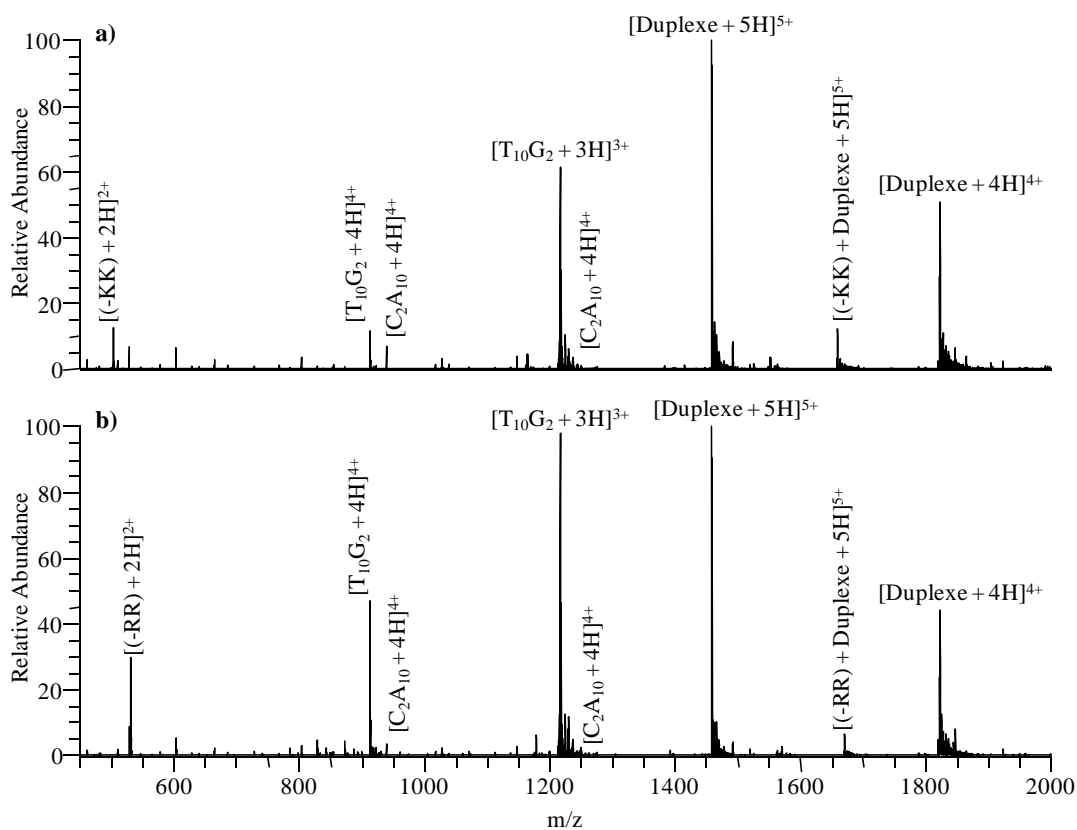


Figure 5-6. Spectres de masse d'un mélange équimolaire duplex d'ADN/peptide, respectivement $T_{10}G_2/C_2A_{10}$ et (a) le peptide $-KK$ ou (b) le peptide $-RR$ formés par ESI en mode positif. **Conditions expérimentales.** Mélange équimolaire ADN/peptide. Concentration monomères : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Analyseur.** Orbitrap.

Les spectres de masses obtenus par ESI en mode positif à partir de mélanges équimolaires duplex d'ADN/peptide, respectivement le duplex de séquences $T_{10}G_2/C_2A_{10}$ et, les peptides basiques $-KK$ (Figure 5-6a) ou $-RR$ (Figure 5-6b), ont montré différents états de charge des monomères (peptide, duplex et oligonucléotides) et des oligonucléotides résultant de la dissociation en source de duplex d'ADN moins spécifiques. Seule une faible abondance d'ions NCX « peptide/duplex » sous un seul état de charge ($z = 5$) a été détectée. La Figure 5-7 présente les spectres de masse CID de ces NCX « peptide/duplexe » multiprotonés impliquant le peptide $-KK$ (Figures 5-6a) ou avec $-RR$ (Figures 5-6b).

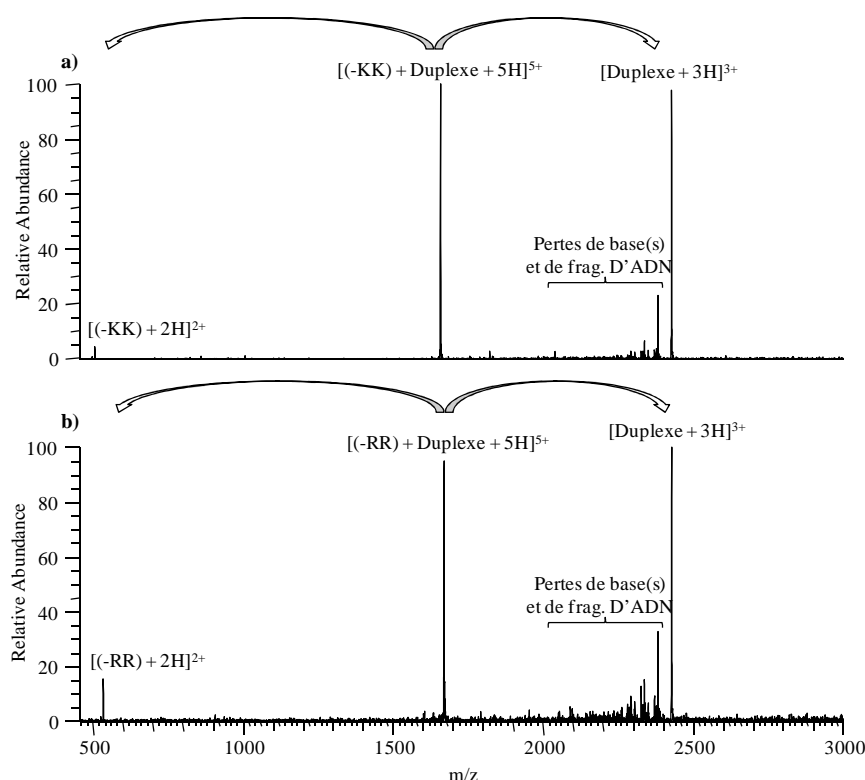


Figure 5-7. Spectres CID des complexes « peptide/duplex » multiprotonés, formés à partir des peptides (a) (-KK) ou (b) (-RR) et des oligonucléotides, respectivement de séquence T₁₀G₂ et C₂A₁₀. Les flèches courbées représentent les voies de dissociation du complexe par rupture des NCI. Les accolades sont utilisées pour les annotations communes de pics. **Conditions expérimentales.** Mélange équimolaire ADN/peptide. Concentration monomères : 5 µmol/L. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH ≈ 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) et ESI(-) par infusion. Débit liquide : 5 µL/min. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : CID. Fenêtre d'isolation : 3,1 (u.a.). q_z d'activation : 0,250. Energie de collision normalisée : 40%. Temps d'activation : 1,5 ms. **Analyseur des ions produits.** LTQ.

Contrairement aux spectres CID des NCX « peptide/oligonucléotide » analogues (**Figure 5-3**), les spectres CID de NCX multiprotonés ($z = 5$) composés de duplexes d'ADN de mêmes séquences mais de peptide ne différant que par leurs basicités apparentes en phase gazeuse n'ont montré qu'une voie de fragmentation majeure (marquée d'une flèche courbée ; **Figures 5-7a** et **5-7b**) engendrant la dissociation du NCX par rupture des NCI liant le peptide au duplex d'ADN. Ainsi, le peptide doublement protoné (m/z 502,8 et m/z 530,8, respectivement pour les peptides -KK et -RR ; **Figures 5-7a** et **5-7b**), le duplexe triplement protoné (m/z 2426,5 ; **Figures 5-7a** et **5-7b**) et, des séries d'ions fragments issus de pertes de base à partir du duplex d'ADN (m/z 2000 à m/z 2400 ; **Figures 5-7a** et **5-7b**) sont majoritairement détectés. La dissociation préférentielle des

NCI de type pont salin (plus fortes) par rapport aux NCI de types liaison hydrogène et π -stacking (plus faibles) s'explique par le plus grand nombre de NCI stabilisant les duplex d'ADN comparé aux quelques NCI liant le peptide à ces derniers. De par, la présence de protons stabilisant les duplex par des interactions ion-dipôle de type liaison hydrogène, la charge positive portée par une base nucléique (même partiellement masquée) affecte à distance la stabilité de l'interaction ion-ion de type pont salin par un effet de répulsion de charges identiques. Indépendamment de la basicité du peptide, la répartition des charges lors de la dissociation des complexes « peptide/duplex » par rupture des NCI est restée la même. Ce phénomène s'explique par la différence des valeurs de GB_{app} entre les peptides et le duplex d'ADN. Ainsi la valeur de GB_{app} de l'ion $[(Duplex) + 2H]^{2+}$ est (i) proche de la valeur de GB_{app} de l'ion $[(Peptide) + H]^+$ et, (ii) supérieure à la valeur de GB_{app} de l'ion $[(Peptide) + 2H]^{2+}$.

La comparaison des spectres CID des NCX « peptide/duplex » multiprotonés *i.e.*, $[(-KK) + Duplex + 5H]^{5+}$ (m/z 1659,2 ; **Figure 5-7a**) et $[(-RR) + Duplex + 5H]^{5+}$ (m/z 1670,4 ; **Figure 5-7b**), n'a montré que de faibles différences ; un plus grand nombre d'ions fragments (issus du duplex d'ADN) est produit consécutivement à la perte du peptide – **RR**. Ce comportement s'explique par la plus grande énergie d'activation requise pour rompre des NCI de type pont salin impliquant des résidus d'arginine (plus basique en phase gazeuse) qui engendrent des NCI plus forte que les résidus de lysine (moins basique en phase gazeuse). Ainsi l'excès d'énergie interne (ou énergie interne résiduelle) issu de ce processus de dissociation ergodique des ions de NCX « peptide/duplexe » est réparti avec la même probabilité sur chaque oscillateur harmonique des ions fragments, donc majoritairement sur les ions de duplexe d'ADN qui sont composés d'un plus grand nombre d'atomes. Il en résulte la fragmentation consécutive préférentielle des ions de duplex d'ADN par des voies de fragmentations de faible énergie *i.e.*, la perte de bases nucléiques protonées sous forme de molécules. Les bases nucléiques terminales (moins stabilisées par des NCI de type π -stacking) de plus grande valeurs de GB (donc statistiquement plus protonées) sont majoritairement perdues. Ce comportement a, d'ailleurs, été observé pour tous les NCX « peptide/duplex » composés de différentes séquences de duplex et des peptides –**KK** ou –**RR**.

II. 3. Comportement des complexes « peptide/oligonucléotide/peptide »

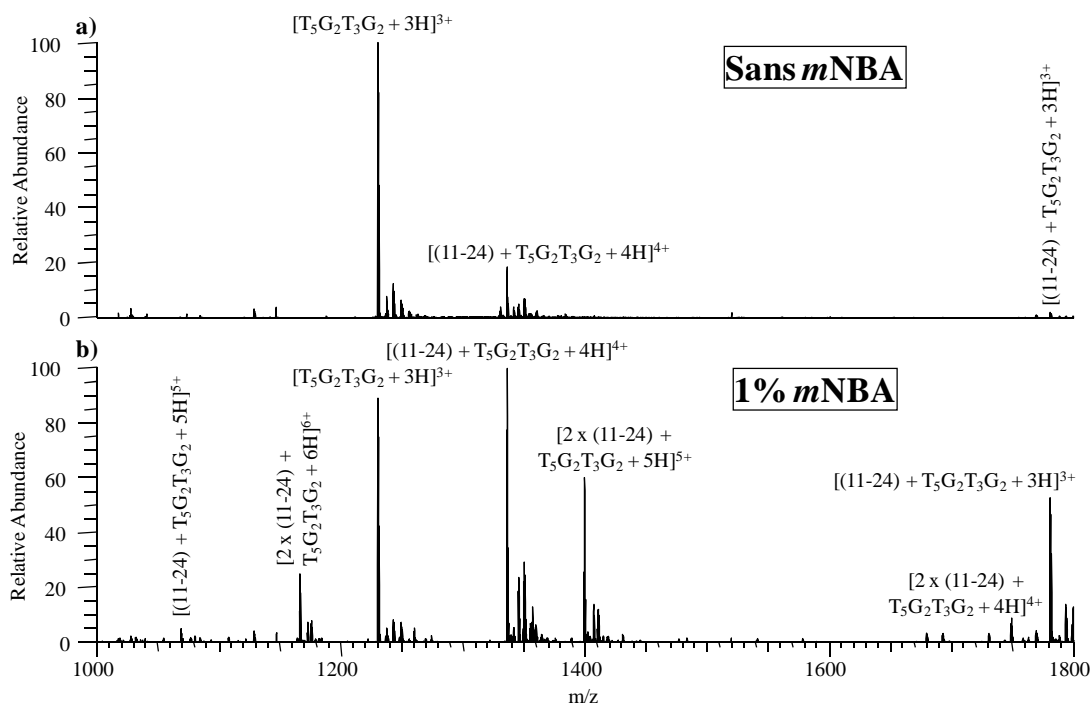


Figure 5-8. Spectres de masse d'un mélange ADN/peptide (1 : 3), respectivement $T_5G_2T_3G_2$ et 11-24, formés par ESI en mode positif (a) en absence et (b) en présence de 1% de *mNBA*. **Conditions expérimentales.** Concentrations : [ADN] = 5 $\mu\text{mol/L}$ et [Peptide] = 15 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol/*mNBA* (v/v/v, 49,5 : 49,5 : 1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Analyseur des ions produits.** Orbitrap.

La comparaison des spectres de masses obtenus par ESI en mode positif à partir d'un mélange peptide/oligonucléotide (3 : 1), respectivement le fragment 11-24 d'ACTH (de séquence KPVGKKRRVKVYP) et l'oligonucléotide de séquence $T_5G_2T_3G_2$ en absence (**Figure 5-8a**) et en présence de *mNBA* (**Figure 5-8b**) a montré l'apparition d'une distribution d'états de charge (de $z = 4$ à $z = 6$) correspondant à un nouveau type de NCX composé de deux peptides liés à l'oligonucléotide par des NCI. La **Figure 5-9** présente les spectres CID de ces NCX « peptide/oligonucléotide/peptide » multiprotonés *i.e.*, des ions $[2 \times (11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 6H]^{6+}$ ($(m/z)_m$ 1165,96 ; **Figure 5-9a**), des ions $[2 \times (11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 5H]^{5+}$ ($(m/z)_m$ 1398,95 ; **Figure 5-9b**) et, des ions $[2 \times (11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 4H]^{4+}$ ($(m/z)_m$ 1748,44 ; **Figure 5-9c**).

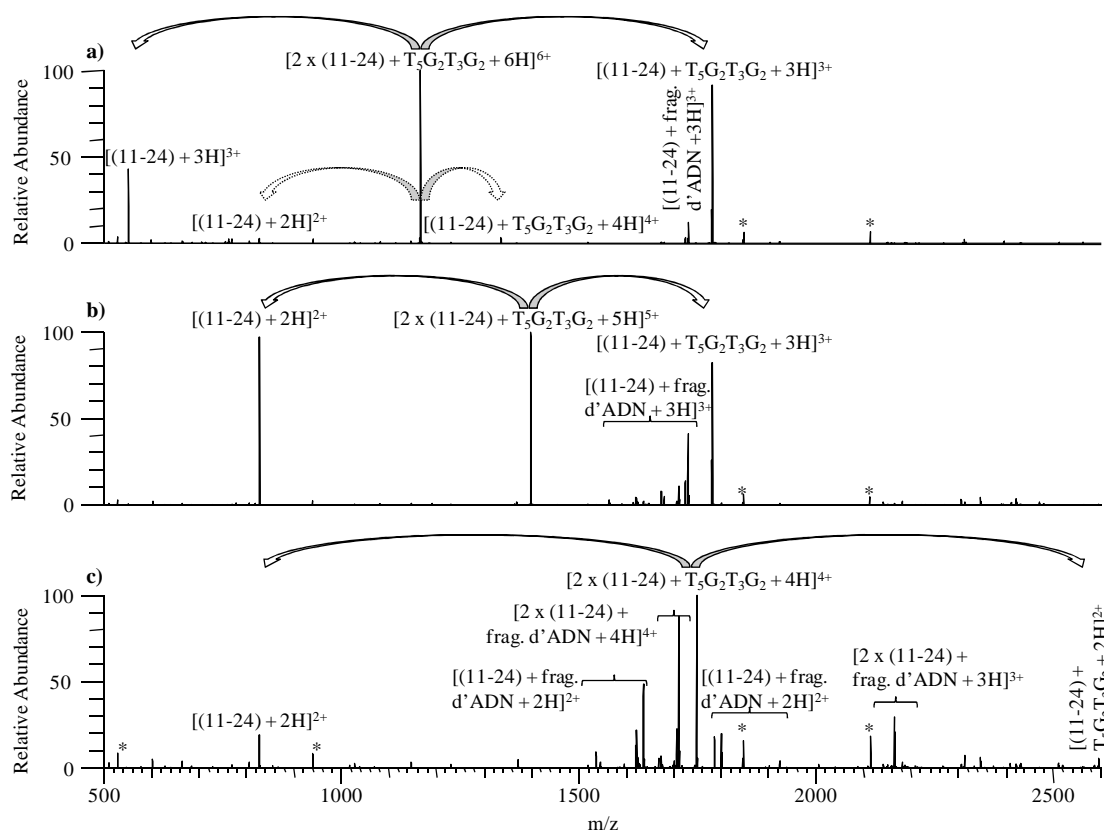


Figure 5-9. Spectres CID des complexes « peptide/oligonucléotide/peptide » multiprotonés, respectivement (a) $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$, (b) $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ et, (c) $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 4H]^{4+}$. Les flèches courbées représentent les voies de dissociation du complexe par rupture des NCI. Les étoiles marquent les signaux « de fréquences parasites » dus au bruit électronique et mécanique de l'instrument. Les accolades sont utilisées pour les annotations communes de pics. **Conditions expérimentales.** Concentrations : [ADN] = 5 $\mu\text{mol/L}$ et [Peptide] = 15 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol/*m*NBA (v/v/v, 49,5 : 49,5 : 1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : CID. Fenêtre d'isolation : 3,1 (u.a.). q_z d'activation : 0,250. Energie de collision normalisée : 45%. Temps d'activation : 1,5 ms. **Analyseur des ions produits.** Orbitrap.

La comparaison des spectres de masse CID des NCX « peptide/oligonucléotide/peptide » multiprotonés a montré une grande dépendance des voies de fragmentation envers l'état de charge de l'ion précurseur (Figure 5-9).

Comportement des ions précurseurs de plus hauts états de charge

L'activation des ions précurseurs les plus chargés (**Figures 5-9a** et **5-9b**) n'a montré qu'une voie de fragmentation majoritaire (marquée d'une flèche courbée dans les **Figures 5-9a** et **5-9b**) engendrant la dissociation du NCX par rupture des NCI liant un peptide à NCX peptide/oligonucléotide. Ainsi, les peptides doublement et triplement protonés ((m/z)_m 826,53 et (m/z)_m 551,36, respectivement pour $z = 2$ et $z = 3$; **Figures 5-9a** et **5-9b**), le complexe peptide/oligonucléotide multiprotoné ((m/z)_m 1780,23 et (m/z)_m 1336,42, respectivement pour $z = 3$ et $z = 4$; **Figures 5-9a** et **5-9b**) et, des d'ions fragments (consécutifs à la rupture des NCX) issus de pertes de base à partir du complexe peptide/oligonucléotide (m/z 1540 à m/z 1740 ; **Figures 5-7a** et **5-7b**) sont majoritairement détectés. La dissociation préférentielle des ions précurseurs par la perte d'un ion peptidique montre que la nature et/ou le nombre des NCI liant les deux peptides à l'oligonucléotide peuvent être différents. Ainsi, les sites les plus basiques du peptide se libérant peuvent être (i) en interaction avec les groupements phosphates (très acides) accessibles de l'oligonucléotide par les mêmes NCI de type pont salin que le peptide fortement lié et/ou, (ii) en interaction avec d'autres sites basiques accessibles, *e.g.* les bases nucléiques les plus basiques de l'oligonucléotide ou les groupements guanidinium et amines libres de l'autre peptide, par des NCI de type liaison hydrogène.

La comparaison des spectres CID des NCX « peptide/oligonucléotide/peptide » multiprotonés *i.e.*, $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$ (**Figure 5-9a**) et $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ (**Figure 5-9b**), a montré des différences sur la répartition des charges sur chacun des partenaires lors de la dissociation des ions précurseurs par rupture des NCI. Comme pour la dissociation des ions de NCX « peptide/duplex » multiprotonés, ce phénomène s'explique par la différence des valeurs de GB_{app} entre le peptide multiprotoné et le NCX « peptide/oligonucléotide » multiprotoné. Ainsi, la dissociation par rupture des NCI des ions précurseurs dont la charge est paire est principalement réalisée par un processus de répartition de charge symétrique. Par exemple, l'activation des ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$ ((m/z)_m 1165,96 ; **Figure 5-9a**) engendre majoritairement les ions fragments $[(11-24) + 3H]^{3+}$ ((m/z)_m 551,36 ; **Figure 5-9a**) et $[(11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 3H]^{3+}$ ((m/z)_m 1780,23 ; **Figure 5-9a**) et minoritairement

les ions fragments $[(11-24) + 2H]^{2+}$ ($(m/z)_m$ 826,53 ; **Figure 5-9a**) et $[(11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 4H]^{4+}$ ($(m/z)_m$ 1336,42 ; **Figure 5-9a**). Réciproquement, la dissociation par rupture des NCI des ions précurseurs dont la charge est impaire est principalement réalisée par un processus de répartition de charge dissymétrique. Par exemple, l'activation des ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ ($(m/z)_m$ 1398,95 ; **Figure 5-9b**) engendre uniquement les ions fragments $[(11-24) + 2H]^{2+}$ ($(m/z)_m$ 826,53 ; **Figure 5-9b**) et $[(11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 3H]^{3+}$ ($(m/z)_m$ 1780,23 ; **Figure 5-9b**) où l'excès de charge est porté par l'ion fragment de plus grande taille comme le montrent les plus nombreuses fragmentations consécutives du duplex d'ADN. D'ailleurs, une dépendance similaire des voies de répartition des charges envers la parité de l'état de charge de l'ion précurseur a été décrite pour des duplex d'ADN multidéprotonés formés par ESI en mode négatif⁵⁰.

Comportement de l'ion précurseur de plus bas état de charge

Contrairement aux spectres CID ions précurseurs de plus hauts états de charges (**Figures 5-9a et 5-9b**), les spectres CID des ions $[2 \times (11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 4H]^{4+}$ (**Figure 5-9c**) présentent des voies de fragmentations engendrant la dissociation du NCX par rupture de liaisons covalentes de l'oligonucléotide mais préservant des NCI supplémentaires aux voies de fragmentations précédemment discutées.

Comme pour les ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$ ($(m/z)_m$ 1165,96 ; **Figure 5-9a**), la dissociation par rupture des NCI des ions précurseurs $[2 \times (11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 4H]^{4+}$ ($(m/z)_m$ 1748,44 ; **Figure 5-9c**) à état de charge paire, engendre majoritairement les ions fragments $[(11-24) + 2H]^{2+}$ ($(m/z)_m$ 826,53 ; **Figure 5-9b**) et $[(11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 2H]^{2+}$ ($(m/z)_m$ 2669,84 ; **Figure 5-9a**) et, des ions fragments (consécutifs à la rupture des NCI à répartition de charges symétriques) issus de pertes de base à partir du complexe peptide/oligonucléotide multiprotoné plus abondants (m/z 1540 à m/z 1740 ; **Figures 5-7a et 5-7b**). L'augmentation de l'abondance des ions fragments consécutifs avec la diminution de l'état de charge de l'ion précurseur s'explique par

⁵⁰ J. A. Madsen, J. S. Brodbelt ; Asymmetric Charge Partitioning upon Dissociation of DNA Duplexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, *21*, 1144-1150.

l'excès d'énergie interne résiduelle des ions fragments qui a pour origine un excès de protons comme pour les NCX « peptide/duplex » multiprotonés.

Il en résulte une plus grande stabilité des NCI impliquant le second peptide, permettant l'observation d'ions fragments non-covalents issus de pertes de base nucléiques à partir de l'ion précurseur (de m/z 1660 à m/z 1740 et de m/z 2120 à m/z 2200, respectivement pour les pertes de bases neutres et les pertes de bases chargées ; **Figure 5-9c**).

III. Fragmentation des complexes biologiques par neutralisation de charge(s)

III. 1. Comportement des complexes « peptide/oligonucléotide »

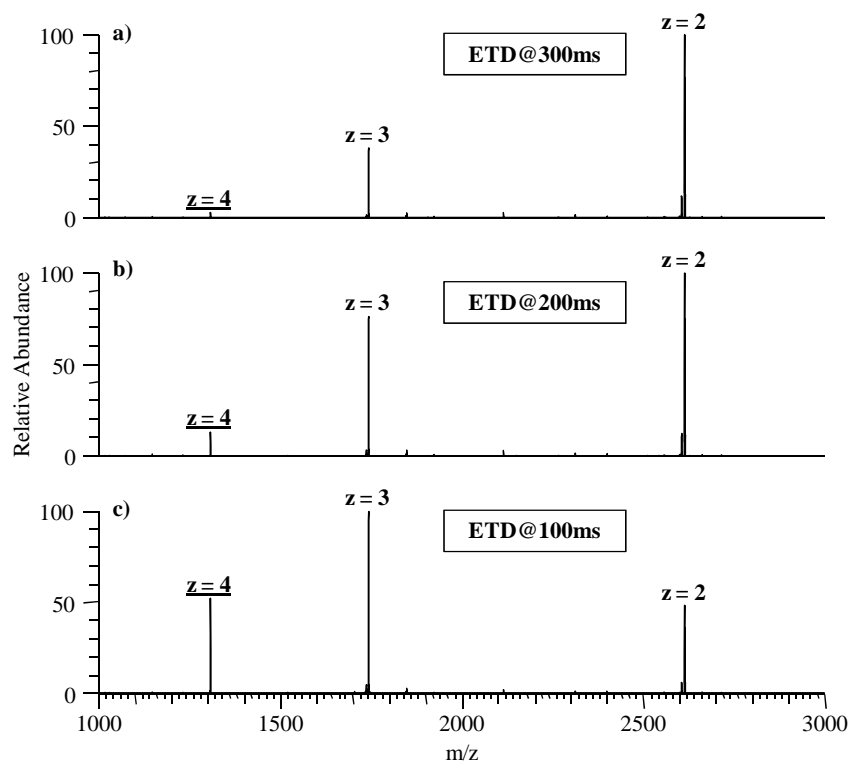


Figure 5-10. Spectres ETD à (a) 300 ms, (b) 200 ms et, (c) 100 ms des complexes « peptide/oligonucléotide » multiprotonés ($z = 4$) formés par ESI en mode positif à partir de l'oligonucléotide de séquence T_6CT_5 et du fragment 11-24 de l'ACTH. **Conditions expérimentales.** Mélange équimolaire ADN/peptide. Concentration monomères : 5 $\mu\text{mol/L}$. Solvant : mélange eau/méthanol (v/v, 1:1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; $\text{pH} \approx 7$). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 $\mu\text{L/min}$. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : ETD. Fenêtre d'isolation : 2 (u.a.). Temps d'activation : variable. **Analyseur des ions produits.** Orbitrap.

La **Figure 5-10** présente les spectres ETD de NCX « peptide/oligonucléotide » multiprotonés ($z = 4$), soumis à l'agent réactif (anion radicalaire de fluoranthène) pendant 300 ms (**Figure 5-10a**), 200 ms (**Figure 5-10b**) ou, 100 ms (**Figure 5-10c**), formés par ESI en mode positif à partir du fragment 11-24 d'ACTH et de l'oligonucléotide de séquence T₆CT₅. Indépendamment du temps de réaction avec l'agent réactif, les ions précurseurs [(11-24) + T₆CT₅ + 4H]⁴⁺ (à (m/z)_m 1306,67 ; **Figure 5-10**) ont capturé un ou plusieurs électrons sans engendrer d'ions fragments de séquence du peptide ou de l'oligonucléotide. Ainsi, des espèces triplement et doublement chargées de la forme [(11-24) + T₆CT₅ + 4H]^{n•(4-n)+} ((m/z)_m 1742,23 et (m/z)_m 2613,34, respectivement pour $n = 1$ et $n = 2$; **Figures 5-10a, 5-10b et 5-10c**) et de la forme [(11-24) + T₆CT₅ + zH]^{z+} ((m/z)_m 1741,89 et (m/z)_m 2612,34, respectivement pour $z = 3$ et $z = 2$; **Figures 5-10a, 5-10b et 5-10c**) issues de perte(s) d'atome(s) d'hydrogène consécutive(s) à la capture d'électron(s) ont été principalement observées. La possibilité de capture multiple d'électrons par les ions précurseurs est permise par la nature des processus d'activation par ETD permettant aux ions de charge réduite de capturer à nouveau un électron.

L'absence de fragmentation de séquence de l'oligonucléotide a aussi été observée lors de l'activation par ETD d'oligonucléotides analogues triplement protonés et a été attribuée à la grande capacité des oligonucléotides à délocaliser un ou plusieurs électrons. Ainsi, lors de l'activation des ions précurseurs [(11-24) + T₆CT₅ + 4H]⁴⁺ ((m/z)_m 1306,67 ; **Figure 5-10**), les agents réactifs s'apparient consécutivement aux sites protonés les plus disponibles *i.e.*, aux bases nucléiques les plus basiques en phase gazeuse, pour transférer un électron qui sera très délocalisé et ne pourra pas induire de fragmentation de séquence. De même, l'absence de fragmentation de séquence du peptide au sein du complexe montre que les sites les plus basiques protonés du peptide ne se sont pas appariés aux agents réactifs et n'ont pu ni capturer d'électron, ni induire la dissociation du peptide.

Outres les pertes d'atomes d'hydrogène, les seuls ions fragments détectés correspondent à la perte d'une molécule d'ammoniac (perte de 17,02 Da), consécutive à la capture d'un ou de deux électrons ((m/z)_m 1736,55 et (m/z)_m 2604,83, respectivement pour $n = 1$ et $n = 2$; **Figures 5-10a, 5-10b et 5-10c**). Cette perte d'une molécule d'ammoniac ne peut pas être issue de la perte de l'amine portée sur la position 4 des résidus de cytosine qui ne

sont pas accessibles énergétiquement et, par conséquent, ne sont pas observés lors de l'activation par ETD de l'oligonucléotide de multiprotoné. La perte d'une molécule d'ammoniac est donc issue de la perte d'une amine portée par le peptide ; cette perte est d'ailleurs observée indépendamment de l'état de charge de l'ion précurseur $[(11-24) + nH]^{n+}$, lors de leur activation par ETD. Cependant, de par la nature distonique des NCX protonés initiant la perte d'une molécule d'ammoniac, cette dernière est issue de processus initiés par la charge mais peut être assistée par la présence du radical. Bien que l'abondance relative des pertes d'une molécule d'ammoniac par rapport à l'abondance du NCX protoné radicalaire de même état de charge soit proportionnelle au nombre d'électrons capturés (5% et 10%, respectivement pour $n = 1$ et $n = 2$ dans les **Figures 5-10a**, **5-10b** et **5-10c**), aucun processus ne peut être désigné comme majoritaire en basant le raisonnement sur deux points *i.e.*, les deux électrons capturés par les ions précurseurs.

III. 2. Comportement des complexes « peptide/oligonucléotide/peptide »

La **Figure 5-11** présente les spectres ETD de NCX « peptide/oligonucléotide/peptide » multiprotonés ($z = 5$), formés par ESI en mode positif à partir du fragment 11-24 d'ACTH et de l'oligonucléotide de séquence T₅G₂T₃G₂, soumis à l'agent réactif (anion radicalaire de fluoranthène) pendant 50 ms (**Figure 5-11a**), 30 ms (**Figure 5-11b**) ou, 10 ms (**Figure 5-11c**), et de complexes analogues ($z = 6$) ayant réagi avec les anions radicalaires de fluoranthène pendant 50 ms (**Figure 5-11d**), 30 ms (**Figure 5-11e**) ou, 10 ms (**Figure 5-11f**). Comme pour les NCX « peptide/oligonucléotide » multiprotonés (**Figure 5-10**), indépendamment du temps de réaction avec l'agent réactif, les ions précurseurs $[2 \times (11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 5H]^{5+}$ ($(m/z)_m$ 1398,95 ; **Figure 5-11a**, **5-11b** et **5-11c**) ont capturé des électrons sans engendrer d'ions fragments de séquence du peptide ou de l'oligonucléotide.

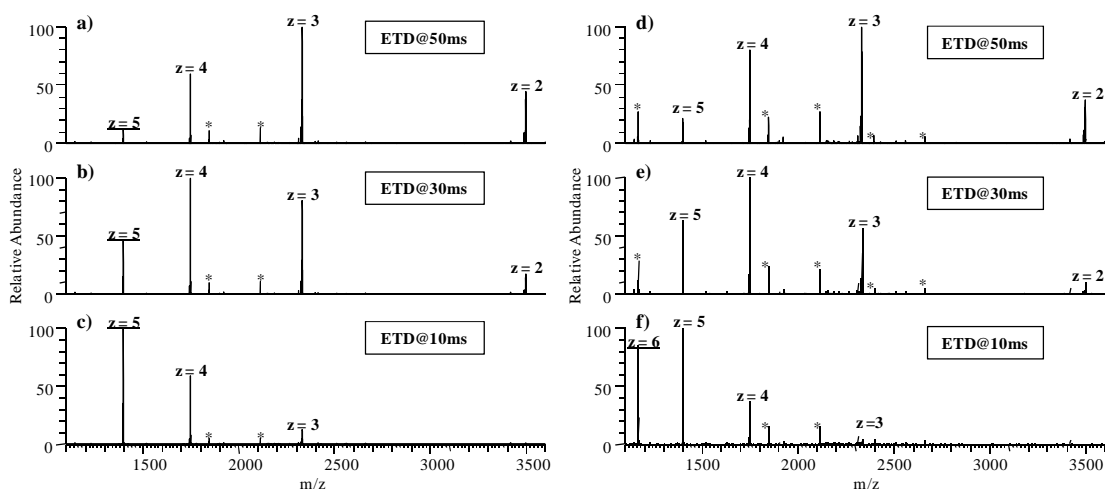


Figure 5-11. Spectres ETD des complexes « peptide/oligonucléotide/peptide » multiprotonés à (a) 50 ms, (b) 30 ms et, (c) 10 ms pour les ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ et à (d) 50 ms, (e) 30 ms et, (f) 10 ms pour les ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$, formés par ESI en mode positif en présence de 1% de *m*NBA à partir d'un mélange ADN/peptide (1 : 3), respectivement l'oligonucléotide de séquence $T_5G_2T_3G_2$ et le fragment 11-24 d'ACTH. Les étoiles marquent les signaux « de fréquences parasites » dus au bruit électronique et mécanique de l'instrument. **Conditions expérimentales.** Concentrations : [ADN] = 5 μ mol/L et [Peptide] = 15 μ mol/L. Solvant : mélange eau/méthanol/*m*NBA (v/v/v, 49,5 : 49,5 : 1) tamponné par de l'acétate d'ammonium (20 mmol/L ; pH \approx 7). **Instrument.** LTQ-Orbitrap-XL. **Paramètres de la source.** Mode : ESI(+) par infusion. Débit liquide : 5 μ L/min. Tension d'ionisation : +3,7 kV. Débit gazeux : 20 (u.a.). **Paramètres de l'interface.** Température du capillaire de transfert : 230°C. Tension au capillaire de transfert : 80 V. Tension au « Tube Lens » : 130 V. **Paramètres d'activation.** Méthode : ETD. Fenêtre d'isolation : 3,1 (u.a.). Temps d'activation : variable. **Analyseur des ions produits.** Orbitrap.

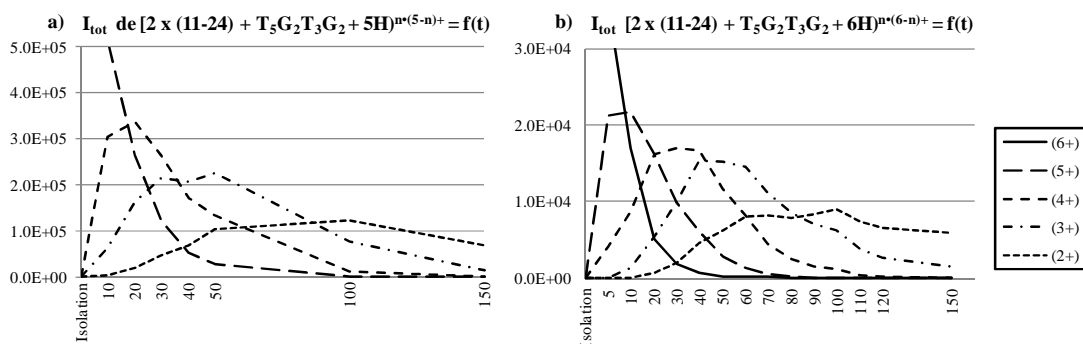


Figure 5-12. Abondances totales des ions produits par ETD en fonction du temps d'activation de (a) $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{n(5-n)+}$ ($I_{tot, \text{précurseur}} = 1,5 \times 10^6$) et de (b) $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{n(6-n)+}$ ($I_{tot, \text{précurseur}} = 6,7 \times 10^4$). Les conditions expérimentales sont décrites dans la **Figure 5-11**.

Ainsi, des espèces multichargées de la forme $[(11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 5H]^{n(5-n)+}$ ($(m/z)_m$ 1748,69, $(m/z)_m$ 2331,58 et $(m/z)_m$ 3497,38, respectivement pour des valeurs de *n* de 1 à 3 dans les **Figures 5-11a**, **5-11b** et **5-11c**) et de la forme $[(11-24) + T_5G_2T_3G_2 + zH]^{z+}$ ($(m/z)_m$ 1748,44, $(m/z)_m$ 2330,92 et $(m/z)_m$ 3495,88, respectivement pour des valeurs de *z* de 4 à 2 ; **Figures 5-11a**, **5-11b** et **5-11c**) issues de perte(s) d'atome(s) d'hydrogène

CHAPITRE 5 :

consécutives) à la capture d'électron(s) ont été principalement observées. La **Figure 5-12a** présente l'évolution de la population d'ions $[(11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 5H]^{n \bullet(5-n)+}$ selon l'état de charge de ces derniers et en fonction du temps de réaction avec l'agent réactif. De même, les ions précurseurs $[2 \times (11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 6H]^{6+}$ ((m/z)_m 1165,96 ; **Figure 5-11d, 5-11e et 5-11f**) ont capturé consécutivement plusieurs électrons sans engendrer d'ions fragments de séquence du peptide ou de l'oligonucléotide. Ainsi, des espèces multichargées de la forme $[(11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 6H]^{n \bullet(6-n)+}$ ((m/z)_m 1399,15, (m/z)_m 1748,94, (m/z)_m 2331,92 et (m/z)_m 3497,88, respectivement pour des valeurs de n de 1 à 4 ; **Figures 5-11d, 5-11e et 5-11f**) et de la forme $[(11-24) + T_5G_2T_3G_2 + zH]^{z+}$ ((m/z)_m 1398,95, (m/z)_m 1748,44, (m/z)_m 2330,92 et (m/z)_m 3495,88, respectivement pour des valeurs de z de 5 à 2 ; **Figures 5-11d, 5-11e et 5-11f**) issues de perte(s) d'atome(s) hydrogène consécutives) à la capture d'électron(s) ont été principalement observées. La **Figure 5-12b** présente l'évolution de la population d'ions $[(11-24) + T_5G_2T_3G_2 + 6H]^{n \bullet(6-n)+}$ selon l'état de charge de ces derniers et en fonction du temps de réaction avec l'agent réactif.

Comme pour les NCX « peptide/oligonucléotide » multiprotonés (**Figure 5-10**), l'absence de fragmentation de séquence de l'oligonucléotide observée lors de l'activation par ETD de NCX « peptide/oligonucléotide/peptide » multiprotonés ($z = 5$ et $z = 6$) s'explique par la grande capacité des oligonucléotides à délocaliser un ou plusieurs électrons. De même, l'absence de fragmentation de séquence du peptide au sein du complexe montre que les sites les plus basiques du peptide ne se sont pas appariés aux agents réactifs et n'ont pu ni capturer d'électron, ni induire la dissociation du peptide.

Enfin, comme pour les NCX « peptide/oligonucléotide » multiprotonés (**Figure 5-10**), les seuls ions fragments détectés correspondent à la perte d'une molécule d'ammoniac (perte de 17,02 Da), consécutive à la capture de n électron(s) ((m/z)_m 1395,75, (m/z)_m 1744,69, (m/z)_m 2326,25 et (m/z)_m 3489,37, respectivement pour des valeurs de n de 1 à 4 dans la **Figure 5-11**) dont l'abondance relative par rapport à l'abondance de l'ion moléculaire de même état de charge est indépendante du temps de réaction avec le fluoranthène. Cette perte d'une molécule d'ammoniac ne peut pas être issue de la perte de l'amine portée sur la position 2 des résidus de guanine. Encore une fois, de par la nature dystonique des ions

initiant la perte d'une molécule d'ammoniac, cette dernière peut être issue de processus initiés par la charge ou de processus initiés par le radical.

La **Figure 5-13** présente les pourcentages moyens de perte d'une molécule d'ammoniac en fonction de l'état de charge pour les ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ (marqués par des carrés) et $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$ (marqués par des losanges) ont été calculés à partir des *maxima* d'abondance des ions $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{n \bullet (5-n)+}$ et $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{n \bullet (6-n)+}$.

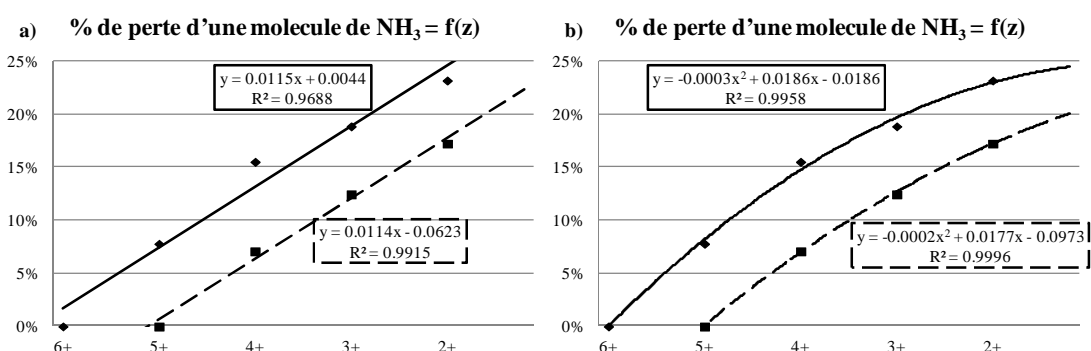


Figure 5-13. Pourcentages moyens de perte d'une molécules d'ammoniac en fonction de l'état de charge (z) pour les ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ (marqués par des carrés) et $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$ (marqués par des losanges) ont été calculées à partir des *maxima* d'abondance des ions $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{n \bullet (5-n)+}$ et $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{n \bullet (6-n)+}$. **(a)** Courbes de tendances linéaires des ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ (trait pointillé ; (%) = $0,0114n - 0,0623$; $R^2 = 0,9688$) et $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$ (trait continu ; (%) = $0,0115n + 0,0044$; $R^2 = 0,9915$). **(b)** Courbes de tendances polynomiales (du second degré) des ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ (trait pointillé ; (%) = $-0,0002n^2 + 0,0177n - 0,0973$; $R^2 = 0,9958$) et $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$ (trait continu ; (%) = $-0,0003n^2 + 0,0186n - 0,0186$; $R^2 = 0,9996$).

Les évolutions linéaires obtenues pour les ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ (en trait pointillé dans la **Figure 5-13a**) et $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$ (en trait continu dans la **Figure 5-13a**) montrent des coefficients directeurs (égaux à 0,0114 et à 0,0115, respectivement pour $z = 5$ et $z = 6$) constants et très proches l'un de l'autre, donc indépendants du nombre de protonation du NCX et du nombre d'électrons capturés par le NCX et, par conséquent, indépendants de l'état de charge de l'ion initiant la perte. De même, les dérivés des évolutions polynomiales (du second ordre) obtenues pour les ions précurseurs $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 5H]^{5+}$ (en trait pointillé dans la **Figure 5-13b**) et $[2 \times (11-24) + (T_5G_2T_3G_2) + 6H]^{6+}$ (en trait continu dans la **Figure 5-13b**), égales à « $-0,0004n + 0,0177$ » et à « $-0,0006n + 0,0186$ » respectivement pour $z = 5$ et $z = 6$, sont très peu dépendantes du nombre de protonation du NCX et quasi-indépendantes du

CHAPITRE 5 :

nombre d'électrons capturés par le NCX. Ainsi, le modèle polynomial présentant les plus hautes valeurs de coefficients de corrélation (R^2 égales à 0,9956 et à 0,9958 respectivement pour $z = 5$ et $z = 6$) semble plus adapté et décrit un taux d'accroissement des pertes d'une molécule d'ammoniac très peu dépendant de la nature de l'ion radicalaire induisant cette perte et, par conséquent, très peu dépendant du nombre d'électrons capturés. Il peut donc être conclu que les pertes d'une molécule d'ammoniac sont issues de processus de dissociation initiés par la charge et assistés par le radical.

IV. Conclusion

Le comportement lors de l'activation en phase gazeuse de différents types de NCX biologiques a été examiné.

La comparaison des spectres CID des NCX « peptide/oligonucléotide » multiprotonés formés par ESI en mode positif et en mode négatif, à partir de peptide différant par leur basicité en phase gazeuse et/ou par leur taille et d'oligonucléotides différant par l'acidité en phase gazeuse de leurs groupements phosphates et la basicité en phase gazeuse de leurs bases nucléique, a mis en évidence deux voies de fragmentation majoritaires : (i) la dissociation du NCX par rupture des NCI le stabilisant et, (ii) la dissociation du NCX par rupture de liaisons covalentes du squelette oligonucléotidique avec préservation des NCI. Les NCX stabilisés par les NCI de type pont salin (les plus fortes en phase gazeuse), impliquant les sites les plus basiques localisés sur les résidus d'arginine (et/ou de lysine) du peptide et les sites les plus acides localisés sur les résidus phospho-thymidine de l'oligonucléotide, ont permis l'observation d'ions fragments non-covalents « à trois corps » composés du peptide restant en interaction avec deux fragments (non-complémentaires) de l'oligonucléotide issus de fragmentations multiples du squelette oligonucléotidique. Ainsi, l'étude de la composition des fragments de l'oligonucléotide restant en interaction avec le peptide a permis de renforcer l'attribution de la localisation des sites impliqués dans les NCI commune aux deux polarités d'ionisation. De plus, l'augmentation de l'abondance des ions fragments non-covalents « à trois corps » en présence d'un excès de protons et leur disparition pour des ions précurseurs plus déprotonés a permis de proposer un modèle de formation pour les ions fragments non-covalents « à trois corps » qui a été soumis dans un journal scientifique (**Annexe 2**).

La comparaison des spectres CID des NCX « peptide/duplex » multiprotonés formés par ESI en mode positif, à partir de peptide différant par leur basicité en phase gazeuse n'a montré qu'une voie de fragmentation majoritaire *i.e.*, la dissociation du NCX par rupture des NCI de type pont salin liant le peptide au duplexe. De par, la présence de protons stabilisant les duplex par des interactions ion-dipôle de type liaison hydrogène, la charge positive portée par une base nucléique (même partiellement masquée) affecte à distance la stabilité de l'interaction ion-ion de type pont salin par un effet de répulsion de charges identiques menant principalement à la dissociation du NCX par rupture des NCI de type pont salin.

La comparaison des spectres CID des NCX « peptide/oligonucléotide/peptide » multiprotonés formés par ESI en mode positif en présence de *mNBA* a montré des voies de fragmentation dépendantes de l'état de charge de l'ion précurseur. Ainsi, les NCX les plus protonés se dissocient préférentiellement par la rupture de NCI engendrant un peptide multiprotoné et un NCX « peptide/oligonucléotide » multiprotoné dont la répartition des charges est dépendante de la parité de l'état de charge de l'ion précurseur. Le NCX le moins protoné se dissocie aussi par rupture de liaisons covalentes de l'oligonucléotide avec préservation des NCI ce qui indique un renforcement des NCI stabilisant le second peptide.

Enfin, la comparaison des spectres ETD à différents temps de réaction entre l'agent réactif (anion radicalaire de fluoranthène) et des NCX « peptide/oligonucléotide » multiprotonés ou des NCX « peptide/oligonucléotide/peptide » multiprotonés formés par ESI en mode positif a permis de localiser les sites protonés les plus disponibles sur l'oligonucléotide montrant que les sites les plus basiques localisés sur le (ou les) peptide(s) sont moins disponibles. Ainsi, l'augmentation de temps de réaction entre l'agent réactif et les ions précurseurs induit la diminution de l'état de charge des NCX multiprotonés par captures d'électron/neutralisation consécutives. Seuls quelques ions fragments correspondant à la perte d'une molécule d'ammoniac ont été détectés. L'étude des ions fragments produit par la perte d'une molécule d'ammoniac a montré que ces derniers sont issus de voies de fragmentation dirigées par la charge et assistées par le radical.

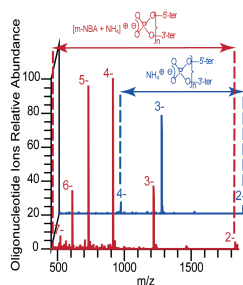
CHAPITRE 5 :

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : (1^{ere} publication) Charge Enhancement of Single-Stranded DNA in Negative Electrospray Ionization Using the Supercharging Reagent Meta-nitrobenzyl Alcohol, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2013)
(DOI 10.1007/s13361-013-0732-8)

Charge Enhancement of Single-Stranded DNA in Negative Electrospray Ionization Using the Supercharging Reagent meta-Nitrobenzyl Alcohol



Bessem BRAHIM, Sandra ALVES, Richard B. COLE, Jean-Claude TABELT

Institut Parisien de Chimie Moléculaire, Equipe de Chimie Structurale Organique et Biologique,
Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 7201, 4 place Jussieu, 75252 cedex 05, Paris,
France

Address reprint requests to:

Jean-Claude TABELT

Institut Parisien de Chimie Moleculaire

Université Pierre et Marie Curie

4 place Jussieu, 75252 cedex 05, Paris, France

Phone : +33.1.44.27.44.95

Fax : +33.1.44.27.38.43

Email : jean-claude.tabet@upmc.fr

Abstract

Charge enhancement of single-stranded oligonucleotide ions in negative ESI mode is investigated. The employed reagent, meta-nitrobenzyl alcohol (m-NBA), was found to improve total signal intensity (I_{tot}), increase the highest observed charge states (z_{high}) and raise the average charge states (z_{avg}) of all tested oligonucleotides analyzed in negative ESI. To quantify these increases, signal enhancement ratio ($\text{SER}_{1\%}$) and charge enhancement coefficient ($\text{CEC}_{1\%}$) were introduced. The $\text{SER}_{1\%}$, (defined as the quotient of total oligonucleotide ion abundances with 1% m-NBA divided by total oligonucleotide abundance without m-NBA) was found to be greater than unity for every oligonucleotide tested. The $\text{CEC}_{1\%}$ values (defined as the average charge state in the presence of 1% m-NBA minus the average charge state in the absence of m-NBA) were found to be uniformly positive. Upon close inspection, the degree of charge enhancement for longer oligonucleotides was found to be dependent upon thymine density *i.e.*, the number and the location of phospho-thymidine units. A correlation between the charge enhancement induced by the presence of m-NBA and the apparent gas-phase acidity (largely determined by the sequence of thymine units but also by the presence of protons on other nucleobases) of multiply deprotonated oligonucleotide species, was thus established. Ammonium cations appeared to be directly involved in the m-NBA supercharging mechanism, and their role seems to be consistent with previously postulated ESI mechanisms describing desorption/ionization of single-stranded DNA into the gas phase.

Introduction

Almost since the discovery of multiple charging of protein molecules by electrospray ionization [1], mass spectrometrists have been trying to understand and manipulate the charge state distributions that one may obtain [2]. The shift in charge state distributions was shown to be dramatic when proteins passed from their native folded states to denatured extended conformations as solution pH was lowered [3]. However, the effect of pH on charge state distributions was much more subtle when small peptides that were not susceptible to “unfolding” were subjected to extreme pH variations [4]. Other solution additives such as nitrogen bases were shown to influence charge state distributions by creating a competition between basic sites bearing excess protons on an analyte protein and the small nitrogen base adducted to this charged site [5, 6]. For example, when introduced as a formate or acetate salt, the ammonium cation (NH_4^+) will act largely as a protonating agent in the presence of highly basic amino acids. In addition to the above *solution-phase* considerations, in the early 1990’s, *gas-phase* charge manipulation was achieved by reacting dimethylamine with multiply protonated cytochrome c [7], or 1,6-diaminohexane with multiply protonated myoglobin in an ion trap mass spectrometer [8]. These gas-phase studies resulted in a reduction in the overall charge of protein species as protons were transferred to the introduced bases.

In the beginning of the 21st century, meta-nitrobenzyl alcohol (m-NBA), previously used as a matrix to improve desorption/ionization processes in Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry [9-12], was proposed as a supercharging reagent in positive ion electrospray mass spectrometry (ESI-MS) by Williams and co-workers [13-16]. Through these studies, they showed not only the ability of m-NBA to enhance both the highest observed (Z_{high}) and average (Z_{avg}) charge states of multiply protonated proteins [13-16] and peptides [13], but also its ability to

ANNEXES

favor higher charge states of cationized synthetic organic polymers, *e.g.* PEG 1500, [14-15] in ESI positive ion mode. They reported a limited influence of m-NBA on oxidized insulin chain A under negative ESI conditions [14]. Access to higher charge states allows analysis of larger biological systems when the m/z range of the mass spectrometer is limited; the achievable mass resolution may also increase for mass analyzers that exhibit decreasing resolving power at higher m/z values, *e.g.* Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance. Electron capture efficiency may also be augmented at higher charge states [17-19].

From its introduction, many attempts have been made to better understand how the chemical characteristics of m-NBA lead to supercharging. Among the properties considered are surface tension [13-16, 20-22], vapor pressure (or boiling point) [14-16, 20-26], gas-phase basicity [14, 16, 20-25, 27, 29-30], *etc.* According to Kebarle's work [32-34], these properties can be divided into two groups corresponding to the progressive steps of evaporation/desolvation in ESI. Vapor pressure and surface tension are important physico-chemical properties starting from the macroscopic early phases of the charged droplet's lifetime. On the other hand, solvent-free (or sparsely solvated) charged molecular species appear only at the very end of the charged droplet's lifetime, so Gibbs free energy change of protonation/deprotonation reactions (*i.e.*, GB for positive ion production and $\Delta G^\circ(\text{acid})$ for negative ion production) intervene directly only at this stage of desolvation in the ESI process. Because the vapor pressure of m-NBA ($b_p = 177^\circ\text{C}$ at 3 Torr [35]) is lower than that of water ($b_p = 100^\circ\text{C}$ at 766 Torr [35]), a noticeable influence of m-NBA on ESI charge states is observed in aqueous solutions even at very low reagent concentrations [14-16, 20-29]. This is because, during the course of water molecule evaporation, the concentration of supercharging reagent increases until it becomes the most abundant solvent species present into the final droplets [14]. The high concentration of reactive aromatic

molecules remaining after water evaporation could induce conformational changes of studied macromolecules, *e.g.* proteins [13-16, 20, 25] and protein non-covalent complexes [21-24, 26-29]. Lower vapor pressure also implies a slower droplet cool down that could favor conformational changes of biomolecules due to their higher internal energy [22, 24].

During the last few years, protein possible conformational changes have been studied using denaturation conditions induced by solvent [30-31, 36] or temperature variations [22, 24], but also by employing a reversed strategy *i.e.*, by chemically «locking» the protein tertiary structure with introduced covalent linkages [29]. As expected, the presence of m-NBA did not modify the existing correlation trend for biomolecular species *i.e.*, the more unfolded the protein is, the more charges it can carry [24, 27, 29-30]. But it has not yet been clarified whether: (i) the presence of additional charged sites causes increased coulombic repulsion leading to protein unfolding or, (ii) protein unfolding induced by the presence of m-NBA reveals new accessible protonable sites which lead to the observed charge state enhancement. Even if the GB value of m-NBA in positive ion mode has been implicated as a major thermochemical property responsible for these trends [23, 28, 30], conformational changes of the analyte (that may or may not occur in response to the presence of m-NBA) hinder the ability to unambiguously assign the underlying reasons for the success of m-NBA as a supercharging reagent.

In the current study, we examine the influence of m-NBA reagent in negative ESI ion mode on oligonucleotide charge state distributions [37]. The several phosphate groups present on the oligonucleotide backbone and thus, the acidic character of single-stranded DNA (ssDNA) explains why these compounds have mostly been studied in the negative ion mode [38-44]. Positive ion studies of DNA are also possible [44-50] owing to the substantial GB values of nucleobases that are readily protonated in solution with counter-ions, *e.g.* deprotonated solvent

ANNEXES

molecules, nearby. Ammonium acetate, commonly used as buffer for ssDNA samples, does not only control the pH of the solution (*e.g.* preventing further duplex production), it also interacts with phosphate groups that are fully deprotonated in solution ($pK_a < 1$) and thus, induces a competition between NH_4^+ and alkali metals for the role of counter-ion. After complete evaporation of the solvent, and during the desolvation step in the microscopic state, intermolecular proton transfer(s) could occur between oligonucleotide anions and NH_4^+ cations leading to fewer deprotonated sites on the oligonucleotides [44]. Since ammonia (NH_3) is not basic enough to form stable salt bridges with phosphate groups [51], such proton transfers are most likely to occur during the last stages of ESI desolvation and are guided by the respective GB of NH_3 (819 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, [52]) and the apparent Gibbs free energy change ($\Delta G_{\text{app}}^{\circ}(\text{acid})$) of the deprotonation reaction of multiply deprotonated oligonucleotide species ($[DNA-nH]^{n-}$). An excess of ammonium acetate can shift the charge state distribution of $[DNA-nH]^{n-}$ toward lower n values by favoring departures of NH_3 molecules (leaving behind the proton) and resulting in a decrease in the number of negative charges located on the ssDNA backbone [53]. z_{avg} of oligonucleotide anions are strongly dependent upon the $\Delta G_{\text{app}}^{\circ}(\text{acid})$ of $[DNA-nH]^{n-}$, and thus upon oligonucleotide sequence, especially the density (*i.e.*, number and consecutivity) of phosphor-thymidine units [54] (the most acidic nucleotide [51, 55-57]). Brodbelt and co-workers [58] have observed the charge enhancement of duplexes in negative ESI-MS induced by the presence of *m*-NBA, but the enhancement was accompanied by in-source dissociations into the corresponding ssDNA. Since no predefined conformations of single-stranded oligonucleotides have been established as being predominant for short sequences [59-61], the presence of *m*-NBA would not be expected to induce conformational changes that could potentially alter the number of apparent deprotonable sites of ssDNA. Because of the elimination of this conformational

factor from the mechanistic interpretation of the influence of m-NBA, the use of oligonucleotides can perhaps give more precise information than proteins on m-NBA's specific role in charging during ESI.

ANNEXES

Experimental

Sample preparation

ssDNA (12-mer: 5'-AAAAACCAAAAA-3', 5'-TTGGTTAATTCC-3', 5'-GGAATTAACCAA-3', 5'-GGTTAATTCCTT-3', 5'-CCAATTAAGGAA-3', 5'-GGCCACAATTT-3', 5'-AAATTGTGGCCC-3', 5'-CCCTTGTGGAAA-3', 5'-TTCCACAAGGG-3', 5'-TTTTTGGTTTGG-3', and 6-mer: 5'-TTTTTT-3', 5'-TTATT-3', 5'-TTCTTT-3', 5'-GTTTTT-3', 5'-GGGTTT-3') with 5' and 3' hydroxyl terminal groups were obtained from EUROFINS MWG Biotech (Ebersberg, Germany) and were used without further purification. All other chemicals have been purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (St Quentin Fallavier, France). All solutions have been prepared using deionized water (10 M Ω) with 20 mM ammonium acetate, HPLC grade methanol (50:50, v/v) and with or without addition of 1% volume of m-NBA. Oligonucleotide solutions at 20 μ M were injected into the instrument at a flow rate of 5 μ L.min⁻¹.

Mass spectrometry

Experiments were performed using an electrospray ionization source in negative ion mode combined with an LTQ-Orbitrap hybrid instrument (Thermo Scientific, San Jose, CA) [62-64]. ESI conditions were as follows: accelerating voltage 3.5 kV; ion transfer tube temperature 280°C; capillary voltage -50 V; and tube lens voltage -110 V. Nitrogen was used as sheath gas and auxiliary gas. High resolution mass spectra (m/z 200-2000) were acquired in the Orbitrap cell (theoretical mass resolving power of 60 000 at m/z 400), after external ion accumulation. The resolution power and mass accuracy allow the observation of the isotopic profile and facilitate the identification of molecular species and their resulting charge states. All data were acquired using external calibration. Relative standard deviations (RSD) were calculated from ten

repeated measurements and are presented in the respective tables.

Results

To gain insight into the influence of $\Delta_r G_{ac,app}^{\circ}$ of $[\text{DNA-nH}]^{n-}$ on m-NBA's action towards oligonucleotide charging processes, various DNA sequences and sizes (from 6-mer to 12-mer) were examined.

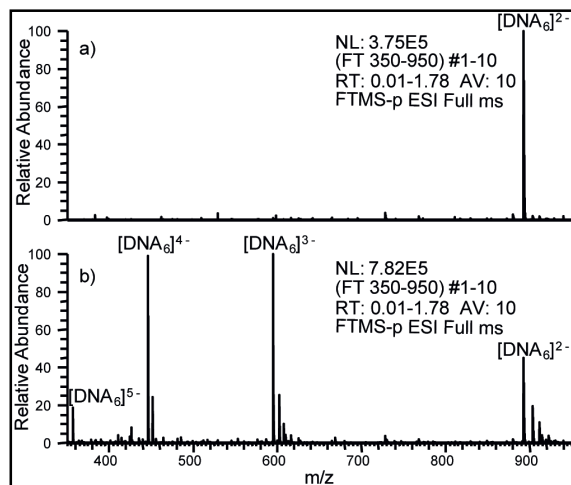


Fig. 1 Mass spectra of 6-mer ssDNA ions (GTTTTT) in negative ESI mode, (a) without m-NBA and (b) with 1% of m-NBA

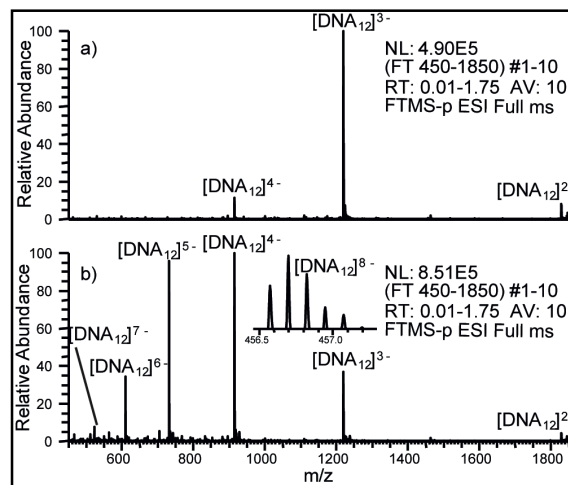


Fig. 2 Mass spectra of 12-mer ssDNA ions (GGAATTAACCAA) in negative ESI mode, (a) without m-NBA and (b) with 1% of m-NBA

Figure 1 and 2 present negative mode ESI mass spectra of 5'-GTTTTT-3' and 5'-GGAATTAACCAA-3' solutions, respectively. Comparison of mass spectra obtained without (**Figures 1a and 2a**) or with (**Figures 1b and 2b**) addition of m-NBA, clearly shows the effect of m-NBA on the charge state distribution of oligonucleotide ions. The presence of m-NBA has broadened the charge state distribution of oligonucleotide ions, from 1 to 4 charge states for the 6-mer (**Figure 1**), and from 3 to 7 charge states for the 12-mer (**Figure 2**). In addition to this widening of the charge state distributions, the presence of m-NBA has dramatically increased the z_{high} of smaller oligonucleotide ions from -2 to -5; the -5 charge state obtained with m-NBA corresponds to the deprotonation of all phosphate groups constituting the 6-mer ssDNA and therefore, to the maximum potential charge state (z_{max}) (**Figure 1**). The same trend has been observed for longer oligonucleotides, shifting the z_{high} from -4 to -8 corresponding to the

deprotonation of 8 out of the 11 phosphate groups constituting the 12-mer ssDNA (**Figure 2**). For all tested oligonucleotides, the lowest observed charge state (z_{low}) stayed the same despite the presence of m-NBA. Note that “satellite” peaks present in **Figure 1b** correspond to alkali metal adducts, whereas no m-NBA adducts of oligonucleotides were observed.

Figure 3 presents positive ion mass spectra of 5'-TTTTTGGTTTGG-3' solutions. Comparison

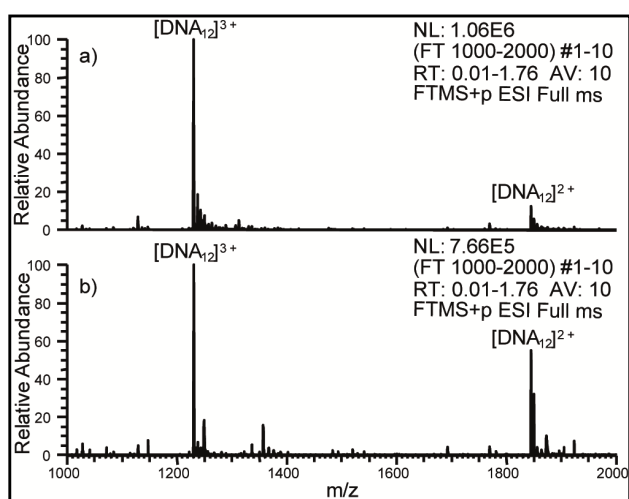


Fig. 3 Mass spectra of 12-mer ssDNA ions (TTTTTGGTTTGG) in positive ESI mode, (a) without m-NBA and (b) with 1% of m-NBA

Table 1 and 2 present negative mode ESI results obtained for all tested oligonucleotide solutions in the absence and presence of 1% m-NBA. Total oligonucleotide ion abundances (I_{tot}) have been calculated by summing the peak intensities of the entire natural isotopic cluster for each ion charge state. Two clear trends were deduced. First, a slight signal enhancement was observed for all tested oligonucleotides of any length or sequence. In order to quantify this signal enhancement that 1% m-NBA induces on oligonucleotide ions, a “signal enhancement ratio” ($SER_{1\%}$) is defined as the quotient:

$$SER_{1\%} = (I_{tot} \text{ in the presence of m-NBA}) / (I_{tot} \text{ in the absence of m-NBA}) \quad (1)$$

of mass spectra obtained without (**Figure 3a**)

or with (**Figure 3b**) addition of m-NBA,

shows a relatively minor effect on the charge

state distribution of oligonucleotide ions

observed in positive ESI mode. Both z_{high}

and z_{low} stayed the same while the ion

abundance ratio z_{high}/z_{low} has slightly

decreased in the presence of m-NBA.

ANNEXES

Very importantly, in negative ESI mode, it was consistently found that all measured $SER_{1\%}$ quotients were higher than 1.0, indicating that the presence of 1% NBA invariably resulted in signal enhancement (**Table 1**).

	0% m-NBA		1% m-NBA		$SER_{1\%}$	RSD
	I_{tot}	RSD	I_{tot}	RSD		
<i>6-mer</i>						
5'-TTTTTT-3'	8.36 x10 ⁵	± 2%	4.53 x10 ⁶	± 12%	5.42	± 12%
5'-TTATTT-3'	6.17 x10 ⁵	± 3%	3.70 x10 ⁶	± 3%	6.00	± 4%
5'-TCCTTT-3'	6.55 x10 ⁵	± 2%	4.41 x10 ⁶	± 3%	6.74	± 3%
5'-GTTTTT-3'	8.60 x10 ⁵	± 4%	6.96 x10 ⁶	± 2%	8.09	± 5%
5'-GGGTTT-3'	5.61 x10 ⁵	± 1%	6.25 x10 ⁶	± 2%	11.15	± 2%
<i>12-mer</i>						
5'-AAAAACCAAAA-3'	2.47 x10 ⁶	± 5%	8.30 x10 ⁶	± 1%	3.34	± 5%
5'-GGAATTAACCAA-3'	1.94 x10 ⁶	± 2%	7.67 x10 ⁶	± 1%	3.94	± 3%
5'-CCAATTAAGGAA-3'	2.40 x10 ⁶	± 3%	7.66 x10 ⁶	± 1%	3.20	± 3%
5'-GGGCCACAATTT-3'	2.29 x10 ⁶	± 3%	5.72 x10 ⁶	± 1%	2.50	± 3%
5'-TTTCCACAAGGG-3'	2.62 x10 ⁶	± 2%	6.33 x10 ⁶	± 3%	2.42	± 4%
5'-AAATTGTGGCCC-3'	2.13 x10 ⁶	± 4%	6.37 x10 ⁶	± 3%	2.98	± 5%
5'-CCCTTGTGGA-3'	1.74 x10 ⁶	± 5%	4.72 x10 ⁶	± 2%	2.71	± 6%
5'-TTGGTTAATTC-3'	1.61 x10 ⁶	± 8%	9.30 x10 ⁶	± 2%	5.76	± 8%
5'-GGTTAATTCCTT-3'	3.17 x10 ⁶	± 2%	8.77 x10 ⁶	± 6%	2.77	± 6%

Table 1 Total ion abundance (I_{tot}) obtained without or with introduction of 1% of m-NBA in various ssDNA solutions; calculated signal enhancement ratios ($SER_{1\%}$), defined as the quotient of I_{tot} with 1% of m-NBA divided by I_{tot} without m-NBA. Relative standard deviations (RSD) were calculated from 10 different measurements

The second clear trend relates to shifts in the charge state distribution (**Table 2**). To evaluate this latter shift, average charge states, z_{avg} , were calculated using the following formula [65]:

$$z_{avg} = \frac{\sum_i^n (i I^i)}{I_{tot}} \quad (2)$$

corresponding to, the sum of each oligonucleotide ion abundance (I^i) for a given charge state multiplied by its the charge state value (i), divided by the sum of all oligonucleotide ion abundances (I_{tot}). A clear increase of z_{avg} values was observed for all tested ssDNA after m-NBA addition, independently of the oligonucleotide length or sequence.

	0% m-NBA			1% m-NBA			CEC _{1%}	RSD
	<i>z</i> _{avg}	RSD	<i>z</i> _{high}	<i>z</i> _{avg}	RSD	<i>z</i> _{high}		
<i>6-mer</i>								
5'-TTTTTT-3'	2.00	± 0.1%	2	3.17	± 1.5%	5	1.17	± 4.5%
5'-TTATTT-3'	2.00	± 0.1%	2	3.17	± 0.3%	5	1.18	± 1.0%
5'-TTCTTT-3'	2.00	± 0.1%	2	3.19	± 0.3%	5	1.19	± 0.9%
5'-GTTTTT-3'	2.00	± 0.1%	2	3.36	± 0.2%	5	1.36	± 0.7%
5'-GGGTTT-3'	2.04	± 0.1%	3	3.27	± 0.2%	5	1.23	± 0.5%
<i>12-mer</i>								
5'-AAAAACCAAAAA-3'	2.88	± 0.1%	4	4.22	± 0.2%	7	1.34	± 0.7%
5'-GGAATTAACCAA-3'	3.04	± 0.1%	4	4.52	± 0.1%	8	1.49	± 0.5%
5'-CCAATTAAGGAA-3'	3.05	± 0.1%	4	4.49	± 0.4%	8	1.43	± 1.9%
5'-GGGCCACAATTT-3'	3.17	± 0.1%	4	4.56	± 0.3%	7	1.38	± 1.2%
5'-TTCCACAAGGG-3'	3.16	± 0.1%	4	4.56	± 0.2%	7	1.41	± 1.0%
5'-AAATTGTGGCCC-3'	3.09	± 0.2%	4	4.62	± 0.2%	8	1.52	± 1.0%
5'-CCCTTGTGGA-3'	3.23	± 0.1%	4	4.76	± 0.2%	8	1.54	± 1.2%
5'-TTGGTTAATTC-3'	3.12	± 0.1%	4	4.71	± 0.3%	8	1.59	± 1.4%
5'-GGTTAATTCCTT-3'	3.13	± 0.1%	4	4.73	± 0.2%	8	1.60	± 0.9%

Table 2 Average charge state (z_{avg}), highest observed charge states (z_{high}) obtained without or with introduction of 1% of m-NBA in various ssDNA solutions; calculated charge enhancement coefficient (CEC_{1%}), defined as z_{avg} in the presence of 1% of m-NBA minus z_{avg} in absence of m-NBA. Relative standard deviations (RSD) were calculated from 10 different measurements

To better quantify the shift in charge states induced by 1% m-NBA addition, a charge enhancement coefficient (CEC_{1%}) is defined as:

$$CEC_{1\%} = (z_{avg} \text{ in presence } 1\% \text{ of m-NBA}) - (z_{avg} \text{ in absence of m-NBA}) \quad (3)$$

The utility of this charge enhancement coefficient is that it allows a direct assessment of the influence of m-NBA addition, i.e., initial variability in charge state distributions is subtracted out.

Very importantly, all calculated CEC_{1%} values were found to be strictly positive, showing the ability of m-NBA to enhance z_{avg} of [DNA-nH]ⁿ⁻ ions. Additionally, CEC_{1%} values obtained for larger oligonucleotides are shown to increase with the number of thymine units; moreover, small shifts are observed depending upon the thymine location.

ANNEXES

Discussion

Through the last decade, m-NBA was extensively described in the literature for its ability to enhance, in positive ESI ion mode, the signal intensity [14], z_{high} and z_{avg} [13-16, 20-31] of peptides [13, 20, 25], proteins [13-16, 23, 25-27, 29-31] and non-covalent protein complexes [21-22, 24, 28]. Early on, Williams and co-workers [15] proposed that the solvent surface tension is an important macroscopic factor involved in the supercharging mechanism. Indeed, the Rayleigh limit for a spherical droplet is classically given by:

$$z_r e = 8\pi (\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2} \quad (4)$$

where, z_r is the unit charge limit, e is the elementary charge, ϵ_0 is the permittivity of the surrounding medium, γ is the surface tension and R is the droplet radius. The overall surface tension modification induced by addition of m-NBA and the resulting Rayleigh charge limit are presumably independent of the studied polarity. Therefore, the enhancements should be observed regardless of the ion polarity when the same sample preparation and experimental conditions are employed within the limits of the analyte's ability to undergo proton exchange processes. Attempts performed in negative ion ESI on amphoteric proteic ions, such as the oxidized A chain of insulin [14] or myoglobin non-covalent complexes [24], have only yielded slight increases in z_{avg} .

However, for all tested oligonucleotides in positive ESI mode, $\text{SER}_{1\%}$ values were measured to be less than 1.0, thereby revealing a decrease of $[\text{DNA}+\text{nH}]^{n+}$ ion abundance in the presence of m-NBA (**Fig. 3**). Accordingly, $\text{CEC}_{1\%}$ values were found to be strictly negative under these conditions, showing a decrease of z_{avg} values in the presence of m-NBA (**Fig. 3**). This contrast in results obtained for the two ion polarities shows that solvent surface tension is likely to not be the only factor involved in the supercharging mechanism of oligonucleotides. It is our view that,

the contradicting experimental results obtained in each polarity are likely indicative of the charging mechanism of DNA. No matter which ion polarity is used, the outcome of m-NBA addition on the oligonucleotide ionization resulted in a consistent decrease in the number of net positive charges (positive ion mode) or similarly, an increased number of net negative charges (negative ion mode). This evidence supports the notion that m-NBA promotes a unidirectional intermolecular proton transfer ending in a higher number of deprotonated phosphate groups regardless of ion polarity.

For proteins, Loo and co-workers have shown that since: (i) no protonated m-NBA reagent is observed in the low m/z region and (ii) m-NBA clustering onto proteins are lost as neutral m-NBA species (at higher transfer energies) while supercharging myoglobin ions in positive ESI mode, m-NBA has a lower GB than GB_{app} of $[Myo+nH]^{n+}$ [21, 23]. From the analogous observations in negative ESI mode (no $[m-NBA-H]^-$ nor negatively charged oligonucleotide adducts with m-NBA observed due to the harsh ESI conditions used), it could be concluded either that m-NBA appears to have a higher $\Delta G^\circ(\text{acid})$ value than $\Delta G^\circ_{app}(\text{acid})$ of all observed $[DNA-nH]^{n-}$ species, or that m-NBA molecules do not interact directly with phosphate groups and need assistance to deprotonate ssDNA. Indeed, a signal loss has been observed when ammonium acetate buffer was not introduced during sample preparation. If a direct intermolecular proton exchange occurs between m-NBA and oligonucleotide ions during the last desolvation steps, the obtained charge enhancement should be observed even in the absence of NH_4^+ counter-ions. Effects induced by the presence of m-NBA could therefore be explained by the previously established conventional desolvation model for transfer of oligonucleotide ions from solution into the gas phase [44]. By definition, $\Delta G^\circ(\text{acid})$ values can be employed only when solvated ions (m-NBA/ NH_4^+ /ssDNA negatively charged aggregates) are released into the

ANNEXES

gas phase from micro-droplets (mostly composed of m-NBA due to its low vapor pressure compared to that of water). During the last desolvation steps, when NH_4^+ ions have the opportunity to leave a proton to an $[\text{DNA}-\text{nH}]^{n-}$ ion, the presence of m-NBA seems to facilitate the other competitive desolvation pathway involving the departure of an NH_4^+ cation rather than a neutral NH_3 molecule. This results in the creation of an additional negatively charged phosphate group on the oligonucleotide ion, and this process may occur more than once, until achieving a maximum level of deprotonation dictated by the $\Delta G^\circ_{\text{app}}(\text{acid})$ of $[\text{DNA}-\text{nH}]^{n-}$. When considering this type of consecutive deprotonation of an oligonucleotide, the $\Delta G^\circ_{\text{app}}(\text{acid})$ value of each successive multi-deprotonated anion increases progressively until the last thermochemically allowed intermolecular proton transfer, at which point, the highest observable charge state (z_{high}) is reached. The width of the charge state distribution of oligonucleotides in the gas phase is thereby determined by the range of $\Delta G^\circ_{\text{app}}(\text{acid})$ values of $[\text{DNA}-\text{nH}]^{n-}$ between the first and the last intermolecular proton transfers. The propensity for such intermolecular proton transfers correlates with $\Delta G^\circ_{\text{app}}(\text{acid})$ values, which are dependent upon the specific DNA sequence and mostly upon the number of phospho-thymidine units (the most acidic nucleotide) present in the 12-mer ssDNA.

According to our model, the charge enhancement due to the presence of m-NBA occurs at the final stages of evaporation of the charged aggregated. The model can explain the difference in z_{avg} obtained in the presence or absence of m-NBA for oligonucleotide sequences of the same length (12-mers) containing different numbers of phospho-thymidine units (*i.e.*, the most acidic nucleotide). With or without the presence of m-NBA, it was observed that z_{avg} values for oligonucleotide sequences containing three pairs of adjacent thymine units (*i.e.*, three -TT- motifs) were higher than those obtained for sequences containing only one -TT- motif. For

example, 5'-TTGGTTAATTCC-3' and 5'-GGTTAATTCCTT-3' oligonucleotide ions, respectively, exhibited z_{avg} values of: (i) 3.119 and 3.133 without introduction of m-NBA and, (ii) 4.71 and 4.73 with 1% of m-NBA; whereas 5'-GGAATTAACCAA-3' and 5'-CCAATTAAGGAA-3' oligonucleotide ions have only yielded respectively z_{avg} values of: (i) 3.035 and 3.052 without m-NBA and, (ii) 4.53 and 4.49 with 1% of m-NBA. Additionally, $\text{CEC}_{1\%}$ values of $[\text{DNA}-\text{nH}]^{\text{n-}}$ followed the same trend *i.e.*, 1.59 and 1.60 for these same T-rich sequences compared to 1.49 and 1.43 for the sequences poorest in thymine units. Indeed, the presence of additional thymine nucleobases increases the number of preferentially deprotonable sites and therefore facilitates production of higher charge states of $[\text{DNA}-\text{nH}]^{\text{n-}}$. Thus, the first release of NH_4^+ occurs readily during desolvation (in preference to proton transfer to ssDNA), while further charging remains guided by the competition between $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ releases from other nucleotide units (*e.g.* G, C and A) *i.e.*, by the $\Delta G^\circ_{\text{app}}(\text{acid})$ of $[\text{DNA}-\text{nH}]^{\text{n-}}$. For example, 5'-AAAAACCAAAA-3' oligonucleotide ion (containing no thymine) exhibited z_{avg} values of: (i) 2.883 without introduction of m-NBA and, (ii) 4.22 with 1% of m-NBA; thus, a $\text{CEC}_{1\%}$ value of 1.34 which is the lowest value of the 12-mer set.

It is not only the *number* of thymine nucleobases that influences the charge enhancement induced by m-NBA, but also their *locations* in the DNA sequence play a role. Indeed, $\text{CEC}_{1\%}$ values obtained for 12-mer ssDNA sequences containing three consecutive thymine nucleobases, *e.g.* 1.38 and 1.41, respectively for 5'-GGGCCACAATTT-3' and 5'-TTTCCACAAGGG-3' oligonucleotide ions, were found to be lower than those obtained for 12-mer ssDNA sequences containing three non-consecutive thymine nucleobases, *e.g.* 1.52 and 1.54, respectively for 5'-AAATTGTGGCCC-3' and 5'-CCCTTGTGGAAA-3' oligonucleotide ions. As noted above, intermolecular proton transfers between NH_4^+ and the ssDNA are guided by thermochemical

ANNEXES

properties, *e.g.* $\Delta G^{\circ}_{\text{app}}(\text{acid})$ including electrostatic effects. Thus, they are also oriented by the proximity of other positive and negative charged sites which will locally influence the activation energy required for a potential intermolecular proton exchange. For 12-mer ssDNA sequences containing consecutive thymine nucleobases, *i.e.* 5'-GGGCCACAATTT-3' and 5'-TTCCACAAGGG-3', when one of the phosphate groups directly linked to a thymidine unit (most acidic site of the DNA sequence) already holds a negative charge, the energy required to stabilize another negative charge on an adjacent phosphate group directly linked to a second thymidine unit is raised, and this neighboring anion formation is thereby disfavored. Therefore, despite the relatively high acidity of phospho-thymidine units, the close proximity of several ones will disfavor the consecutive departures of NH_4^+ cations for a 12-mer and, instead, will achieve a balance wherein the departure of neutral NH_3 molecules becomes more competitive, consistent with previously postulated ESI mechanisms describing desorption/ionization of ssDNA into the gas phase [44].

The above 12-mer example shows that local electrostatic effects can exert influence on the dominant orientation given by gas-phase acidity considerations on the supercharging phenomenon. The situation becomes even more complicated when considering the supercharging of 6-mers where the largest difference in the enhanced charging ($\text{CEC}_{1\%}$ values) occurs for 5'-TTATTT-3' (dispersed thymine nucleobases, lowest $\text{CEC}_{1\%}$) and 5'-GTTTTT-3' (dense thymine nucleobases, highest $\text{CEC}_{1\%}$) even though each has an identical number of thymines. Thus, in the case of these T-rich 6-mer ssDNA, a high "density" of thymine actually leads to a higher $\text{CEC}_{1\%}$. The electrostatic effect that seems to come to the forefront in this case is that preferential protonation of the guanine nucleobase (highest GB) occurring in the aggregate apparently facilitates negative charge formation at the nearest phosphate group. During further desolvation,

this proton can be lost as solvent molecules depart, thus leaving only negative charges on the ssDNA that now is a highly charged anion. The above 6-mer containing the adenine nucleobase (lower GB) apparently cannot exhibit the same level of electrostatic influence. Thus, this example shows that the deleterious effect of adjacent deprotonable sites can be overcome by other electrostatic effects that promote deprotonation.

The same rationale can explain why 5'-GTTTTT-3' has a higher $CEC_{1\%}$ value (1.36) than 5'-TTTTTT-3' (1.22) even though the former has one fewer thymine nucleobase. Compared to these two, 5'-TTCTTT-3' ($CEC_{1\%} = 1.19$) and TTATTT ($CEC_{1\%} = 1.16$) exhibit slightly lower $CEC_{1\%}$ values which is in agreement with our proposed model, but only 5'-GGGTTT-3' (with the T-poorest sequence) gives a $CEC_{1\%} = 1.23$ that appears to be unusually high, again pointing toward a special role that guanine appears to play in the supercharging process.

ANNEXES

Conclusion

m-NBA reagent was already known for favoring protonation of proteic biomolecules in positive ESI mode but it was shown here to promote deprotonation of various ssDNA sequences in negative mode during the ESI desolvation process. Using oligonucleotides as tools to scrutinize the underlying aspects of ESI fundamentals, *e.g.*, transfer and desolvation of ions into the gas phase, m-NBA-induced charge enhancement of oligonucleotide ions in negative ESI mode is thus established. A model emphasizing the role of apparent gas-phase acidity has been proposed to rationalize the phenomenon of supercharging. Particular features examined are: (i) the number of thymines, (ii) the dispersion of thymines, and (iii) the presence of protonable nucleobases (especially guanine). Each of these three components can apparently exert variable electrostatic effects on the overall tendency for charged site formation. The ability to produce more highly charged precursor oligonucleotide ions (induced by the presence of m-NBA) could provide a means to obtain more extensive ion fragmentation in tandem mass spectrometry experiments. This would thereby improve the relevance of fitness values obtained in automated tandem mass spectral sequencing of small oligonucleotides using, for example, the COMPAS®, or other similar algorithms [66-67]. While no real consensus has yet emerged concerning the mechanism of supercharging in ESI, the current contribution is proposed as an additional brick in constructing a foundation to explain the mechanism of supercharging for both ESI ion modes.

References

- [1] Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989, 246(4926), 64-71.
- [2] Li, Y.; Cole, R.B. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, 2nd ed.; R. B. Cole Ed.: John Wiley and Sons, 2010; Charge State Distributions in Electrospray and MALDI, 491-534.
- [3] Chowdhury, S.K.; Katta, V.; Chait, B.T. Probing Conformational Changes In Proteins By Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 9012-9013.
- [4] Wang, G.; Cole, R.B. Disparity Between Solution-Phase Equilibria and Charge State Distributions in Positive-Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* 1994, 29, 419-427.
- [5] Le Blanc, J.C.Y.; Wang, J.; Guevremont, R.; Siu, K. Electrospray Mass Spectra of Protein Cations Formed In Basic Solutions. *Org. Mass Spectrom.* 1994, 29, 587-593.
- [6] Felitsyn, N.; Peschke, M.; Kebarle, P. Origin and Number of Charges Observed On Multiply-Protonated Native Proteins Produced By ESI. *Int. J. Mass Spectrom.* 2002, 219, 39-62.
- [7] McLuckey, S.A.; Van Berkel, G.J.; Glish, G.L. Reactions of Dimethylamine with Multiply Charged Ions of Cytochrome c. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 5668-5670.
- [8] McLuckey, S.A.; Glish, G.L.; Van Berkel, G.J. Charge Determination of Product Ions Formed from Collision-Induced Dissociation of Multiply Protonated Molecules via Ion/Molecule Reactions. *Anal. Chem.* 1991, 63, 1971-1978.
- [9] Takayama, M.; Fukai, T.; Nomura, T. Effect of a new matrix system for low-polar organic compounds in fast atom bombardment mass spectrometry. *Shisuryo Bunseki* 1988, 36(4), 169-173.
- [10] Siuzdak, G.; Wendeborn, S.V.; Nicolaou, K.C. Cationization of organometallic carbonyl

ANNEXES

compounds by fast ion bombardment. *Int. Journ. of Mass Spectrom. Ion Process.* 1992, 112(1), 79-91.

[11] Reynolds, J.D.; Cook, K.D.; Burn, J.L.E.; Woods, C. m-Nitrobenzyl Alcohol Electrochemistry in Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1992, 3, 113-121.

[12] Ahn, Y.M.; Lee, W.-W.; Jung, J.H.; Lee, S.-G.; Hong, J. Structural determination of glucosylceramides isolated from marine sponge by fast atom bombardment collision-induced dissociation linked scan at constant B/E. *J. Mass. Spectrom.* (2009), 44, 1698-1708.

[13] Iavarone, A.T.; Jurchen, J.C.; Williams, E.R. Supercharged Protein and Peptide Ions Formed by Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* 2001, 73, 1455-1460.

[14] Iavarone, A.T.; Williams, E.R. Supercharging in electrospray ionization: effects on signal and charge. *Int. J. Mass Spectrom.* 2002, 219, 63-72.

[15] Iavarone, A.T.; Williams, E.R. Mechanism of Charging and Supercharging Molecules in Electrospray Ionization. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 2319-2327.

[16] Iavarone, A.T.; Williams, E.R. Collisionally Activated Dissociation of Supercharged Proteins Formed by Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* 2003, 75, 4525-4533.

[17] Gorshkov, M.V.; Masselon, C.D.; Nikolaev, E.N.; Udseth, H.R.; Pasa-Tolic, L.; Smith, R.D. Considerations for electron capture dissociation efficiency in FTICR mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2004, 234, 131-136.

[18] Zubarev, R.A.; Witt, M.; Baykut, G. Two-Fold Efficiency Increase by Selective Excitation of Ions for Consecutive Activation by Ion-Electron Reactions and Vibrational Excitation in Tandem Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2005, 77, 2992-2996.

- [19] McFarland, M.A.; Chalmers, M.J.; Quinn, J.P.; Hendrickson, C.L.; Marshall, A.J. Evaluation and Optimization of Electron Capture Dissociation Efficiency in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005, 16, 1060-1066.
- [20] Kjeldsen, F.; Giessing, A.M.B.; Ingrell, C.R.; Jensen, O.N. Peptide Sequencing and Characterization of Post-Translational Modifications by Enhanced Ion-Charging and Liquid Chromatography Electron-Transfer Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2007, 79, 9243-9252.
- [21] Lomeli, S.H.; Yin, S.; Loo, R.R.; Loo, J.A. Increasing Charge While Preserving Noncovalent Protein Complexes for ESI-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, 20, 593-596.
- [22] Sterling, H.J.; Williams, E.R. Origin of Supercharging in Electrospray Ionization of Noncovalent Complexes from Aqueous Solution. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, 20, 1933-1943.
- [23] Lomeli, S.H.; Peng, I.X.; Yin, S.; Loo, R.R.; Loo, J.A. New Reagents for Increasing ESI Multiple Charging of Proteins and Protein Complexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, 21, 127-131.
- [24] Sterling, H.J.; Daly, M.P.; Feld, G.K.; Thoren, K.L.; Kintzer, A.F.; Krantz, B.A.; Williams, E.R. Effects of Supercharging Reagents on Noncovalent Complex Structure in Electrospray Ionization from Aqueous Solutions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, 21, 1762-1774.
- [25] Valeja, S.G.; Tipton, J.D.; Emmett, M.R.; Marshall, A.G. New Reagents for Enhanced Liquid Chromatographic Separation and Charging of Intact Protein Ions for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2010, 82, 7515-7519.
- [26] Sterling, H.J.; Williams, E.R. Real-Time Hydrogen/Deuterium Exchange Kinetics via

ANNEXES

Supercharged Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2010, 82, 9050-9057.

[27] Hogan, C.J. Jr.; Loo, R.R.; Loo, J.A.; de la Mora, J.F. Ion mobility–mass spectrometry of phosphorylase B ions generated with supercharging reagents but in charge-reducing buffer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, 12, 13476-13483.

[28] Yin, S.; Loo, J.A. Top-down mass spectrometry of supercharged native protein–ligand complexes. *Int. J. Mass Spectrom.* 2011, 300, 118-122.

[29] Sterling, H.J.; Cassou, C.A.; Trnka, M.J.; Burlingame, A.L.; Krantz, B.A.; Williams, E.R. The role of conformational flexibility on protein supercharging in native electrospray ionization. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, 13, 18288-18296.

[30] Douglass, K.A.; Venter, A.R. Investigating the Role of Adducts in Protein Supercharging with Sulfolane. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012, 23, 489-497.

[31] Miladinovic, S.M.; Fornelli, L.; Lu, Y.; Piech, K.M.; Girault, H.H.; Tsybin, Y.O. In-Spray Supercharging of Peptides and Proteins in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2012, 84, 4647-4651.

[32] Kebarle, P.; Peschke, M. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta* 2000, 406, 11-35.

[33] Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, 804-817.

[34] Felitsyn, N.; Peschke, M.; Kebarle, P. Origin and number of charges observed on multiply-protonated native proteins produced by ESI. *Int. J. Mass Spectrom.* 2002, 219, 39-62.

[35] CRC Handbook of Chemistry and Physics. In [Online] 89th ed.; D.R. Lide, Ed. 2008–2009.

- [36] Kharlamova, A.; Prentice, B.M.; Huang, T.-Y.; McLuckey, S.A. Electrospray Droplet Exposure to Gaseous Acids for the Manipulation of Protein Charge State Distributions. *Anal. Chem.* 2010, 82, 7422-7429.
- [37] Brahim, B.; Alves, S.; Cole R.B.; Tabet J.-C. Signal and Charge Enhancement of DNA Single Strands in Negative Electrospray Ionization using the Supercharging Reagent meta-Nitrobenzylalcohol. *ASMS 60th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* (Vancouver, 2012), Thursday Poster 201
- [38] Limbach, P.A.; Crain, P.F.; McCloskey, J.A. Characterization of oligonucleotides and nucleic acids by mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology* 1995, 6, 96-102.
- [39] Crain, P.F.; McCloskey, J.A. Applications of mass spectrometry to the characterization of oligonucleotides and nucleic acids. *Current Opinion in Biotechnology* 1998, 9, 25-34.
- [40] Esmans, E.L.; Broes, D.; Hoes, I.; Lemièr, F.; Vanhoutte, K. Liquid chromatography–mass spectrometry in nucleoside, nucleotide and modified nucleotide characterization. *J. Chromatogr. A* 1998, 794, 109-127.
- [41] Wu, J.; McLuckey, S.A. Gas-phase fragmentation of oligonucleotide ions. *Int. J. Mass Spectrom.* 2004, 237, 197-241.
- [42] Alves, S.; Woods, A.; Tabet, J.-C. Charge state effect on the zwitterion influence on stability of non-covalent interaction of single-stranded DNA with peptides. *J. Mass Spectrom.* 2007, 42, 1613-1622.
- [43] Banoub, J.H.; Newton, R.P.; Esmans, E.; Ewing, D.F.; Mackenzie, G. Recent Developments in Mass Spectrometry for the Characterization of Nucleosides, Nucleotides, Oligonucleotides, and Nucleic Acids. *Chem. Rev.* 2005, 105, 1869-1915.
- [44] Rosu, F. ; Pirotte, S. ; De Pauw, E. ; Gabelica, V. Positive and negative ion mode ESI-MS

ANNEXES

and MS/MS for studying drug-DNA complexes. *Int. J. Mass Spectrom.* 2006, 253, 156-171.

[45] Sannes-Lowery, K.A.; Mack, D.P.; Hu, P.F.; Mei, H.Y.; Loo, J.A. Positive ion electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997, 8, 90-95

[46] Boschenok, J.; Sheil, M.M. Electrospray tandem mass spectrometry of nucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 144-149

[47] Vrkcic, A.K.; O'Hair, R.A.J.; Foote, S.; Reid, G.E. Fragmentation reactions of all 64 protonated trimer oligodeoxynucleotides and 16 mixed base tetramer oligodeoxynucleotides via tandem mass spectrometry in an ion trap. *Int. J. Mass Spectrom.* 2000, 194, 145-164

[48] Wang, P.P.; Bartlett, M.G.; Martin, L.B. Electrospray collision-induced dissociation mass spectra of positively charged oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997, 11, 846-856.

[49] Weimann, A.; Iannitti-Tito, P.; Sheil, M.M. Characterisation of product ions in high-energy tandem mass spectra of protonated oligonucleotides formed by electrospray ionisation. *Int. J. Mass Spectrom.* 2000, 194, 269-288.

[50] Hakansson, K.; Hudgins, R.R.; Marshall, A.G.; O'Hair, R.A.J. Electron capture dissociation and infrared multiphoton dissociation of oligodeoxynucleotide dications. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003, 14, 23-41.

[51] Alves, S.; Woods, A.; Delvolve, A.; Tabet, J.-C. Influence of salt bridge interactions on the gas-phase stability of DNA/peptide complexes. *Int. Journ. Mass Spectrom.* 2008, 278, 122-128.

[52] Hunter, E.P.; Lias, S.G. Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules: An Update. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1998, 27, 3, 413-656.

- [53] Griffey, R.H.; Sasmor, H.; Greig, M.J. Oligonucleotide Charge States in Negative Ionization Electrospray-Mass Spectrometry Are a Function of Solution Ammonium Ion Concentration. *J. Am. Mass Spectrom.* 1997, 8, 155-160.
- [54] Favre, A.; Gonnet, F.; Tabet, J.-C. Location of Negative Charges of Single-Stranded DNA in the Gas Phase. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2000, 6, 389-396.
- [55] Greco, F.; Liguori, A.; Sindona, G.; Uccella, N. Gas-Phase Proton Affinity of Deoxyribonucleosides and Related Nucleobases by Fast Atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 11, 9092-9096.
- [56] Strittmatter, E.F.; Schnier, P.D.; Klassen, J.S.; Williams, E.R. Dissociation Energies of Deoxyribose Nucleotide Dimer Anions Measured Using Blackbody Infrared Radiative Dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999, 10, 1095–1104.
- [57] Xu, Y.; Afonso, C.; Gimbert, Y.; Fournier, F.; Dong, X.; Wen, R.; Tabet, J.-C. Gas phase self-association of Eudistomin U controlled by gas phase acidity and origin of its interaction with nucleobases. *Int. J. Mass Spectrom.* 2009, 286, 43-52.
- [58] Madsen J.A. ; Brodbelt J.S. Asymmetric Charge Partitioning upon Dissociation of DNA Duplexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, 21, 1144-1150.
- [59] Gidden, J.; Bowers, M.T. Gas-Phase Conformations of Deprotonated Trinucleotides (dGTT⁻, dTGT⁻, and dTTG⁻): The Question of Zwitterion Formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003, 14, 161-170.
- [60] Robertazzi, A.; Platts, J.A. Gas-Phase DNA Oligonucleotide Structures, A QM/MM and Atoms in Molecules Study. *J. Phys. Chem. A* 2006, 110, 3992-4000.
- [61] Balbeur, D.; Widart, J.; Leyh, B.; Cravello, L.; De Pauw, E. Detection of Oligonucleotide Gas-Phase Conformers: H/D Exchange and Ion Mobility as Complementary Techniques. *J. Am.*

ANNEXES

Soc. Mass Spectrom. 2008, 19, 938-946.

[62] Hardman, M.; Makarov, A.A. Interfacing the Orbitrap Mass Analyzer to an Electrospray Ion Source. *Anal. Chem.* 2003, 75, 1699-1705.

[63] Olsen, J.V.; de Godoy, L.M.F.; Li, G.; Macek, B.; Mortensen, P.; Peach, R.; Makarov, A.; Lange, O.; Horning, S.; Mann, M. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. *Molecular and cellular Proteomics* 2005, 4(12), 2010-2021.

[64] Hu, Q.; Noll, R.J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Cooks, R.G. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 2005, 40, 430-443.

[65] Wang, G.; Cole, R.B. Effect of Solution Ionic Strength on Analyte Charge State Distributions in Positive and Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 1994, 66, 3702-3708.

[66] Oberacher, H.; Oefner, P.J.; Mayr, B.M.; Huber, C.G.; Parson, W. Applicability of Tandem Mass Spectrometry to the Automated Comparative Sequencing of Long-Chain Oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, 15, 510-522.

[67] Oberacher, H.; Pitterl, F. On the Use of ESI-QqTOF-MS/MS for the Comparative Sequencing of Nucleic Acids. *Biopolymers* 2009, 91, 401-409.

ANNEXES

Annexe 2 : (2^e publication) Positive and Negative Ion Mode Comparison for the Determination of DNA/Peptide Non-covalent Binding Sites, *Submitted (2013)*

Positive and Negative Ion Mode Comparison for the Determination of
DNA/Peptide Non-covalent Binding Sites

Bessem BRAHIM, Sandra ALVES, Jean-Claude TABET

Institut Parisien de Chimie Moléculaire, Equipe de Chimie Structurale Organique et Biologique,
Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 7201, 4 place Jussieu, 75252 cedex 05, Paris,
France

Address reprint requests to:

Jean-Claude Tabet

Institut Parisien de Chimie Moléculaire (UMR 7201)

Université Pierre et Marie Curie

4 place Jussieu, 75252 cedex 05, Paris, France

Phone : +33.1.44.27.44.95

Fax : +33.1.44.27.38.43

Email : jean-claude.tabet@upmc.fr

Keywords: Gas-phase fragmentation; Non-covalent complex stability; Salt bridge interactions;
« Three-body » non-covalent fragment ions; Internal nucleic loss; Gas-phase zwitterions

Abstract

Gas-phase fragmentation of single stranded DNA-peptide non-covalent complexes (NCX) is investigated in both positive and negative electrospray ionization (ESI) modes. Collision induced dissociation (CID) experiments performed in positive ion mode on the NCX precursor ions have confirmed the trend previously observed in negative ion mode (Alves et al., J. Mass Spectrom., 2007, 42, 1613-1622) *i.e.*, a higher stability for NCX containing most basic peptidic residues (*i.e.*, R > K) and most acidic nucleotide units (*i.e.*, Thy units), certainly incoming from the existence of gas phase salt bridge interactions (SBI). Independently of the ion polarity, stable NCX precursor ions were found to dissociate preferentially through covalent bond cleavages of the oligonucleotide and the resulting DNA fragment ions still linked to the peptide, were systematically mostly composed of Thy units. Additionally, the loss of an internal nucleic fragment producing “three-body” non-covalent fragment ions were observed under collisions and investigated in both ion polarities. The identical fragmentation patterns (regardless to the relative fragment ion abundance) observed in both polarities has shown a commune location of SBI certainly preserved from solution. Nevertheless, most abundant non-covalent fragments ions (and particularly three-body ones) are observed from multiply protonated NCX. Therefore, we assume that, independently of the ion polarity, covalent bond cleavages from single stranded DNA/peptide complexes relies on excess of positive charges which induced a larger number of protonated nucleobases of positively charged DNA single strands than that present in negative ion mode.

Introduction

Non-covalent interactions (*NCI*)¹ are determining features of the three-dimensional structures adopted by proteins and nucleic acids in living organisms. *NCI* are involved in most of biological processes in which biomolecules bind specifically but transiently to one another and thus determine both specificity and selectivity of a biological activity. Since the beginning of desorption/ionization methods, gas-phase (*GP*) studies of biological non-covalent complexes (*NCX*) represented a promising analytical approach to probe directly such intermolecular interactions². Several levels of analysis in the investigation of solvent-free non-covalently linked biomolecules have been successfully performed, including: (i) measurements of specific stoichiometry³ and (ii) that of binding affinities⁴, (iii) identification of binding interface region⁵ and also (iv) determination of complex global structures and the influence of their modifications on binding stability⁶. The study of non-covalent macromolecular systems was systematically developed with both desorption/ionization MALDI^{7,8} and ESI⁹ techniques. Nevertheless, ESI and nanoelectrospray modes are still the preferred ionization techniques for mass spectrometry (*MS*) detection of *NCX*¹⁰. Successful use of ESI technique has been extensively reported to deliver non-covalent biomolecular complexes from solution into *GP* as naked non-covalently bonded ionic species¹¹.

However, majority of these studies do not address the question whether the structure of the *GP* complex is similar to its initial solution-phase structure. In fact, the transition from solution to gas phase is not a trivial phenomenon for macromolecules. Numerous successful *NCX* studies were achieved to evidence the capability of electrospray technique to preserve non-covalent bonds but also pre-existing conformations; thanks to their soft desolvation processes in rapid time-of-frame of the *MS* technique. Protein folding and *NCX* conformations were assumed to be roughly stabilized by water molecules until the last stages of ESI interface¹². Nevertheless, local perturbations of the *NCX* conformations might happen upon removal of solvent molecules and it is generally assumed that intact (and/or at least partially preserved) ionic complexes arise from memory effects of ESI technique. Alternative indirect *MS* approaches such as chemical derivation were developed to probe more accurately *NCX* structures¹³. For example, hydrogen/deuterium exchanges (*HDX*) performed whether in solution or in the gas phase¹⁴ and combined with *MS* studies allow a better comprehension of mechanistic aspects without

ANNEXES

modification of the NCI characteristics. Ion mobility chromatography coupled with mass spectrometry (*IM-MS*) is another powerful technique¹⁵ for investigating the GP structures of biomolecules and that of their complexes. This latest approach gave conclusive evidences that protein native conformations can be preserved in the absence of bulk water and *IM-MS* allowed to differentiate population of coexisting protein conformational states *i.e.*, from folded until fully denatured. The preservation of helicoidal conformation of duplexes¹⁶ (larger than 12-mer single-strands) or folded tertiary and quaternary conformation of proteins¹⁷ in the gas phase has been also proven by using *IM-MS* approaches.

Nevertheless, accurate nature and location of the binding sites is another level of investigations, which is less straightforward. Unambiguous *ab-initio* calculations are limited for large size biomolecules whereas only few *MS*-based experimental approaches have been reported to evidence *NCX* binding sites and eventually strength. Tandem mass spectrometry (*MS/MS*) appears as a valuable technique for intermolecular interaction investigations¹⁸. *MS/MS* experiments of *NCX* have shown to be capable of assessing the stoichiometry, the connectivity and structural details, *e.g.* the resolution of structural ambiguities and/or the location of binding sites of non-covalent assemblies such as protein multimers or protein-ligand complexes^{19,20}.

Most biological NCI in GP are ensured either by hydrogen bond interactions (*HBI*) or eventually by salt-bridge interactions (*SBI*) certainly depending on gas-phase thermo chemical state functions of binding sites. Since *HBI* involve similar chemical functions (*i.e.*, characterized by close proton affinity or gas-phase acidity values)²¹, we can consider the canonic form of the partners linked through dipole-dipole or ion-dipole bonds into the complex ions. In contrast, *SBI* involve a highly acidic function and a highly basic function on each molecular partner, thus produce systematically a local positive and a local negative charge (ion-ion bond) independently of the net charge of the studied species and consequently induce a zwitterion form at least of one partners. Given that both NCI are stabilized for solvent-free complex species, the main stack for *MS* studies is to differentiate one from the other. Fragmentation studies of negatively-charged DNA-peptide complex ions have previously suggested the presence of *SBI* as the cement of strong *NCX* stability^{22,23}.

In the present study, we compared collision-induced dissociation (*CID*) results for DNA-peptide complexes obtained in positive and negative ion modes and demonstrated that similar fragmentation patterns are consistent with the preservation of similar binding nature and

location. The peptide appears to be fixed to a given DNA position dictated by its solution phase structure. Afterwards, the enhancement of electrostatic interactions in GP enables DNA-peptide NCI to be locked in place and allows further probing by MS/MS experiments. More surprisingly, CID spectra of DNA-peptide NCX species displayed non-covalently bonded fragment ions that underwent multiple DNA backbone cleavages while preserving such ionic interactions in both positive and negative ion polarities^{22,23}, suggesting the preservation of in-solution salt bridge binding independently of the considered charge state but with a GP fragmentation patterns modulated by the charge state and its nature (under GP thermo-chemical control).

Experimental section

Peptide and DNA sample preparation

Modified bradykinin peptides (PPGFSPFKK and PPGFSPFRR sequences, respectively denoted as **-KK** and **-RR**) and adrenocorticotrophic hormone fragment **11-24** (KPVGKKRRPVKVYP, denoted as **(11-24)**) were purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland) and dissolved in Milli-Q water (10M Ω) to a final concentration of 15 μ M (from stock solution at 500 μ g.mL⁻¹). 12-mer DNA single strands (T₁₀G₂, T₅G₂T₃G₂ and T₂(CG)₂AGT₄) with 5' and 3' hydroxyl terminal groups were obtained from EUROFINs MWG Biotech (Ebersberg, Germany) and were prepared without further purification, in Milli-Q water (10M Ω) in 20mM ammonium acetate to a final concentration of 10 μ M (stock aqueous solution at 500 μ g.mL⁻¹). All other chemicals have been purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (St Quentin Fallavier, France). The peptide–DNA mixtures (2/1:v/v in positive ion mode and 1/2:v/v in negative ion mode) were prepared using Milli-Q water (10M Ω) in 20 mM ammonium acetate, HPLC grade methanol (50/50, v/v) mixture and was injected at a flow rate of 5 μ L/min.

Mass spectrometric experiments

Experiments were performed using an electrospray source in both negative and positive ion mode combined with an LTQ-Orbitrap hybrid instrument (ThermoFisher, San Jose, CA). The proof-of-principle of the Orbitrap was first described by Hardman and Makarov²⁴ and is not discussed here. Briefly, the front part is a Linear Ion Trap as LTQ, capable of detecting MS or MS/MS spectra (but with low resolution). Ions can be further released into a curved C-trap (an r.f. only quadrupole), which accumulates and stores the ions. Then, they are consequently

ANNEXES

transferred to the Orbitrap, an electrostatic ion trap, which demonstrated a high resolving power and mass accuracy^{25,26}.

The general ionization conditions for positive and negative ion modes were respectively, as follows: accelerating voltage 4 kV and -3,8 kV; sheath gas flow 25 (ua); no auxiliary gas; ion transfer tube temperature 275 °C; capillary voltage 80V and -100V and a tube lens voltage 130 V and -150V. Full scan spectra were acquired in the Orbitrap analyzer with a theoretical mass resolving power of R_p of 60 000 at m/z 400, after ion accumulation to a target value of 10^5 and a mass range from m/z 200 to 2000 or from m/z 400 to 4000 (high mass range detection). For the CID spectra, the precursor complex ions were isolated for fragmentation in the linear ion trap and activated using collision-induced dissociation under the following conditions: variable normalized collision energy (in %); a default activation q value of 0.250 and a fixed activation time of 1.5 ms. The resulting fragments ions were recorded in the linear Ion Trap (after radial resonant ejection) or eventually in the Orbitrap cell. In the latter case, the fragment ions were recorded with high mass accuracy and high resolving power, So that the isotopic profiles allowed fragment ion identification based on monoisotopic peak annotation. All data were acquired using external calibration with a mixture of caffeine, MRFA peptide and Ultramark 1600 dissolved in Milli-Q water/ HPLC grade acetonitrile (50/50, v/v).

Results and Discussion

“Fig.1 near here”

Positive ESI mass spectra of peptide and oligonucleotide mixtures exhibited different charges states of (i) monomer (peptide and oligonucleotide) and (ii) NCX species. **Fig. 1** displays CID spectra of triply protonated NCX , as the most abundant species formed in positive ion ESI mode with **-KK** (**Fig. 1a, b** and **c**) or with **-RR** (**Fig. 1d, e**, and **f**) basic peptides with different single-stranded DNAs (*ssDNA*) *i.e.*, $T_{10}G_2$, $T_5G_2T_3G_2$ and $T_2CGCGAGT_4$ sequences. The comparison of CID spectra acquired with the same oligonucleotide sequence but with peptides varying only with their gas-phase basicity (*i.e.*, a higher GB value of **-RR** peptide can be assumed compared to the GB value of **-KK** peptide²⁷⁻²⁹) has highlighted two major NCX fragmentation pathways *i.e.*, by NCI disruption and/or by a covalent bond cleavage with NCI preservation. For example, the $[-\mathbf{KK}+T_2CGCGAGT_4+3H]^{3+}$ complex ion (at m/z 1548.2, labeled with a star in **Fig. 1c**) dissociates mainly through the non-covalent bonding disruption, into the

singly protonated peptide (at m/z 1004.6, labeled by an empty arrow in **Fig. 1c**), the doubly protonated DNA ($[\text{T}_2\text{CGCGAGT}_4+2\text{H}]^{2+}$ at m/z 1821.3, labeled by an filled arrow in **Fig. 1c**) and possibly, series of (a_i -B) and (w_i) DNA product ions (labeled by a cross in **Fig. 1c**, see **Table S3** in supporting information for peak annotation). Reversely, the complex $[-\text{RR}+\text{T}_2\text{CGCGAGT}_4+3\text{H}]^{3+}$ species (**Fig. 1f**) dissociates mainly through the cleavages of DNA covalent bonds without ionic interaction disruption (labeled by a circle or an equal sign in **Fig. 1f**, see **Table S3** in the supporting information). Indeed, *CID* experiments demonstrated the stronger GP stability of NCX involving the most basic arginine residues (*i.e.*, $-\text{RR}$ peptide) rather than ones containing lysine residues (*i.e.*, $-\text{KK}$ peptide) with the single stranded DNA.

Such fragmentation patterns have been already reported for analog multi-deprotonated DNA-peptide complex^{22,23}. Alves *et al.* similarly enlightened a great negatively-charged NCX stabilization for peptide containing R basic residues. The enhancement of non-covalent product ions (labeled by circle or an equal sign in **Fig.1d, e** and **f**) with R-containing peptide reflects the reinforcement of salt bridge bonds involving the protonated site of the higher $\Delta G^\circ_{\text{basic}}$ (*GB*) value (*i.e.*, amino-acid residue). Additionally, the presence of adjacent R residues reinforces salt bridge stability³⁰, thus the complex stability, as previously reported for multi deprotonated DNA-peptide complexes^{22,23} and DNA-polyamine complexes³¹, but also for positively charged peptide-peptide complexes^{32,33}.

The main difference observed between *CID* experiments performed for DNA-peptide complex ions is a greater DNA fragmentations observed in positive ion ESI mode compared to our previous results for negatively-charged analog NCX²³. In fact, the DNA sequences are characterized by different apparent gas-phase acidity ($\Delta G^\circ_{\text{app}}(\text{acid})$) values, in consequence the SBI strengths should differ (*e.g.*, a stronger precursor stability is observed for T-rich $[-\text{RR}+\text{T}_{10}\text{G}_2+3\text{H}]^{3+}$ complex ions in the **fig.1a**). They should be characterized by different GB_{app} values^{34,35} and in consequence the DNA backbone fragmentation patterns should vary. Indeed, DNA dissociation mechanisms are assumed by the first loss of nucleobase (good leaving group released either as charged or as neutral species), which induces further DNA backbone cleavages in positive ion mode³⁶⁻³⁸.

In our experiments, excess of positive charges favor the protonation of nucleobases and, consequently, DNA backbone cleavages without disruption of ionic bonds of NCX. Indeed, the most abundant non-covalent product ions correspond, as expected, to the cleavages of the DNA

ANNEXES

backbone initiated by the loss of the most basic nucleobases (*i.e.*, Gua > Cyt ≥ Ade) under kinetic and thermo-chemical control^{32,33}. All studied [NCX+3H]³⁺ involving the R-containing peptide were found to dissociate preferentially into a series of non-covalent singly and/or doubly charged as [Peptide+(d_i)+nH]ⁿ⁺, [Peptide+(a_i-B_i)+nH]ⁿ⁺ and [Peptide+(w_j)+nH]ⁿ⁺ product ions, in which oligonucleotide series of fragment ions (still non-covalently linked to the basic peptide) were systematically mostly composed of Thy nucleotide units, *e.g.* [(-RR)+(d₁₀-T)+2H]²⁺ at m/z 1996.98 for NCX involving T₁₀G₂ strand in the **Fig. 1d** (see also the **Table S1**), [(-RR)+(d₅)+2H]²⁺ and [(-RR)+(a₆-G)+2H]²⁺ respectively at m/z 1299.90 and 1339.92 are produced from [(-RR)+(T₅G₂T₃G₂)+3H]³⁺ precursor ions in the **Fig 1e** (see the **Table S2**), and [(-RR)+(w₄)+2H]²⁺ and [(-RR)+(w₆)+2H]²⁺ respectively at m/z 1147.88 and 1468.93 in **Fig. 1f** of [(-RR)+(T₂(CG)₂AGT₄)+3H]³⁺ CID spectra (see the **Table S3**).

Surprisingly, no peptide backbone fragmentation was observed in positive ion mode as non-covalent fragment ions, whereas a PP motif loss has been reported for analog negatively charged -RR peptide containing complexes^{22,23}. Such unexpected loss in NCX observed in negative ion mode was explained by the presence of excess of protons onto the negatively charged NCX (*i.e.*, and thus the existence of zwitterion structures). Given that excess of protons was expected to charge preferentially basic peptide in positive ESI mode (*e.g.*, R and P residues for -RR peptide), the absence of peptidic fragment ions suggests that charges held on the peptide do not induce further fragmentation, but were certainly involved into SBI. Therefore, additional positive charges located on protonated nucleobases guided the only DNA backbone cleavages leading to the abundant non-covalent fragment-ions observed upon resonant *CID* experiments of the studied multiply protonated NCX. These results confirm that stable SBI preferentially involve the most acidic site of the oligonucleotide (*i.e.* the phosphodiester group of thymidine nucleotide units³⁹) as the deprotonated site, binding with the protonated most basic site of the peptide (R residues) within an ion-ion interaction^{22,23}.

"Fig.2 near here"

More conclusive clues about non-covalent binding location were obtained from the clarification of an ambiguous peak attribution obtained with high resolution (Orbitrap) detection. **Fig. 2** displays enlarged *CID* spectra of triply protonated [(-RR) + (T₅G₂T₃G₂) + 3H]³⁺ NCX obtained with Orbitrap detection (theoretical R_p ~ 30000 at m/z 400; **Fig. 2a**) and LTQ detection (**Fig. 2b**) centered on the peak at m/z 1844.8. With the low resolution *CID* spectrum (**Fig. 2b**),

the peak at m/z 1844.8 was attributed to $[(T_5G_2T_3G_2)+2H]^{2+}$ monomeric species (theoretical doubly protonated average m/z ratio: $(m/z)_{avg}$ at 1845.2; and theoretical doubly protonated mono-isotopic m/z ratio: $(m/z)_{mono}$ at 1844.3), produced by the NCI disruption. In fact, the high resolution detection revealed that the experimental $(m/z)_{mono}$ value of 1844.97 (**Table S2**) *i.e.*, the product ions obtained by absolute loss of 1058.24 u from the NCX precursor ion. This loss of 1058.24 u corresponds to multiple cleavages of oligonucleotide covalent bonds while keeping the NCI *i.e.*, two possible isomer non-covalent fragment ions $[(-RR)+(a_6-Gua)+(w_5-d_{10})+2H]^{2+}$ and/or $[(-RR)+(d_5)+(w_5-a_{11}-Gua)+2H]^{2+}$ corresponding to internal and terminal nucleic losses, respectively of $[(w_6-a_7)+(Gua)+(z_2)]$ and $[(z_7-a_7)+(w_1)+(Gua)]$ fragments. Moreover, the peak attribution was confirmed by the surrounding peaks observed at plus and minus 80.01 u, which can also be attributed to analog multiple nucleic group losses (induced by multiple DNA bond cleavages), respectively annotated as $[(-RR)+(a_6-Gua)+(w_5-a_{11}-Gua)+2H]^{2+}$ at $(m/z)_{mono}$ 1884.98 (see the **Table S2**) and $[(-RR)+(d_5)+(w_5-d_{10})+2H]^{2+}$ at $(m/z)_{mono}$ 1804.96 (see the **Table S2**). Note that observation of such multiple oligonucleotide backbone cleavages implies that both remaining DNA fragments are still non-covalently linked to the peptide *i.e.*, at least through two strong NCI. Similarly to common detected non-covalent fragment ions (*i.e.*, a single oligonucleotide fragment ion linked to the peptide), these “three-body” non-covalent fragment ions are mostly composed of thymidine nucleotide units, which certainly imply a strong SBI binding between the very basic peptide by the strongest SBI within the most acidic site of the oligonucleotide (*i.e.*, the phosphate group of thymidine nucleotide units).

“Fig.3 near here”

Fig. 3 displays *CID* spectra of triply protonated and triply deprotonated NCX, most abundant NCX species formed in positive and negative ion ESI modes between $T_5G_2T_3G_2$ single strand and different basic peptides containing two consecutive R residues *i.e.*, RR dipeptide and ACTH fragment **11-24**. These peptides were chosen to evidence the influence of the peptide size on the eventual production of non-covalent fragment ions under *CID* conditions. Modified bradykin fragment **-RR** (9 residues) and RR dipeptide (2 residues) both are composed of the N-terminus group and two consecutive R residues as preferential protonable sites *i.e.*, for establishing possible ion-ion interactions with the oligonucleotide. Thus, they only differ by the number of amino-acids spacing the possible NCI interactions. On the other hand, ACTH fragment **11-24** proposes more basic sites spread on its full length for eventually, more ion-ion

ANNEXES

interactions with the oligonucleotide. Independently of the peptide sequence and length, *CID* spectra obtained under resonant activation conditions of all the NCX [(**Peptide**)+(T₅G₂T₃G₂)+3H]³⁺ ions displayed “three-body” non-covalent fragment ions (labeled by “=” sign in **Fig. 3**, see **Tables S4 and S5** in the supporting information). Interestingly, even NCX ions involving the RR dipeptide were found to interact strongly with DNA strands within at least two strong *NCI*, leading to a non-covalent [(**Peptide**)+(d₅)+(w_{5_d10})+2H]²⁺ fragment ion (see the **Table S4**). Again, NCX fragmentations demonstrated the preserved *SBI* between the basic peptide sites and preferentially Thy units of DNA sequence. The enhancement of non-covalent product ions (particularly that of “three-body” non-covalent fragment ions labeled with an equal sign in **Fig 3**) for NCX involving ACTH fragment **11-24** reflects the reinforcement of salt bridge bonds within the higher size of the peptide and the number of basic residue. Interestingly multiple nucleic group losses leading to a similar three-body non covalent [(**11-24**)+(a₆-G)+(w_{5_a11}-G)-2H]²⁻ fragment ions at (m/z)_{mono} 2178.69 (**Fig. 3d** and the **Table S5** in supporting information) were also detected in negative ion mode from very stable NCX [(**11-24**)+(T₅G₂T₃G₂)-3H]³⁻ precursor ions but with a much less abundance than its analog ions in positive ion mode (**Fig. 3b**, see **Table S5** in supporting information for peak annotation).

Additional *CID* experiments performed on [[(**11-24**)+(T₅G₂T₃G₂)-4H]⁴⁺ precursor ions does not display “three-body” non-covalent fragment ions but series of DNA fragment species linked to the peptide analogs to that detected for [[(**11-24**)+(T₅G₂T₃G₂)-3H]³⁻ species are observed (see **Table S6** in supporting information). In contrast, *CID* experiments on [(**11-24**)+(T₅G₂T₃G₂)+4H]⁴⁺ NCX ions displayed identical series of non covalent fragments ions to those obtained for [[(**11-24**)+(T₅G₂T₃G₂)+3H]³⁺ species with an increased abundance of “three-body” non-covalent fragment ions, highlighting the preservation of *SBI* with the charge state enhancement (no weakness of non covalent ionic interactions with an excess of protons). Moreover, the numerous fragmentations of the oligonucleotide without any peptidic fragmentation implies that excess of proton is located on the nucleobases. Correspondingly, similar non-covalent fragment ions are observed in negative ion mode with a decreased abundance of “three-body” non-covalent fragment ions. Therefore, we assume that, independently of the polarity, “three-body” and/or all non covalent fragment ions are incoming from similar mechanisms involving protonation of nucleobases which is much more favored in positive ion mode with an excess of protons than in negative mode where peptide zwitterion

structures allow presence of protonated binding site and SBI but eventually DNA zwitterions can be assumed for explaining the similar noncovalent fragment ions through DNA backbone cleavages.

Conclusion

CID spectra of positively charged NCX displayed common fragmentation pathways compared to their counterparts in negative ion mode *i.e.*, mostly covalent bond cleavages of the DNA backbone without disruption of the salt bridge interactions. Regardless to product ion relative abundances, almost identical series of fragment species were observed from NCX produced in each negative and positive ESI mode. Main differences observed being the lower extent of non covalent product ions in negative ion mode leading to shorter oligonucleotide fragments ions (than ones observed in positive ion mode) but still non-covalently linked to the peptide. These experimental observations demonstrated the presence of strong salt bridge interactions independently of the ionization polarity, but most importantly located at the same positions *i.e.*, the strongest ion-ion bonding being between the most basic R residue and the most acidic Thy nucleotides units. Afterwards, extent of covalent bond fragmentations relies on the excess of protons even in negatively-charged NCX (DNA zwitterion structures).

ANNEXES

References

- ¹ K.A. Sharp, B. Honig. Electrostatic Interactions in Macromolecules: Theory and Applications. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1990**, *19*, 301-329.
- ² J.L.P. Benesch, C.V. Robinson. Dehydrated but Unharmed. *Nature* **2009**, *462*(3), 576-577.
- ³ M. Sharon, C.V. Robinson. The Role of Mass Spectrometry in Structure Elucidation of Dynamic Protein Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 167-193.
- ⁴ J.M. Daniel, S.D. Friess, S. Rajagopalan, S. Wendt, R. Zenobi. Quantitative Determination of Non-covalent Binding Interactions Using Soft Ionization Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *216*, 1-27.
- ⁵ Y.J. Lee, L.L. Lackner, J.M. Nunnari, B.S. Phinney. Shotgun Cross-Linking Analysis for Studying Quaternary and Tertiary Protein Structures. *Journal of Proteome Research* **2007**, *6*, 3908-3917.
- ⁶ C.V. Robinson, E.W. Chung, B.B. Kragelund, J. Knudsen, R.T. Aplin, F.M. Poulsen, C.M. Dobson. Probing the Nature of Noncovalent Interactions by Mass Spectrometry, A Study of Protein-CoA Ligand Binding and Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8646-8653.
- ⁷ K. Tanaka, W. Hiroaki, I. Yutaka, A. Satoshi, Y. Yoshikazu, T. Yoshida, T. Matsuo. Protein and Polymer Analyses Up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*(8), 151-153.
- ⁸ M. Karas, F. Hillenkamp. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.
- ⁹ C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 675-679.
- ¹⁰ J.A. Loo. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 1-23.
- ¹¹ M. Peschke, U.H. Verkerk, P. Kebarle. Features of the ESI Mechanism that Affect the Observation of Multiply Charged Noncovalent Protein Complexes and the Determination of the Association Constant by the Titration Method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1424-1434.
- ¹² K. Breuker, F.W. McLafferty. Stepwise Evolution of Protein Native Structures with Electrospray into the Gas Phase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*(47), 18145-18152.

- ¹³ Y.J. Lee, L.L. Lackner, J.M. Nunnari, B.S. Phinney. Shotgun Cross-Linking Analysis for Studying Quaternary and Tertiary Protein Structures, *Journal of Proteome Research* **2007**, *6*, 3908-3917.
- ¹⁴ I.A. Kaltashov. Probing Protein Dynamics and Function Under Native and Mildly Denaturing Conditions with Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *240*, 249-259.
- ¹⁵ C.S. Creaser, J.R. Griffiths, C.J. Bramwell, S. Noreen, C.A. Hillb, C.L.P. Thomas. Ion Mobility Spectrometry: a review. Part 1. Structural Analysis by Mobility Measurement. *Analyst* **2004**, *129*, 984-994.
- ¹⁶ J. Gidden, E.S. Baker, A. Ferzoco, M.T. Bowers. Structural Motifs of DNA Complexes in the Gas Phase. *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *240*, 183-193.
- ¹⁷ C.S. Kaddis, S.H. Lomeli, S. Yin, B. Berhane, M.I. Apostol, V.A. Kickhoefer, L.H. Rome, J.A. Loo. Sizing Large Proteins and Protein Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Ion Mobility. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1206-1216.
- ¹⁸ A.S. Woods, S. Ferre. Amazing Stability of the Arginine-Phosphate Electrostatic Interaction. *Journal of Proteome Research* **2005**, *4*, 1397-1402.
- ¹⁹ S. Yin, J.A. Loo. Elucidating the Site of Protein-ATP Binding by Top-Down Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 899-907.
- ²⁰ K. Pagel, S.-J. Hyung, B.T. Ruotolo, C.V. Robinson. Alternative Dissociation Pathways Identified in Charge-Reduced Protein Complex Ions. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5363-5372.
- ²¹ M. Meot-Ner (Mautner). The Ionic Hydrogen Bond. *Chem. Rev.* **2005**, *105(1)*, 213-284.
- ²² S. Alves, A. Woods, J.-C. Tabet. Charge State Effect on the Zwitterion Influence on Stability of Non-covalent Interaction of Single-stranded DNA with Peptides. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 1613-1622.
- ²³ S. Alves, A. Woods, A. Delvolve, J.-C. Tabet. Influence of Salt Bridges Interactions on the Gas-phase Stability of DNA/Peptide Complexes, *Int. J. Mass Spectrom.* **2008**, *278*, 122-128.
- ²⁴ M. Hardman, A.A. Makarov. Interfacing the Orbitrap Mass Analyzer to an Electrospray Ion Source. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1699-1705.
- ²⁵ Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R.G. Cooks. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 430-443.

ANNEXES

- ²⁶ J.V. Olsen, L.M.F. de Godoy, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Peach, A. Makarov, O. Lange, S. Horning, M. Mann. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. *Molecular and cellular Proteomics* **2005**, *4*(12), 2010-2021.
- ²⁷ A.G. Harrison. The Gas-phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acids and Peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, **1997**, *16*, 201–217.
- ²⁸ C. Afonso, F. Modeste, P. Breton F. Fournier J.-C. Tabet. Proton affinities of the commonly occurring L-amino acids by using electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2000**, *6*, 443-449.
- ²⁹ S. Gronert, D.C. Simpson, K.M. Conner. A Reevaluation of Computed Proton Affinities for the Common α -Amino Acids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 2116-2123.
- ³⁰ J.S. Prell, J.T. O'Brien, J.D. Steill, J. Oomens, E.R. Williams. Structures of Protonated Dipeptides: The Role of Arginine in Stabilizing Salt Bridges. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11442–11449.
- ³¹ P. Terrier, J. Tortajada, G. Zin, W. Buchmann. Noncovalent Complexes Between DNA and Basic Polypeptides or Polyamines by MALDI-TOF. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1977–1989.
- ³² A.S. Woods, K. Fuhrer, M. Gonin, T. Egan, M. Ugarov, K.J. Gillig, J.A. Schultz. Angiotensin II–Acetylcholine Non-covalent Complexes Analyzed With MALDI– Ion Mobility–TOF MS. *Journal of Biomolecular Techniques* **2003**, *14*, 1-8.
- ³³ A.S. Woods, M.A. Huestis. A Study of Peptide–Peptide Interaction by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 88–96.
- ³⁴ F. Greco, A. Liguori, G. Sindona, N. Uccella. Gas-Phase Proton Affinity of Deoxyribonucleosides and Related Nucleobases by Fast Atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *11*, 9092-9096.
- ³⁵ E.F. Strittmatter, P.D. Schnier, J.S. Klassen, E.R. Williams. Dissociation Energies of Deoxyribose Nucleotide Dimer Anions Measured Using Blackbody Infrared Radiative Dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 1095–1104.
- ³⁶ P. Wang, M.G. Bartlett, L.B. Martin. Electrospray Collision-induced Dissociation Mass Spectra of Positively Charged Oligonucleotides. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 846–856.

³⁷ A.K. Vrkic, R.A.J. O'Hair, S. Foote, G.E. Reid. Fragmentation reactions of all 64 protonated trimer oligodeoxynucleotides and 16 mixed base tetramer oligodeoxynucleotides via tandem mass spectrometry in an ion trap. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *194*, 145-164.

³⁸ A. Weimann, P. Iannitti-Tito, M.M. Sheil. Characterisation of product ions in high-energy tandem mass spectra of protonated oligonucleotides formed by electrospray ionisation. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *194*, 269-288.

³⁹ M.T. Rodgers, S. Campell, E.M. Marzluff, J.L. Beauchamp. Low-energy collision-induced dissociation of deprotonated nucleotides: determination of energetically favored dissociation pathways and relative acidities of the nucleic acid bases. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1994**, *137*, 121-149.

Figures Captions

Fig. 1 CID spectra of triply protonated oligonucleotide-peptide $[-\mathbf{KK}+\text{DNA}+3\text{H}]^{3+}$ complexes formed with (a) T_{10}G_2 , (b) $\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2$, (c) $\text{T}_2(\text{CG})_2\text{AGT}_4$ oligonucleotide sequences and triply protonated DNA-peptide $[-\mathbf{RR}+\text{DNA}+3\text{H}]^{3+}$ complexes formed with (d) T_{10}G_2 , (e) $\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2$, (f) $\text{T}_2(\text{CG})_2\text{AGT}_4$ sequences, respectively. All precursor complex ions (labeled with a star “*”) were resonantly activated and analyzed in the LTQ analyzer under various normalized collision energy (*i.e.*, excitation value was chosen to keep one third of precursor ion relative intensity) with an isolation window of 2 u. Further fragment ions were detected in the LTQ analyzer. Peaks labeled with an empty arrow (“ \Rightarrow ”), a filled arrow (“ \rightarrow ”) and a cross (“x”) underwent NCI disruption and correspond respectively to the singly protonated peptides, the doubly protonated single strands and to the consecutive DNA fragment ions. Peaks labeled with a circle (“O”) or an equal sign (“=”) underwent DNA covalent bond fragmentation without NCI disruption. Note that braces do not represent zoomed areas but are used for common peak annotations. **Tables S1 to S3** of the supplementary information reported monoisotopic m/z ratios, relative abundances and attributions of fragment ions obtained upon LTQ-CID activation and Orbitrap detection of all NCX precursor ions reported in the Fig 1.

Fig. 2 Enlarged CID spectra of triply protonated $[-\mathbf{RR}+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)+3\text{H}]^{3+}$ (m/z 1583.06) NCX centered at m/z 1850 detected using high resolution **Orbitrap** analyzer (with a theoretical resolving power of $R_p \sim 15,000$ at m/z 400 in the **Fig. 2a**) and using the low resolution **LTQ** cell in the **Fig. 2b**.

Fig. 3 CID spectra of triply protonated single strand-peptide $[(\text{Peptide})+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)+3\text{H}]^{3+}$ complexes formed with (a) dipeptide RR, (b) ACTH fragment (**11-24**) peptide and the analog triply deprotonated single strand-peptide $[(\text{Peptide})+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)-3\text{H}]^{3-}$ complexes formed with (c) dipeptide RR, (d) ACTH fragment (**11-24**). All precursor ion (labeled with a star “*”) were resonantly activated in the LTQ analyzer with various normalized collision energy and an isolation window of 2 u. Further fragment ions were detected into the Orbitrap cell. Peaks labeled with an empty arrow (“ \Rightarrow ”), a filled arrow (“ \rightarrow ”) and a cross (“x”) underwent NCI disruption and correspond respectively to the singly protonated peptides, the doubly protonated single strands and to the consecutive DNA fragment ions. Peaks labeled with a circle (“O”) or an equal sign (“=”) underwent DNA covalent bond fragmentation without NCI disruption. **Tables S4 to S5** of the supplementary information present monoisotopic m/z ratios, relative abundances and attributions of fragment ions obtained upon LTQ-CID activation and Orbitrap detection of all NCX precursor ions reported in the Fig 3.

Figures

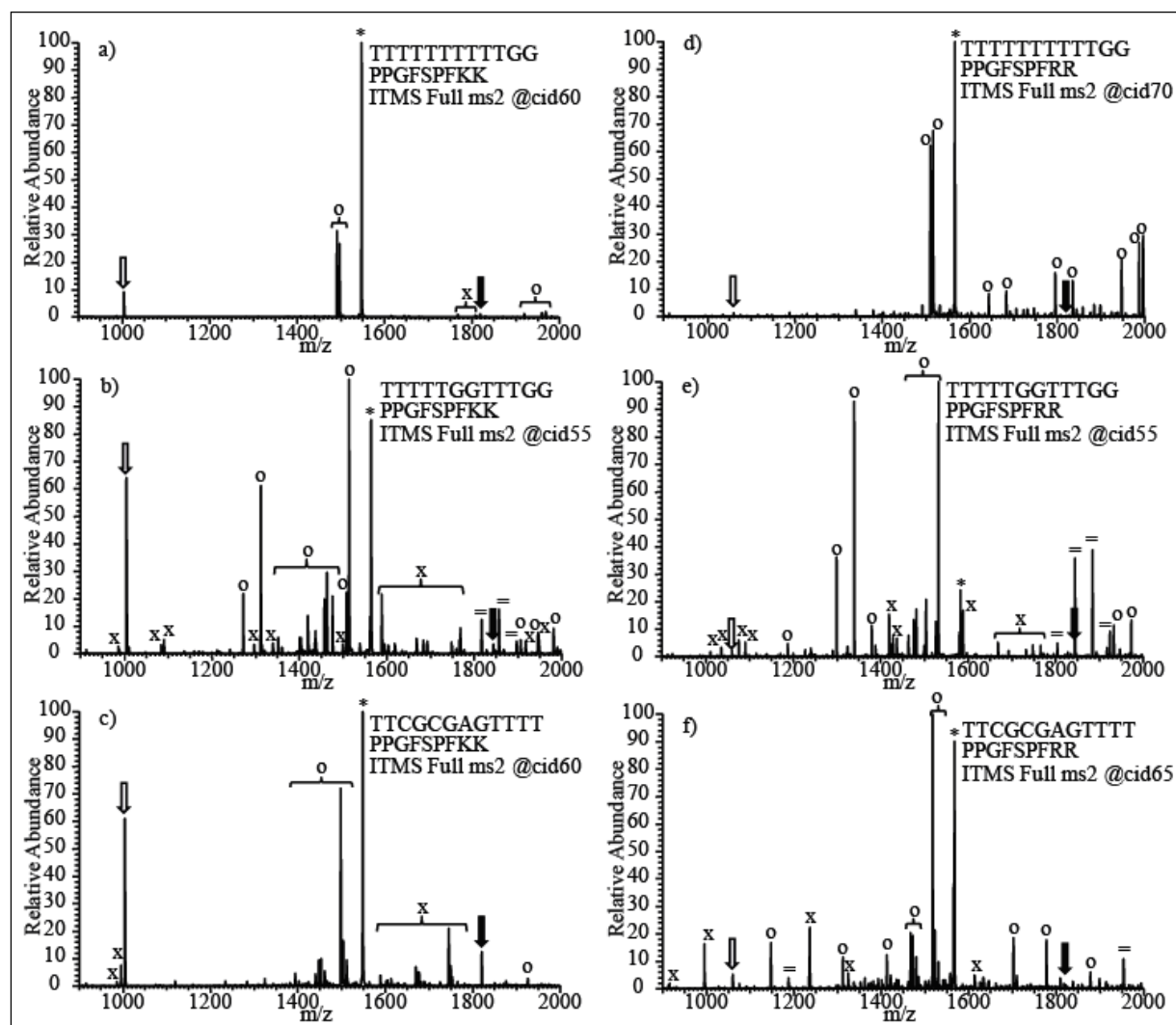


Fig. 1

ANNEXES

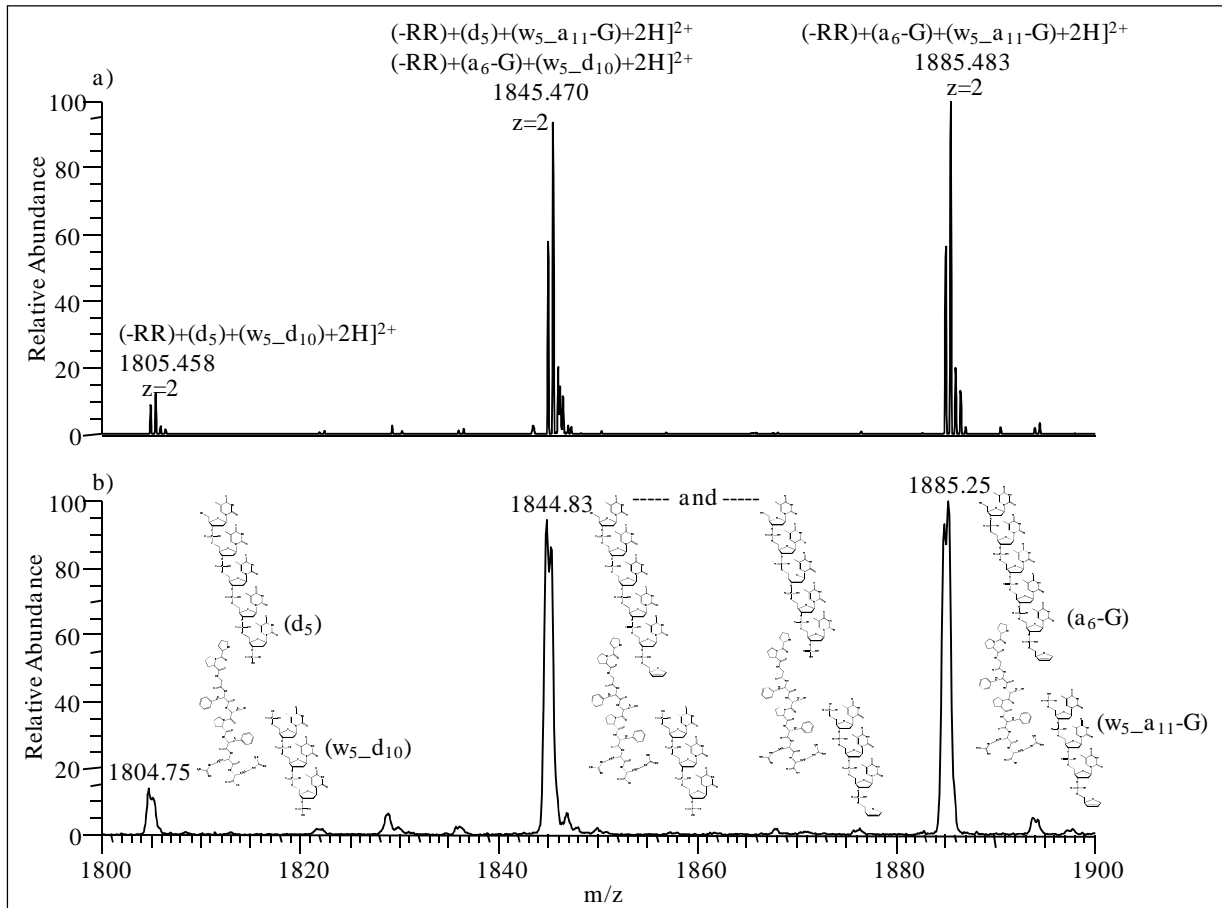
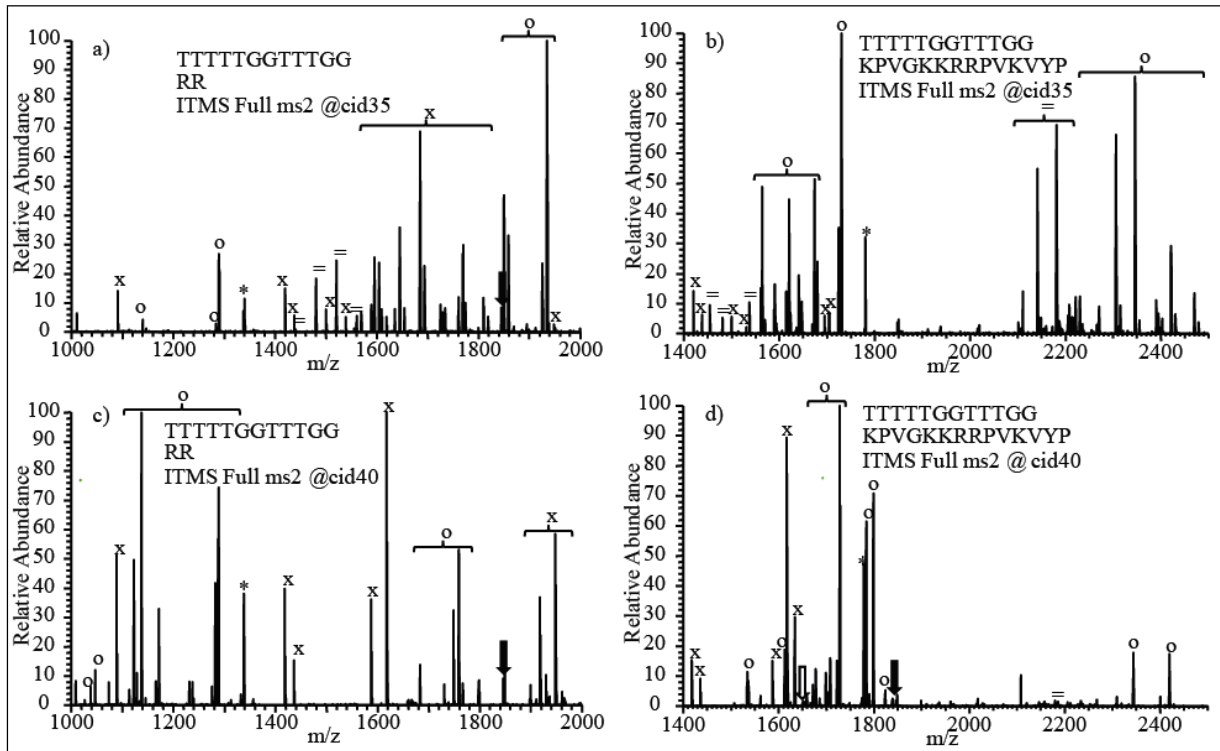


Fig. 2

**Fig. 3**

ANNEXES

Supporting informations

Tables S1 to S6 present monoisotopic m/z ratio, relative abundance and attribution of fragment ions obtained upon CID activation and Orbitrap high resolution detection of various peptide/DNA non-covalent complexes. The left columns display monomeric fragment ions that underwent NCI disruption as, the protonated peptides (in **bold** characters), the doubly protonated single strands (in **bold** characters) and the possible* consecutive DNA fragments. The right columns display fragment ions that underwent covalent bond fragmentations without NCI disruption: the precursor ions (underlined characters), the non-covalent ions containing one DNA fragment and the non-covalent ions containing two DNA fragments as three-body product ions (label by “=” sign). *In fact, series of DNA product ions can also be produced from consecutive dissociations of non covalent fragments ions e.g., a non covalent [(Peptide)+(w_i)+2H]²⁺ product ions from NCX can further dissociates into [(w_i)+2H]²⁺ and/or [(w_i)+H]⁺.

Table S1: monoisotopic m/z ratio, relative abundance and attribution of fragment ions obtained upon CID activation from [(Peptide)+(T₁₀G₂)+3H]³⁺ with peptide as **-KK** (PPGFSPFKK sequence) or **-RR** (PPGFSPFRR sequence). *Note that labeled relative abundance on the left column corresponds eventually to “three-body” non covalent fragment ions.

	[(Peptide)+(T ₁₀ G ₂)+3H] ³⁺					
	Monomeric product ions (NCI disruption)			Non covalent fragment ions (NCI conservation)		
	(m/z) _{mono}	% relative abundance	attribution	(m/z) _{mono}	% relative abundance	attribution
(-KK) (detected from fig 1a)	1004.56	9	[(-KK)+H]⁺	1491.37	30	<u>[(-KK)+(a₁₂-Gua)+3H]³⁺</u>
				1497.38	26	<u>[(-KK)+(T₁₀G₂)-(Gua)+3H]³⁺</u>
				<u>1547.73</u>	<u>100</u>	<u>[(-KK)+(T₁₀G₂)+3H]³⁺</u>
(-RR) (detected from fig 1d)				1510.02	100	<u>[(-RR)+(a₁₂-Gua)+3H]³⁺</u>
				1516.03	96	<u>[(-RR)+(T₁₀G₂)-(Gua)+3H]³⁺</u>
				<u>1566.42</u>	<u>34</u>	<u>[(-RR)+(T₁₀G₂)+3H]³⁺</u>
				1643.95	< 5	[(-RR)+(a ₈ -Thy)+2H] ²⁺ or [(-RR)+(w ₁₁ _d ₈)+2H] ²⁺ or [(-RR)+(w ₁₀ _d ₉)+2H] ²⁺
				1683.94	< 5	[(-RR)+(w ₉ _a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺ or [(-RR)+(w ₁₀ _a ₁₀ -Gua)+2H] ²⁺ or [(-RR)+(w ₁₁ _a ₉ -Thy)+2H] ²⁺
				1795.93	7	[(-RR)+(a ₉ -Thy)+2H] ²⁺
				1835.95	6	[(-RR)+(w ₁₀ _a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺ or [(-RR)+(w ₁₁ _a ₁₀ -Thy)+2H] ²⁺
				1947.95	10	[(-RR)+(a ₁₀ -Thy)+2H] ²⁺
				1987.96	14	[(-RR)+(d ₁₀ -Thy)-(H ₂ O)+2H] ²⁺
				1996.98	14	[(-RR)+(d ₁₀ -Thy)+2H] ²⁺

Table S2: monoisotopic m/z ratio, relative abundance and attribution of fragment ions obtained upon CID activation from [(Peptide)+(T₅G₂T₃G₂)+3H]³⁺ with peptide as **-KK** (PPGFSPFKK sequence) or **-RR** (PPGFSPFRR sequence). *Note that labeled relative abundance on the left column corresponds eventually to “three-body” non covalent fragment ions.

	[(Peptide)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)+3H] ³⁺					
	Monomeric product ions (NCI disruption)			Non covalent fragment ions (NCI conservation)		
	(m/z) _{mono}	% relative abundance	attribution	(m/z) _{mono}	% relative abundance	attribution
(-KK) (detected from fig 1b)	1004.56	68	[(-KK)+H]⁺	1271.91	25	[(-KK)+(d ₅)+2H] ²⁺
	1091.16	8	[(w ₅ _a ₁₁ -Gua)+H] ⁺	1311.92	72	[(-KK)+(a ₆ -Gua)+2H] ²⁺
	1420.21	21	[(w ₅ _a ₁₂ -Gua)+H] ⁺	1351.94	6	[(-KK)+(d ₆ -H ₂ O)-(Gua)+2H] ²⁺
	1438.22	11	[(w ₅)-(Gua)+H] ⁺	1400.93	8	[(-KK)+(a ₇ -Gua)-(Gua)+2H] ²⁺
	1500.23	5	[(z ₆ -Gua_a ₁₂ -Gua)+H] ⁺	1436.43	11	[(-KK)+(d ₆)+2H] ²⁺
	1538.92	5	[(d ₅)+H] ⁺	1457.68	20	[(-KK)+(a ₁₂ -Gua)-(Gua)+3H] ³⁺
	1589.27	28	[(w ₅)+H] ⁺	1463.68	29	[(-KK)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-2(Gua)+3H] ³⁺
	1669.29	6	[(w ₁₀ _d ₇)+H] ⁺ or [(w ₆ -PO ₃ _a ₁₂ -Gua)+H] ⁺	1476.44	26	[(-KK)+(a ₇ -Gua)+2H] ²⁺
	1684.27	7	[(a ₁₂ -Gua)-(Gua)+2H] ²⁺	1508.04	26	[(-KK)+(a ₁₂ -Gua)+3H] ³⁺
	1693.27	7	[(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-2(Gua)+2H] ²⁺	1514.04	100	[(-KK)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-(Gua)+3H] ³⁺
	1768.78	10	[(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-(Gua)+2H] ²⁺	<u>1564.47</u>	<u>86</u>	[(-KK)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)+3H] ³⁺
	1918.31	5	[(w ₅)+H] ⁺	1816.96	15 (=)	[(-KK)+(d ₅)+(w ₅ _a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺ or [(-KK)+(a ₆ -Gua)+(w ₅ _d ₁₀)+2H] ²⁺
	1948.27	8	[(a ₇ -Gua)+H] ⁺	1856.96	20 (=)	(-KK)+(a ₆ -Gua)+(w ₅ _a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺
				1896.97	5 (=)	[(-KK)+(a ₆ -Gua)+(z ₆ -Gua_a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺ or [(-KK)+(d ₁₀ -H ₂ O)-2(Gua)+2H] ²⁺ (*)
			1905.96	6	[(-KK)+(d ₁₀)-2(Gua)+2H] ²⁺	
			1945.96	9	[(-KK)+(a ₁₁ -Gua)-2(Gua)+2H] ²⁺	
			1981.48	11	[(-KK)+(d ₁₀)-(Gua)+2H] ²⁺	
(-RR) (detected from fig 1e)	1091.15	6	[(w ₅ _a ₁₁ -Gua)+H] ⁺	1299.90	21	[(-RR)+(d ₅)+2H] ²⁺
	1420.20	15	[(w ₅ _a ₁₂ -Gua)+H] ⁺	1339.92	61	[(-RR)+(a ₆ -Gua)+2H] ²⁺
	1438.21	7	[(w ₅)-(Gua)+H] ⁺	1379.93	9	[(-RR)+(d ₆ -H ₂ O)-(Gua)+2H] ²⁺
	1589.25	12	[(w ₅)+H] ⁺	1476.36	8	[(-RR)+(a ₁₂ -Gua)-(Gua)+3H] ³⁺
				1482.36	12	[(-RR)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-2(Gua)+3H] ³⁺
				1504.44	9	[(-RR)+(a ₇ -Gua)+2H] ²⁺
				1526.71	15	[(-RR)+(a ₁₂ -Gua)+3H] ³⁺
				1532.71	100	[(-RR)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-(Gua)+3H] ³⁺
				<u>1583.06</u>	<u>6</u>	[(-RR)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)+3H] ³⁺
				1804.96	< 5 (=)	[(-RR)+(d ₅)+(w ₅ _d ₁₀)+2H] ²⁺
				1844.97	35 (=)	[(-RR)+(a ₆ -Gua)+(w ₅ _d ₁₀)+2H] ²⁺ or [(-RR)+(d ₅)+(w ₅ _a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺
				1884.98	37 (=)	[(-RR)+(a ₆ -Gua)+(w ₅ _a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺
				1924.99	8 (=)	[(-RR)+(a ₆ -Gua)+(z ₆ -Gua_a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺ or [(-RR)+(d ₁₀ -H ₂ O)-2(Gua)+2H] ²⁺ (*)
				1933.97	10	[(-RR)+(d ₁₀)-2(Gua)+2H] ²⁺
			1973.98	11	[(-RR)+(a ₁₁ -Gua)-2(Gua)+2H] ²⁺	

ANNEXES

Table S3: monoisotopic m/z ratio, relative abundance and attribution of fragment ions obtained upon CID activation from [(Peptide)+(T₂(CG)₂AGT₄+3H)]³⁺ with peptide as **-KK** (PPGFSPFKK sequence) or **-RR** (PPGFSPFRR sequence). *Note that labeled relative abundance on the left column corresponds eventually to “three-body” non covalent fragment ions.

	[(Peptide)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄ +3H)] ³⁺					
	Monomeric product ions (NCI disruption)			Non covalent fragment ions (NCI conservation)		
	(m/z) _{mono}	% relative abundance	attribution	(m/z) _{mono}	% relative abundance*	attribution
(-KK) (detected from fig 1c)	996.18	15	[(a ₄ -Gua)+H] ⁺	1448.36	11	[(-KK)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-2(Gua)+3H] ³⁺
	1004.55	72	[(-KK)+H]⁺	1453.69	9	[(-KK)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Gua)-(Ade)+3H] ³⁺
	1670.26	10	[(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-2(Gua)+2H] ²⁺	1461.70	5	[(-KK)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Gua)-(Cyt)+3H] ³⁺
	1674.44	6	[(a ₁₂ -Thy)-(Gua)+2H] ²⁺	1498.71	70	[(-KK)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Gua)+3H] ³⁺
	1678.26	6	[(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Gua)-(Ade)+2H] ²⁺	1504.04	15	[(-KK)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Ade)+3H] ³⁺
	1745.78	26	[(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Gua)+2H] ²⁺	1512.04	7	[(-KK)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Cyt)+3H] ³⁺
	1749.97	10	[(a ₁₂ -Thy)+2H] ²⁺	<u>1549.06</u>	<u>100</u>	<u>[(-KK)+(T₂(CG)₂AGT₄+3H]³⁺</u>
	1821.31	15	[(T₂(CG)₂AGT₄+2H]²⁺			
(-RR) (detected from fig 1f)	1235.20	51	[(w ₄)+H] ⁺	1147.88	16	[(-RR)+(w ₄ +2H)] ²⁺
	1325.23	6	[(a ₅ -Cyt)+H] ⁺	1312.41	8	[(-RR)+(w ₅ +2H)] ²⁺
	1565.25	25	[(w ₅)+H] ⁺	1413.03	10 (=)	[(-RR)+(a ₆ -Gua)+(w ₅ +3H)] ³⁺
	1614.28	6	[(a ₆ -Gua)+H] ⁺	1467.03	21	[(-RR)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-2(Gua)+3H] ³⁺
				1468.93	16	[(-RR)+(w ₆ +2H)] ²⁺
				1472.36	16	[(-RR)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Gua)-(Ade)+3H] ³⁺
				1480.36	9	[(-RR)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Gua)-(Cyt)+3H] ³⁺
				1517.38	100	[(-RR)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Gua)+3H] ³⁺
				1522.71	20	[(-RR)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Ade)+3H] ³⁺
				1530.71	10	[(-RR)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-(Cyt)+3H] ³⁺
				<u>1567.73</u>	<u>64</u>	<u>[(-RR)+(T₂(CG)₂AGT₄+3H]³⁺</u>
				1702.46	21	[(-RR)+(w ₈ -Gua+2H)] ²⁺
				1710.45	8	[(-RR)+(T ₂ (CG) ₂ AGT ₄)-2(Cyt)+2H] ²⁺
				1777.98	18	[(-RR)+(w ₈ +2H)] ²⁺
				1954.51	12 (=)	[(-RR)+(a ₆ -Gua)+(w ₄ +2H)] ²⁺

Table S4: monoisotopic m/z ratio, relative abundance and attribution of fragment ions obtained upon CID activation from triply charged $[\text{RR}+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\pm 3\text{H}]^{3\pm}$ NCX species between RR dipeptide and $\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2$ DNA sequence obtained respectively from positive and negative ESI ion mode.

$[\text{RR}+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\pm 3\text{H}]^{3\pm}$						
Monomeric product ions (NCI disruption)			Non covalent fragment ions (NCI conservation)			
$(m/z)_{\text{mono}}$	% relative abundance	attribution	$(m/z)_{\text{mono}}$	% relative abundance*	attribution	
Negative ESI mode (detected from Fig 3c)	1089.13	51	$[(w_5_a_{11}\text{-Gua})\text{-H}]^-$	1038.22	7	$[(\text{RR})+(w_6_a_{12}\text{-Gua})\text{-}2\text{H}]^{2-}$
	1418.18	39	$[(w_5_a_{12}\text{-G})\text{-H}]^-$	1047.22	12	$[(\text{RR})+(w_6)\text{-}(\text{Gua})\text{-}2\text{H}]^{2-}$
	1436.19	15	$[(w_5)\text{-}(\text{Gua})\text{-H}]^-$	1113.74	5	$[(\text{RR})+(w_6)\text{-}(\text{H}_2\text{O})\text{-}2\text{H}]^{2-}$
	1587.24	35	$[(w_5)\text{-H}]^-$	1122.75	49	$[(\text{RR})+(w_6)\text{-}2\text{H}]^{2-}$
	1617.25	97	$[(a_6\text{-Gua})\text{-H}]^-$	1128.75	11	$[(\text{RR})+(a_7\text{-Gua})\text{-}(\text{H}_2\text{O})\text{-}2\text{H}]^{2-}$
				1137.75	100	$[(\text{RR})+(a_7\text{-Gua})\text{-}2\text{H}]^{2-}$
				1165.89	8	$[(\text{RR})+(a_{11}\text{-Gua})\text{-}(\text{H}_2\text{O})\text{-}3\text{H}]^3$
				1171.90	32	$[(\text{RR})+(a_{11}\text{-Gua})\text{-}3\text{H}]^3$
				1231.23	8	$[(\text{RR})+(a_{12}\text{-Gua})\text{-}(\text{Gua})\text{-}3\text{H}]^3$
				1237.23	8	$[(\text{RR})+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{-}2(\text{Gua})\text{-}3\text{H}]^3$
				1275.58	6	$[(\text{RR})+(a_{12}\text{-Gua})\text{-}(\text{H}_2\text{O})\text{-}3\text{H}]^3$
				1281.58	41	$[(\text{RR})+(a_{12}\text{-Gua})\text{-}3\text{H}]^3$
				1287.58	76	$[(\text{RR})+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{-}(\text{Gua})\text{-}3\text{H}]^3$
				<u>1337.93</u>	<u>37</u>	<u>$[(\text{RR})+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{-}3\text{H}]^3$</u>
				1682.82	13	$[(\text{RR})+(a_{11}\text{-Gua})\text{-}(\text{Gua})\text{-}2\text{H}]^{2-}$
				1730.38	7	$[(\text{RR})+(w_5_a_{12}\text{-Gua})\text{-}(\text{H}_2\text{O})\text{-H}]^-$
				1748.39	31	$[(\text{RR})+(w_5_a_{12}\text{-Gua})\text{-H}]^-$
				1758.35	52	$[(\text{RR})+(a_{11}\text{-Gua})\text{-}2\text{H}]^{2-}$
				1766.40	7	$[(\text{RR})+(w_5)\text{-}(\text{Gua})\text{-H}]^-$
				1899.44	7	$[(\text{RR})+(w_5)\text{-}(\text{H}_2\text{O})\text{-H}]^-$
			1917.45	36	$[(\text{RR})+(w_5)\text{-H}]^-$	
			1929.45	10	$[(\text{RR})+(a_6\text{-Gua})\text{-}(\text{H}_2\text{O})\text{-H}]^-$	
			1947.47	57	$[(\text{RR})+(a_6\text{-Gua})\text{-H}]^-$	
Positive ESI mode (detected from Fig 3a)	1091.15	14	$[(w_5_a_{11}\text{-Gua})\text{+H}]^+$	1289.61	27	$[(\text{RR})+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{-}(\text{Gua})\text{+}3\text{H}]^{3+}$
	1420.21	15	$[(w_5_a_{12}\text{-Gua})\text{+H}]^+$	<u>1339.96</u>	<u>11</u>	<u>$[(\text{RR})+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{+}3\text{H}]^{3+}$</u>
	1438.22	6	$[(w_5)\text{-}(\text{Gua})\text{+H}]^+$	1440.29	< 5 (=)	$[(\text{RR})+(d_5)\text{+}(w_5_d_{10})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1500.23	8	$[(z_6\text{-Gua_}a_{11}\text{-G})\text{+H}]^+$	1480.31	18 (=)	$[(\text{RR})+(a_6\text{-Gua})\text{+}(w_5_d_{10})\text{+}2\text{H}]^{2+}$ or $[(\text{RR})+(d_5)\text{+}(w_5_a_{11}\text{-Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1539.25	5	$[(d_5)\text{+H}]^+$	1520.32	25 (=)	$[(\text{RR})+(a_6\text{-Gua})\text{+}(w_5_a_{11}\text{-Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1589.27	9	$[(w_5)\text{+H}]^+$	1560.34	6 (=)	$[(\text{RR})+(a_6\text{-Gua})\text{+}(z_6\text{-Gua_}a_{11}\text{-Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$ or $[(\text{RR})+(d_{10}\text{-H}_2\text{O})\text{-}2(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$ (°)
	1595.27	26	$[(a_{11}\text{-Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$	1569.31	7	$[(\text{RR})+(d_{10})\text{-}2(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1604.28	25	$[(d_{11}\text{-PO}_3)\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$	1609.33	8	$[(\text{RR})+(a_{11}\text{-Gua})\text{-}2(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1619.28	5	$[(a_6\text{-Gua})\text{+H}]^+$	1653.84	8	$[(\text{RR})+(d_{10})\text{+}(\text{H}_2\text{O})\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1635.28	8	$[(d_{11}\text{-H}_2\text{O})\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$	1724.86	10	$[(\text{RR})+(d_{11}\text{-H}_2\text{O})\text{-}2(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1644.28	36	$[(d_{11})\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$	1729.37	7	$[(\text{RR})+(d_{10})\text{+}(\text{H}_2\text{O})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1684.27	69	$[(a_{12}\text{-Gua})\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$	1733.84	8	$[(\text{RR})+(d_{11})\text{-}2(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1693.28	23	$[(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{-}2(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$	1760.37	12	$[(\text{RR})+(a_{11}\text{-Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1693.28	23	$[(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{-}2(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$	1773.85	10	$[(\text{RR})+(a_{12}\text{-Gua})\text{-}2(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1768.80	30	$[(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$	1809.37	12	$[(\text{RR})+(d_{11})\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
	1844.33	9	$[(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{+}2\text{H}]^{2+}$	1818.37	5	$[(\text{RR})+(d_{11})\text{+}(\text{H}_2\text{O})\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
				1849.38	48	$[(\text{RR})+(a_{12}\text{-Gua})\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
				1858.38	34	$[(\text{RR})+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{-}2(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
				1924.90	24	$[(\text{RR})+(a_{12}\text{-Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$
				1933.91	100	$[(\text{RR})+(\text{T}_5\text{G}_2\text{T}_3\text{G}_2)\text{-}(\text{Gua})\text{+}2\text{H}]^{2+}$

ANNEXES

Table S5: monoisotopic m/z ratio, relative abundance and attribution of fragment ions obtained upon CID activation from triply charged [(11-24)+(T₅G₂T₃G₂)±3H]^{3±} NCX species between ACTH 11-24 fragment and T₅G₂T₃G₂ DNA sequence obtained respectively from positive and negative ESI ion mode.

[(11-24)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)±3H] ^{3±}						
Monomeric product ions (NCI disruption)			Non covalent fragment ions (NCI conservation)			
(m/z) _{mono}	% relative abundance	attribution	(m/z) _{mono}	% relative abundance(°)	attribution	
Negative ESI mode (detected from Fig 3d)	1418.18	16	[(w ₅ _a ₁₂ -Gua)-H] ⁻	1534.10	11	[(11-24)+(w ₅ _a ₁₂ -Gua)-2H] ²⁻
	1436.19	9	[(w ₅)-(Gua)-H] ⁻	1612.17	19	[(11-24)+(a ₁₁ -Gua)-3H] ³⁻
	1537.23	9	[(d ₅)-H] ⁻	1633.64	30	[(11-24)+(a ₆ -Gua)-2H] ²⁻
	1587.24	16	[(w ₅)-H] ⁻	1671.51	7	[(11-24)+(a ₁₂ -Gua)-(Gua)-3H] ³⁻
	1617.25	89	[(a ₆ -Gua)-H] ⁻	1677.51	12	[(11-24)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-2(Gua)-3H] ³⁻
				1698.63	11	[(11-24)+(w ₆ _a ₁₂ -Gua)-2H] ²⁻
				1707.64	16	[(11-24)+(w ₆)-(Gua)-2H] ²⁻
				1721.86	15	[(11-24)+(a ₁₂ -Gua)-3H] ³⁻
				1727.86	100	[(11-24)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-(Gua)-3H] ³⁻
				<u>1778.21</u>	<u>48</u>	<u>[(11-24)+(T₅G₂T₃G₂)-3H]³⁻</u>
				1783.16	62	[(11-24)+(w ₆)-2H] ²⁻
				1798.17	74	[(11-24)+(a ₇ -Gua)-2H] ²⁻
				1823.17	5	[(11-24)+(w ₇ _d ₁₁)-2H] ²⁻
				2178.72	< 5 (=)	[(11-24)+(a ₆ -Gua)+(w ₅ _a ₁₁ -Gua)-2H] ²⁻
				2343.24	18	[(11-24)+(a ₁₁ -Gua)-(Gua)-2H] ²⁻
				2418.77	18	[(11-24)+(a ₁₁ -Gua)-2H] ²⁻
Positive ESI mode (detected from Fig 3b)	1420.20	14	[(w ₅ _a ₁₂ -Gua)+H] ⁺	1454.16	10 (=)	[(11-24)+(a ₆ -Gua)+(w ₅ _a ₁₁ -Gua)+3H] ³⁺
	1438.21	6	[(w ₅)-(Gua)+H] ⁺	1480.83	5 (=)	[(11-24)+(a ₆ -Gua)+(z ₆ -Gua_a ₁₁ -Gua)+3H] ³⁺
	1500.23	6	[(z ₆ -Gua_a ₁₁ -Gua)+H] ⁺			[(11-24)+(d ₁₀ -H ₂ O)-2(Gua)+3H] ³⁺ (°)
	1589.26	8	[(w ₅)+H] ⁺	1537.17	10	[(11-24)+(d ₁₀)-(Gua)+3H] ³⁺
				1563.84	50	[(11-24)+(a ₁₁ -Gua)-(Gua)+3H] ³⁺
				1590.52	17	[(11-24)+(d ₁₁ -H ₂ O)-2(Gua)+2H] ²⁺
				1614.19	14	[(11-24)+(a ₁₁ -Gua)+3H] ³⁺
				1620.19	46	[(11-24)+(d ₁₁ -PO ₃)-(Gua)+3H] ³⁺
				1623.17	7	[(11-24)+(a ₁₂ -Gua)-2(Gua)+3H] ³⁺
				1646.87	11	[(11-24)+(d ₁₁ -Gua)+3H] ³⁺
				1673.53	52	[(11-24)+(a ₁₂ -Gua)-(Gua)+3H] ³⁺
				1679.53	24	[(11-24)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-2(Gua)+3H] ³⁺
				1723.88	36	[(11-24)+(a ₁₂ -Gua)+3H] ³⁺
				1729.88	100	[(11-24)+(T ₅ G ₂ T ₃ G ₂)-(Gua)+3H] ³⁺
				<u>1780.23</u>	<u>33</u>	<u>[(11-24)+(T₅G₂T₃G₂)+3H]³⁺</u>
				2100.71	< 5 (=)	[(11-24)+(d ₅)+(w ₅ _d ₁₀)+2H] ²⁺
				2140.72	56 (=)	[(11-24)+(d ₅)+(w ₅ _a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺ or [(11-24)+(a ₆ -Gua)+(w ₅ _d ₁₀)+2H] ²⁺
				2180.73	70 (=)	[(11-24)+(a ₆ -Gua)+(w ₅ _a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺
				2220.74	12 (=)	[(11-24)+(a ₆ -Gua)+(z ₆ -Gua_a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺ or [(11-24)+(d ₁₀ -H ₂ O)-2(Gua)+2H] ²⁺ (°)
				2229.73	13	[(11-24)+(d ₁₀)-2(Gua)+2H] ²⁺
				2269.72	9	[(11-24)+(a ₁₁ -Gua)-2(Gua)+2H] ²⁺
				2305.25	68	[(11-24)+(d ₁₀)-(Gua)+2H] ²⁺
				2314.25	9	[(11-24)+(d ₁₀)+(H ₂ O)-(Gua)+2H] ²⁺
				2345.26	86	[(11-24)+(a ₁₁ -Gua)-(Gua)+2H] ²⁺
			2389.78	11	[(11-24)+(d ₁₀)+(H ₂ O)+2H] ²⁺	
			2394.25	7	[(11-24)+(d ₁₁)-2(Gua)+2H] ²⁺	
			2420.79	29	[(11-24)+(a ₁₁ -Gua)+2H] ²⁺	
			2469.78	13	[(11-24)+(d ₁₁)-(Gua)+2H] ²⁺	

Table S6: monoisotopic m/z ratio, relative abundance and attribution of fragment ions obtained upon CID activation from quadruply charged $[(11-24)+(T_5G_2T_3G_2)\pm 4H]^{4\pm}$ NCX species between ACTH 11-24 fragment and $T_5G_2T_3G_2$ DNA sequence obtained respectively from positive and negative ESI ion mode.

		$[(11-24)+(T_5G_2T_3G_2)\pm 4H]^{4\pm}$					
		NCI disruption			NCI conservation		
		(m/z) _{mono}	% relative abundance	attribution	(m/z) _{mono}	% relative abundance*	attribution
Negative ESI mode	1009.16	6	$[(w_5_d_{10})-H]^-$	1291.14	16	$[(11-24)+(a_{12}-Gua)-4H]^{4-}$	
	1089.13	14	$[(w_5_a_{11}-Gua)-H]^-$	1295.64	27	$[(11-24)+(T_5G_2T_3G_2)-(Gua)-4H]^{4-}$	
	1418.18	6	$[(w_5_a_{12}-Gua)-H]^-$	1333.40	100	$[(11-24)+(T_5G_2T_3G_2)-4H]^{4-}$	
				1534.10	11	$[(11-24)+(w_5_a_{12}-Gua)-2H]^{2-}$	
				1612.17	39	$[(11-24)+(a_{11}-Gua)-3H]^{3-}$	
				1618.63	21	$[(11-24)+(w_5)-2H]^{2-}$	
				1633.64	59	$[(11-24)+(a_6-Gua)-2H]^{2-}$	
				1698.63	6	$[(11-24)+(w_6_a_{12}-Gua)-2H]^{2-}$	
				1707.63	10	$[(11-24)+(w_6)-(Gua)-2H]^{2-}$	
				1783.16	60	$[(11-24)+(w_6)-2H]^{2-}$	
			1798.16	74	$[(11-24)+(a_7-Gua)-2H]^{2-}$		
Positive ESI mode				1297.66	6	$[(11-24)+(T_5G_2T_3G_2)-(Gua)+4H]^{4+}$	
				1335.43	36	$[(11-24)+(T_5G_2T_3G_2)+4H]^{4+}$	
				1454.16	15 (=)	$[(11-24)+(a_6-Gua)+(w_5_a_{11}-Gua)+3H]^{3+}$	
				1480.84	9 (=)	$[(11-24)+(a_6-Gua)+(z_6-Gua_a_{11}-Gua)+3H]^{3+}$ or $[(11-24)+(d_{10}-H_2O)-2(Gua)+3H]^{3+}$ (*)	
				1537.17	15	$[(11-24)+(d_{10})-(Gua)+3H]^{3+}$	
				1563.84	61	$[(11-24)+(a_{11}-Gua)-(Gua)+3H]^{3+}$	
				1590.52	19	$[(11-24)+(d_{11}-H_2O)-2(Gua)+3H]^{3+}$	
				1593.52	7	$[(11-24)+(d_{10})+(H_2O)+3H]^{3+}$	
				1595.65	6	$[(11-24)+(d_5)+2H]^{2+}$	
				1614.19	29	$[(11-24)+(a_{11}-Gua)+3H]^{3+}$	
				1620.20	41	$[(11-24)+(d_{11}-PO_3)-(Gua)+3H]^{3+}$	
				1623.18	9	$[(11-24)+(a_{12}-Gua)-2(Gua)+3H]^{3+}$	
				1635.66	9	$[(11-24)+(a_6-Gua)+2H]^{2+}$	
				1640.87	9	$[(11-24)+(d_{11}-H_2O)-(Gua)+3H]^{3+}$	
				1646.86	19	$[(11-24)+(d_{11})-(Gua)+3H]^{3+}$	
				1673.53	71	$[(11-24)+(a_{12}-Gua)-(Gua)+3H]^{3+}$	
				1679.53	23	$[(11-24)+(T_5G_2T_3G_2)-2(Gua)+3H]^{3+}$	
				1723.88	69	$[(11-24)+(a_{12}-Gua)+3H]^{3+}$	
				1729.88	100	$[(11-24)+(T_5G_2T_3G_2)-(Gua)+3H]^{3+}$	
				2100.72	6 (=)	$[(11-24)+(d_5)+(w_5_d_{10})+2H]^{2+}$	
				2140.72	63 (=)	$[(11-24)+(d_5)+(w_5_a_{11}-Gua)+2H]^{2+}$ or $[(11-24)+(a_6-Gua)+(w_5_d_{10})+2H]^{2+}$	
				2180.73	75 (=)	$[(11-24)+(a_6-Gua)+(w_5_a_{11}-Gua)+2H]^{2+}$	
				2220.75	14 (=)	$[(11-24)+(a_6-Gua)+(z_6-Gua_a_{11}-Gua)+2H]^{2+}$ or $[(11-24)+(d_{10}-H_2O)-2(Gua)+2H]^{2+}$ (*)	
				2229.73	15	$[(11-24)+(d_{10})-2(Gua)+2H]^{2+}$	
				2269.74	10	$[(11-24)+(a_{11}-Gua)-2(Gua)+2H]^{2+}$	
				2305.25	81	$[(11-24)+(d_{10})-(Gua)+2H]^{2+}$	
				2314.25	7	$[(11-24)+(d_{10})+(H_2O)-(Gua)+2H]^{2+}$	
				2345.26	88	$[(11-24)+(a_{11}-Gua)-(Gua)+2H]^{2+}$	
				2389.78	9	$[(11-24)+(d_{10})+(H_2O)+2H]^{2+}$	
				2394.24	10	$[(11-24)+(d_{11})-2(Gua)+2H]^{2+}$	
			2420.78	30	$[(11-24)+(a_{11}-Gua)+2H]^{2+}$		
			2429.80	6	$[(11-24)+(d_{11}-PO_3)-(Gua)+2H]^{2+}$		
			2469.77	20	$[(11-24)+(d_{11})-(Gua)+2H]^{2+}$		

ANNEXES

Conclusion et Perspectives

L'objectif principal de ce projet était d'étudier les interactions ioniques stabilisant les NCX biologiques en phase gazeuse par spectrométrie de masse. Dans ce but, différentes approches basées sur de récents concepts de désorption/ionisation à pression atmosphérique et d'activation des ions en phase gazeuse ont permis d'examiner la stabilité de ces interactions non-covalentes durant le transfert de la solution vers la phase gazeuse et en phase gazeuse.

Dans un premier temps, l'influence de la présence d'agents de « superchargement » lors des processus de désolvation des agrégats chargés produits par ESI a été examinée, en mode positif et en mode négatif, pour des peptides, des oligonucléotides et pour des NCX « peptide/oligonucléotide ». L'introduction des grandeurs $SER_{1\%}$ et $CEC_{1\%}$ a certes, facilité la quantification des modifications spectrales dues à l'addition de 1% de *mNBA*, mais a surtout permis d'examiner les aspects sous-jacents aux bases des mécanismes appliquées en ESI, *e.g.* le transfert de proton lors des processus de désolvation au sein des agrégats chargés précurseurs en phase gazeuse. Nous avons proposé un modèle soulignant le rôle des valeurs de $\Delta G^{\circ}_{ac,app}$, et donc des voies de désolvation compétitives des agrégats chargés, dans le phénomène de « superchargement ». Parmi les caractéristiques examinées : (i) le nombre de thymine, (ii) la dispersion des résidus de thymine, et (iii) la présence (éphémère ou permanente) de charges positives proches spatialement ; chacune de ces composantes semble exercer des effets entropiques variables sur la tendance générale de production d'un site chargé. En outre, notre modèle souligne l'implication des cations NH_4^+ dans le mécanisme de « superchargement » dont le rôle est en accord avec les mécanismes d'ESI (précédemment établis) décrivant la désorption/ionisation de simples brins d'ADN vers la phase gazeuse. Indépendamment de la polarité d'ionisation, les NCX ont montré la même tendance de chargement (*vis-à-vis* de *mNBA*) que celle observée pour les simples brins d'ADN *i.e.*, des déprotonations accrues des ions formés par ESI. Les plus hauts états de charge supplémentaires obtenus par l'élargissement de leur distribution (par ionisation en mode négatif) peuvent permettre l'obtention d'informations structurales complémentaires par comparaison des voies de fragmentations empruntées par les espèces à différents états de charge. Alors qu'aucun consensus réel sur le mécanisme des

Conclusion et Perspectives

processus conduisant au « superchargement » n'a encore émergé, nous proposons cette contribution comme une brique supplémentaire pour la « construction des fondations » d'un mécanisme de « superchargement » commun aux deux modes d'ionisation par ESI. D'ailleurs, la partie de cette étude concernant le processus de « superchargement » des oligonucléotides par ESI en mode négatif a été publiée dans *Journal of American Society of Mass Spectrometry*. Enfin, les NCX sont les seuls ions dont l'abondance a systématiquement été augmentée par l'addition *mNBA*, aussi bien en mode d'ionisation positif que négatif. Ces ions « survivants » supplémentaires, attribués à des appariements favorisés par l'augmentation de l'état de charge moyen de l'un des partenaires (selon le mode d'ionisation), ont montré une répartition de charges similaire à leurs analogues formés en absence de *mNBA* faisant de ce dernier un outil analytique d'intérêt pour l'étude de la stabilité des NCX « peptide/oligonucléotide » dont les faibles abondances limitent, dans notre cas, l'analyse par spectrométrie de masse en tandem.

Dans un deuxième temps, une source V-EASI (pour *Venturi Easy Ambient Sonic-spray Ionization*) permettant l'aspiration libre de la solution et la désorption/ionisation des analytes à partir du spray formé par la seule vélocité du gaz porteur a été conçue et comparée énergétiquement à une source ESI (étude originale), puis a été utilisée pour étudier le transfert de NCX de la solution vers la phase en l'absence de fort champ électrique. La comparaison énergétique de la source V-EASI construite au laboratoire avec une source ESI a montré que les ions précurseurs produits par V-EASI sont moins soumis aux dissociations en-source que ceux produits par ESI. Cette différence énergétique peut avoir deux origines : (i) les agrégats chargés produits par V-EASI sont plus petits et nécessitent donc moins d'énergie pour être totalement désolvatés et produire des ions « nus » en phase gazeuse, et/ou (ii) la source V-EASI laisse moins de temps à la population d'ions précurseurs pour se dissocier que dans la source ESI. Cette source plus douce que l'ESI a permis de réexaminer quelques phénomènes observés lors des processus de désorption et d'ionisation sans qu'un champ électrique soit appliqué comme : (i) l'analyse de NCX métal/ligand extrêmement sensibles aux échanges de métaux, (ii) la désorption/ionisation de NCX biologiques « peptide/oligonucléotide » dont la masse moléculaire est supérieure à 5 kDa en solution tamponnée i.e., plus proche de conditions physiologiques que les solvants généralement utilisés par ESI et, (iii) le phénomène de « superchargement » observé lorsque *mNBA* est ajouté à la solution étudiée. Ainsi, l'excès de charges présent à la surface des

microgouttelettes produites par ESI (ce qui constitue la plus grande force de cette méthode) induit une ionisation non-sélective des composés présents dans les microgouttelettes (ce qui constitue la plus grande faiblesse de cette méthode). Ainsi, le potentiel de la source V-EASI est, très certainement, bien loin d'avoir été pleinement exploité. En effet, un grand nombre de phénomènes observés lors des processus de désorption et d'ionisation sous un champ électrique peut encore être réexaminé, *e.g.* les réactions d'oxydation et/ou de réductions activées par un autre composé chimique, par un bombardement électronique, voire même, par un faisceau laser.

Dans un dernier temps, les voies de fragmentations de différentes populations d'ions de NCX ont été comparées afin d'examiner les NCI stabilisant les NCX biologiques en phase gazeuse. La comparaison des voies de fragmentations observées, en mode positif ou en mode négatif, pour les différents NCX biologiques activés par CID a mis en évidence deux voies de fragmentation majoritaires : (i) la dissociation du NCX par rupture des NCI le stabilisant et, (ii) la dissociation du NCX par rupture de liaisons covalentes du squelette oligonucléotidique avec préservation des NCI. Les NCX « peptide/duplex » multiprotonés se dissocient majoritairement par la rupture des NCI de type pont salin liant le peptide au duplex. De par, la présence de protons stabilisant les duplex par des interactions ion-dipôle de type liaison hydrogène, la charge positive portée par une base nucléique (même partiellement masquée) affecte à distance la stabilité de l'interaction ion-ion de type pont salin par un effet de répulsion de charges identiques. Ainsi, le grand nombre de NCI (plus faibles en phase gazeuse) de type liaison hydrogène et de type π -stacking stabilisant le duplexe d'ADN et le manque de degré de liberté des bases nucléiques au sein du duplexe limitent les possibilités de fragmentation des squelettes oligonucléotidiques de ce dernier. Les NCX « peptide/oligonucléotide » stabilisés par les NCI de type pont salin (les plus fortes en phase gazeuse), impliquant les sites les plus basiques localisés sur les résidus d'arginine (et/ou de lysine) du peptide et les sites les plus acides localisés sur les résidus phospho-thymidine de l'oligonucléotide, ont permis l'observation d'ions fragments non-covalents « à trois corps » composés du peptide restant en interaction avec deux fragments (non-complémentaires) de l'oligonucléotide issu de fragmentations multiples du squelette oligonucléotidique. Ainsi, l'étude de la composition des fragments de l'oligonucléotide restant en interaction avec le peptide a permis de renforcer l'attribution de la localisation des sites impliqués dans les NCI commune aux deux polarités d'ionisation. De plus, l'augmentation de l'abondance des ions fragments non-

Conclusion et Perspectives

covalents « à trois corps » en présence d'un excès de protons et leur disparition pour des ions précurseurs plus déprotonés a permis de proposer un modèle de formation pour les ions fragments non-covalents « à trois corps » qui a été soumis dans un journal scientifique (**Annexe 2**). L'étude de la stabilité des NCX biologiques vis-à-vis de la capture consécutive d'un ou plusieurs électrons a permis de localiser les sites protonés les plus disponibles sur l'oligonucléotide montrant que les sites les plus basiques localisés sur le (ou les) peptide(s) sont moins disponibles. Ainsi, l'augmentation de temps de réaction entre l'agent réactif (anion radicalaire de fluoranthène) et les ions précurseurs induit la diminution de l'état de charge des NCX multiprotonés par capture d'électron/neutralisation consécutive. Seuls quelques ions fragments correspondant à la perte d'atome(s) d'hydrogène et/ou d'une molécule d'ammoniac ont été détectés. L'étude des ions fragments produits par la perte d'une molécule d'ammoniac a montré que ces derniers sont issus de voies de fragmentation dirigées par la charge et assistées par le radical. D'autres concepts d'activation en phase gazeuse peuvent encore être appliqués à l'étude de la stabilité des NCX en phase gazeuse. Par exemple, des expériences de « double résonance » permettraient, éventuellement, une meilleure compréhension des différents mécanismes de dissociations précédemment décrits.

Toutes les précisions sur la nature des interactions ioniques stabilisant nos NCX biologiques modèles décrites à travers les différentes études présentées dans ce manuscrit sont proposées comme compléments de notre connaissance du comportement des systèmes biologiques non-covalents lors du transfert de la solution vers la phase gazeuse et lors de leur activation en phase gazeuse. La perspective principale de ces travaux serait l'application de ces concepts de désorption/ionisation et d'activation en phase gazeuse à des macro-systèmes biologiques d'intérêt. Dans ce sens, une collaboration avec Françoise Hervé de l'Unité de régulation de la transcription et des maladies génétiques dirigée par le Professeur Philippe Djian vient de débiter. Cette collaboration a pour but d'étudier par spectrométrie de masse les interactions non-covalentes stabilisant des complexes biologiques « paire de doigts de zinc/oligonucléotide » et « paire de doigts de zinc/duplex » composés de séquences peptidiques de la Basonucline 2 (i.e., une protéine contenant 3 paires de doigts de zinc) et les séquences *de novo* identifiées par ChIP-Seq ou d'autres séquences oligonucléotidiques reconnues moins spécifiquement en solution par ces doigts de zinc.

Conclusion et Perspectives

Etude de la stabilité des interactions ioniques en phase gazeuse : application aux complexes biologiques.

Les interactions non-covalentes (*NCI* pour *Non-Covalent Interactions*) stabilisant les complexes non-covalents biologiques (*NCX* pour *Non-Covalent complexes*) régissent la majorité des processus cellulaires indispensables au développement et au bon fonctionnement de tout organisme vivant. Toutes les fonctions de l'ADN, telles que son conditionnement, sa réplication et la régulation de son expression, sont permises par la formation et la dissociation de NCI avec des protéines. La compréhension des bases de ces processus cellulaires de l'ADN au niveau moléculaire est un sujet d'actualité et d'une importance fondamentale. Des informations essentielles peuvent être obtenues par spectrométrie de masse (*MS* pour *Mass Spectrometry*) qui joue un rôle de plus en plus important dans ce domaine. Malgré la technologie avancée déjà mise en œuvre, le développement de nouveaux concepts d'ionisation et d'activation implémentent perpétuellement la MS. Les travaux de thèse exposés à travers ce manuscrit présentent l'étude de la stabilité des NCI maintenant les NCX biologiques par la comparaison des voies de fragmentations observées en mode positif et en mode négatif mais aussi par l'application de certains concepts récents de la MS comme : (i) l'utilisation d'agents de « superchargement » et, (ii) le développement et l'utilisation d'une source V-EASI (pour *Venturi Easy Ambient Sonic-spray Ionization*) permettant l'aspiration libre de la solution et la désorption/ionisation des analytes par la seule vélocité du gaz de nébulisation.

Mots-clés : *Spectrométrie de masse ; Interactions non-covalentes ; Complexes biologiques non-covalents ; Sources de désorption/ionisation ; Agents de « superchargement » ; Méthodes d'activation en phase gazeuse.*

Study of ionic interactions stability in gas phase: biological complexes application

Non-covalent interactions (*NCI*) stabilizing biological non-covalent complexes (*NCX*) lead most of cellular processes compulsory for the development and the functioning of all living organisms. All DNA functions, such as its conditioning, its replication and the regulation of its expression, are allowed by the formation and the dissociation of NCI with proteins. The comprehension of cellular processes basis of DNA at the molecular level is both topical and fundamental. Crucial information can be obtained by mass spectrometry (*MS*) which plays an increasing role in this field. Despite the already advanced technology applied, the development new ionization and activation concepts implement perpetually the MS. The Ph.D. work described through this manuscript presents the study of NCI maintaining the biological NCX by the comparison of fragmentation pathways observed in positive ion mode and in negative ion mode but also by the application of some recent MS concepts like: (i) the use of supercharging reagents and, (ii) the development and the use of a Venturi Easy Ambient Sonic-spray Ionization (*V-EASI*) source allowing the free aspiration of the solution and the desorption/ionization of the analytes only by the velocity of the spraying gas.

Keywords: *Mass Spectrometry; Non-covalent interactions; Biological non-covalent complexes; Desorption/ionization sources; Supercharging reagents; Gas-phase activation methods.*