



Couplage de la spectrométrie de mobilité ionique et de la spectroscopie optique : études conformationnelles en phase gazeuse

Anne-Laure Simon

► To cite this version:

Anne-Laure Simon. Couplage de la spectrométrie de mobilité ionique et de la spectroscopie optique : études conformationnelles en phase gazeuse. Chimie théorique et/ou physique. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1128 . tel-01504009

HAL Id: tel-01504009

<https://theses.hal.science/tel-01504009>

Submitted on 8 Apr 2017

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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1128

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 52
Physique et Astrophysique

Spécialité de doctorat : Chimie-Physique

Soutenue publiquement le 07/07/2016, par :
Anne-Laure SIMON

Couplage de la spectrométrie de mobilité ionique et de la spectroscopie optique : études conformationnelles en phase gazeuse

Devant le jury composé de :

GABELICA Valérie, DR, Inserm
AFONSO Carlos, PR, Université de Rouen
VON HELDEN Gert, PR, Max Planck Institut, Berlin
CIANFERANI Sarah, CR, Université de Strasbourg
DUGOURD Philippe, DR, CNRS
CHIROT Fabien, MC, Université Lyon 1
RAIROUX Patrick, PR, Université Lyon 1

Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Examinatrice
Directeur de thèse
Examineur, co-encadrant
Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

J'ai eu la chance d'effectuer cette thèse au sein de l'Institut Lumière Matière, dans l'équipe de Spectrométrie des Biomolécules et Agrégats. Je tiens en premier lieu à remercier **Philippe Dugourd**, qui a dirigé mes travaux de thèse, pour sa réactivité et la rapidité de ses réponses, et ce malgré la prise de fonction de directeur de l'institut au cours de ma thèse.

Cette thèse a été encadrée par **Fabien Chirot**. Merci Fabien pour tes explications et ta patience, depuis le début de la construction de l'appareil jusqu'à la préparation de la soutenance, ainsi que pour des moments mémorables en conférence. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec toi.

Après un an de thèse, **Chang Min Choi** a rejoint l'équipe, et a travaillé avec nous sur l'appareil de mobilité ionique. Merci Chang Min d'avoir été là pour faire face avec nous aux surprises et autres caprices de l'appareil. Merci pour ces échanges scientifiques et culturels pendant les journées d'acquisition, j'en garderai de très bons souvenirs.

Je remercie également chaleureusement **Jacques Maurelli**, **Christian Clavier** et **Marc Barbaire**, qui ont grandement participé à la construction de l'appareil.

Je tiens à présent à remercier tous les membres de l'équipe Spectrobio.

Je commencerai par les doctorants du bureau : **Frédéric Poussigue**, qui était là avant moi et m'a aidée à me familiariser avec l'appareil, **Marin Vojkovic**, qui a partagé avec moi les joies des procédures administratives. **Antonin Soleilhac**, **Geoffrey Knight** et **Mohammad Abdul Halim**, bon courage à vous pour la suite !

Merci également aux post-doctorants : **Steven Dali**, qui a travaillé avec nous sur de nombreuses expériences, **Alexander Kulesza**, qui a effectué les calculs permettant l'interprétation de nos résultats, ainsi que **Florian Trichard** et **Samuel Moncayo**, qui ont rejoint l'équipe par la suite.

Doctorants et post-doctorants avons formé une bonne équipe, aussi bien professionnellement qu'en dehors du travail. Je garderai de très bons souvenirs des moments passés en votre compagnie.

Je veux remercier aussi les membres permanents de l'équipe : **Franck Bertorelle**, **Luke Macaleese**, **Driss Rayane**, **Rodolphe Antoine**, **Clothilde Comby-Zerbino** et **Vincent Motto-Ros**.

Je souhaite remercier les membres des autres équipes, notamment **Claude Lesage**, **Francisco Pinto** et **Sad Mezzour**, du service technique, grâce à qui la thèse a pu se dérouler dans des conditions optimales. Merci également à **Marion Girod**, de l'Institut des Sciences Analytiques, pour son aide et ses conseils, en particulier au moment de la préparation de la soutenance.

Au cours des travaux de thèse, nous avons eu le plaisir de travailler en collaboration avec des équipes d'autres laboratoires, de France ou de l'étranger. Je tiens à remercier **Edwin de Pauw** et **Izabella Czerwinska**, de l'université de Liège, ainsi que **Sarah Cianférani** qui m'a accueillie dans son équipe au LSMBO lors d'un séjour d'une semaine à Strasbourg, au cours duquel j'ai eu le plaisir de travailler avec **Johann Stojko**, également doctorant à ce moment-là.

Arrivée à la fin de la thèse, il a fallu présenter mes travaux devant un jury d'experts. Je remercie les membres du jury, qui ont évalué mon travail : **Patrick Rairoux**, qui a présidé mon jury de thèse, **Valérie Gabelica** et **Carlos Afonso**, qui ont rapporté ce travail de thèse et **Gert Von Helden** et **Sarah Cianférani** qui ont participé au jury.

Et enfin, je tiens à remercier mes parents, frères et sœurs, et amis, qui m'ont apporté un soutien moral très précieux tout au long de cette thèse.

Sommaire

Introduction	5
Chapitre 1 : La mobilité ionique	13
I. Origine et principe de la mobilité ionique	14
II. Mobilité et section efficace de collision	15
A. Théorie : relation entre mobilité et section efficace de collision	15
B. Largeur théorique des pics de mobilité et résolution maximale	18
C. Application : détermination expérimentale des sections efficaces de collision	20
III. Les différents types de mobilité ionique	22
A. Séparation temporelle et spatiale	22
B. Les filtres en mobilité	23
C. Piégeage et libération sélective des ions	26
D. Mobilité ionique multidimensionnelle : tandem IMS	27
IV. Détermination de la structure des molécules	29
A. Calcul de la structure des molécules	29
B. Calcul des sections efficaces de collision	31
V. Couplage laser : la spectroscopie d'action	35
A. Couplage MS-laser	35
B. Couplage IMS-laser	36
VI. Conclusion	39
Chapitre 2 : Développement instrumental	45
I. Introduction	46
II. Description de l'appareil	47
A. Description globale	47
B. Régulation de la pression	49
C. Transmission des ions entre les différentes zones de l'appareil	50
D. La source électro spray	54
E. Les tubes de mobilité	56
F. Le Q-ToF, Maxis Impact	57
G. Le couplage laser	58
H. Pilotage de l'appareil	60
III. Les modes d'acquisition	62
A. Mode IMS-MS	62
B. Mode tandem IMS-MS	63
C. Modes laser-IMS	64
IV. Caractéristiques techniques de l'appareil en fonctionnement	67
A. Réglage des flux de gaz	67
A.1. Tests de vide	67
A.2. Calibrations des vannes de pompage	67
A.3. Réglage du flux d'hélium	68
B. Caractéristiques du Q-ToF	69
C. Caractéristiques de la mobilité	70

D.	Largeur théorique des pics de mobilité, limitée par la diffusion	70
E.	Mesure de CCS absolue.	75
F.	Tests de sélection d'un isomère	76
G.	Activation par collisions.....	78
V.	Conclusion	81
Chapitre 3 : Photo-isomérisation		83
I.	Introduction	84
II.	Les systèmes étudiés	85
A.	MPVP et éthers couronne	85
B.	Préparation des échantillons et mode opératoire	86
III.	Résultats	86
A.	Etude des profils de mobilité ionique	86
B.	Photo-isomérisation laser	88
C.	Spectres optiques : spectres PISA	90
IV.	Discussions	94
A.	Allure globale des spectres	94
B.	Influence de la présence de benzènes sur l'éther couronne	94
C.	Influence de la taille de la cavité de l'éther couronne	95
V.	Conclusion	97
Chapitre 4 : Photo-détachement d'électrons sur un peptide marqué :		
spectroscopie optique sur des isomères sélectionnés.....		99
I.	Introduction	100
II.	Etude de l'éosine Y	101
A.	Spectroscopie en solution	101
B.	Spectroscopie d'action en phase gazeuse	102
III.	Etude du peptide marqué	106
A.	Etude des états de charge 5- et 3-.....	108
A.1.	L'état de charge 5- : [Eo-P]5-.....	108
A.2.	L'état de charge 3- : [Eo-P]3-.....	109
B.	Etude de l'état de charge 4-.....	110
B.1.	Activation par collisions	111
B.2.	Spectres optiques des différents conformères	113
B.3.	Irradiation du conformère C activé par collisions	115
IV.	Comparaison des résultats expérimentaux aux calculs théoriques	116
A.	Structures théoriques de l'état de charge 4-.....	116
B.	Relation entre CCS et sites de protonation	117
C.	Interconversion entre les isomères	119
V.	Conclusion	120
Chapitre 5 : FRET d'action sur un conformère spécifique		123
I.	Introduction	124
II.	Le Transfert d'Energie par Résonance de Förster (FRET)	125
A.	Généralités	125
A.1.	Principe	125

A.2. Efficacité de transfert	126
A.3. Caractéristiques du couple de chromophores	126
B. FRET d'action	128
B.1. Du FRET d'ensemble au FRET sur particule unique	128
B.2. Principe du FRET d'action	128
III. Les systèmes étudiés	129
A. Les chromophores	129
B. Expériences préalables	130
C. Préparation des échantillons	130
D. Mode opératoire	132
IV. Mesures de FRET d'action sur un conformère sélectionné	134
A. Caractérisation des chromophores	134
B. Etude de l'efficacité de FRET sur les différents états de charge du peptide greffé	137
C. Etude de l'état de charge 2+ du peptide greffé	141
C.1. Etude des différentes familles conformationnelles par activation par collisions	141
C.2. FRET d'action sur un conformère spécifique	143
V. Conclusion et perspectives	145
Conclusion et perspectives	147
Annexe 1	153
Annexe 2	161

Introduction

Dans cette thèse nous nous intéresserons à l'étude de la structure de systèmes peptidiques. Les peptides, et protéines, sont des macromolécules biologiques constituées d'un enchaînement d'acides aminés. On parle de peptide lorsque cet enchaînement est constitué d'une dizaine de résidus, et de protéine pour les systèmes de taille plus importante. Leur structure, fondamentale pour leur fonctionnement, comporte quatre niveaux d'organisation : la structure primaire est la séquence d'acides aminés, la structure secondaire résulte du repliement local dans lequel on distingue, entre autres, les hélices α et les feuillets β , la structure tertiaire correspond au repliement tridimensionnel, et la structure quaternaire est un complexe formé de plusieurs molécules. La conformation des protéines est stabilisée par un ensemble d'interactions fortes (liaisons covalentes telles que les ponts disulfure) ou faibles (liaisons hydrogènes, forces coulombiennes attractives ou répulsives, interactions hydrophobes...). Du fait de leur capacité à se lier de manière spécifique à d'autres molécules, les protéines jouent un rôle crucial dans de nombreuses fonctions biologiques, en tant que récepteur membranaire, transporteur moléculaire, catalyseur de réactions biologiques... Elles interviennent donc dans de nombreuses voies métaboliques, et leur étude constitue un élément clé pour la compréhension du fonctionnement cellulaire. De plus, de par le rôle central qu'elles jouent dans les réactions cellulaires, les protéines sont impliquées dans certaines maladies telles que les maladies neurodégénératives de type Alzheimer, Parkinson, Huntington ou les maladies à prion. En effet, ces maladies sont liées à une agrégation anormale de protéines [1]. C'est pourquoi l'étude de la conformation et des mécanismes d'agrégation ou d'oligomérisation des protéines constitue un enjeu majeur pour la compréhension du fonctionnement de ces maladies.

Il existe déjà divers outils de la biologie structurale, parmi lesquels on peut citer la diffraction des rayons X (DRX), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), le dichroïsme circulaire ou les échanges hydrogène/deutérium. L'étude de protéines par DRX nécessite dans un premier temps de cristalliser les protéines, ce qui peut altérer leur structure et restreint l'étude aux systèmes cristallisables. Afin de rester dans des conditions les plus proches possibles des conditions biologiques, il est possible d'étudier les protéines en solution. La RMN en solution permet d'étudier la structure des protéines dans un milieu proche du milieu naturel, et de faire varier ce milieu pour en déterminer l'influence sur la conformation des systèmes. Cependant cette technique possède une faible sensibilité et la taille des systèmes étudiés est limitée. Le dichroïsme circulaire est une autre méthode d'analyse structurale de systèmes en solution, qui n'est pas limitée quant à la taille des systèmes étudiés. Cette méthode permet l'étude de la structure secondaire des peptides ou protéines et offre la possibilité de suivre en direct la dénaturation de ces systèmes. Mais les solutions tampon habituellement utilisées sont souvent incompatibles, car elles absorbent la lumière dans la même gamme de longueur d'onde, et génèrent des absorptions parasites. Un autre domaine de l'analyse structurale en solution est la mesure de fluorescence. Cette technique permet, entre autre, de détecter des interactions protéine-protéine *in vivo*. Ces mesures sont effectuées sur un grand nombre de molécules, et les résultats correspondent à des moyennes sur des ensembles : dans le cas où le système étudié existe dans plusieurs conformations, la mesure n'est représentative d'aucune conformation particulière, mais d'une moyenne sur toutes les conformations coexistantes. Pour

obtenir plus de précision, des techniques de mesure de fluorescence de particules uniques ont été développées. Ces dernières se présentent sous la forme de protéines fixées sur un support et séchées [2], ou alors de protéines en solution analysées individuellement par cytométrie en flux [3]. Le séchage des systèmes étudiés présente l'inconvénient d'altérer la structure des molécules, et lors de l'étude des systèmes en solution, il y a une forte influence de la température, du pH, de la nature du solvant utilisé, et des interférences peuvent être générées par des interactions protéine-protéine, protéine-solvant, ou protéine-impureté. Une autre approche en plein essor est la cryo-microscopie électronique. Cette technique, qui s'est développée grâce aux progrès de la microscopie électronique, consiste à congeler rapidement l'échantillon et à l'analyser par microscopie [4]. Il est donc possible de conserver l'échantillon dans un solvant proche du milieu biologique, et le fait de congeler rapidement permet de garder sa forme native. Une solution alternative possible pour étudier les propriétés intrinsèques du système, débarrassé des interactions avec le solvant ou d'autres molécules, est d'étudier le système en phase gazeuse. Cette technique s'est développée ces dix dernières années sous le nom de spectrométrie de masse native.

L'étude de protéines en phase gazeuse, par spectrométrie de masse, demande beaucoup moins d'échantillon que par RMN ou DRX, car la technique est plus sensible. La spectrométrie de masse offre aussi la possibilité d'isoler d'analyser des espèces directement à partir d'un mélange. Par ailleurs, l'étude de peptides et protéines en phase gazeuse permet de se débarrasser des interférences générées par les interactions avec le solvant ou les autres molécules présentes en solution. Lors des études en phase gazeuse, les caractéristiques des protéines sont déterminées en absence de solvant. Ceci permet d'obtenir des informations complémentaires par rapport à celles obtenues par des techniques d'analyse en solution. Cependant il est légitime de se demander si les informations obtenues en phase gazeuse présentent ou non un intérêt biologique. En effet, biologiquement, les protéines interagissent avec un solvant (milieu intra ou extra cellulaire). Les solvants biologiques étant aqueux on retrouve souvent, en dehors des protéines transmembranaires, les acides aminés hydrophobes au centre de la protéine et les acides aminés hydrophiles à la surface de la protéine. De plus, l'eau stabilise les groupements chargés à la surface de la protéine et diminue les répulsions coulombiennes. Lorsque la protéine est transférée d'une solution vers la phase gazeuse, elle passe donc d'un milieu hydrophile où les répulsions coulombiennes sont faibles à un milieu hydrophobe où il n'y a plus de stabilisation des résidus chargés par le solvant. On s'attend donc à un changement de conformation : les répulsions coulombiennes, devenues plus importantes, vont tendre à déplier le système. Il est même possible d'arriver à une conformation inverse par rapport à celle en solution en cela que les acides aminés hydrophiles vont être stabilisés au centre de la protéine et les acides aminés hydrophobes seront situés en surface. Le paysage conformationnel d'un système protéique en solution ou en phase gazeuse est donc différent : la structure de plus basse énergie en solution peut n'être qu'un minimum local en phase gazeuse.

Une méthode pour étudier la structure des protéines en phase gazeuse est la spectrométrie de mobilité ionique (IMS), souvent couplée à la spectrométrie de masse. Des études menées par le groupe de Clemmer sur l'ubiquitine [5] ont montré que celle-ci ne changeait pas de conformation sur

la durée de l'expérience de mobilité ionique. Dans ces expériences en tandem IMS, une fine portion de la distribution totale du profil de mobilité est sélectionnée au milieu d'un pic, et, après la traversée d'un deuxième tube de dérive, on ne retrouve bien que cette fine sélection, et non la distribution originale. Cela tend à montrer que l'ubiquitine est figée dans une conformation donnée pendant le temps de dérive. On peut alors supposer que les conformations observées par spectrométrie de mobilité ionique et spectrométrie de masse en phase gazeuse sont le reflet des conformations en solution. Cela dépend toutefois de la rapidité d'interconversion et des barrières énergétiques entre les différentes conformations. De plus, sur de petits systèmes, des similarités ont été montrées entre la structure obtenue par IMS et celle obtenue par DRX [6]. L'assemblage de ces petits systèmes survivrait donc à la transition entre la phase en solution à la phase gazeuse. Un domaine d'analyse a été développé sur ce principe : la spectrométrie de masse native.

Le principe de la spectrométrie de masse native est d'étudier des molécules dont la structure en phase gazeuse est la plus proche possible de la structure en solution (préservation des interactions non-covalentes). Conjugée à la spectrométrie de mobilité ionique, cela devient un outil puissant pour l'analyse de la structure des protéines. Un des points les plus critiques est donc la transition entre la phase en solution et la phase gazeuse. Ce domaine d'analyse a été rendu possible par le développement de sources d'ionisation douces telles que la source électro-spray (ESI) et la source par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI). La spectrométrie de masse native est, depuis une vingtaine d'années, en plein essor, comme montré sur le diagramme de la figure 1, représentant le nombre de publication sur la spectrométrie de masse native, par an. En utilisant les sources ESI et MALDI, il a été possible d'observer des complexes non-covalents par spectrométrie de masse [7], ce qui appuie le fait que la transition solution/gaz est douce. Des analyses d'agrégation de protéines sont donc possibles [8]. De nombreuses études ont été faites pour confirmer la possibilité de conserver des éléments de structure entre la solution et la phase gazeuse, y compris sur de gros systèmes [9, 10]. Les principaux problèmes restant sont donc la désolvatation, l'activation des molécules dans l'appareil et les effets de charges. Pour remédier au problème d'activation des systèmes lorsqu'ils passent d'une source à pression atmosphérique vers le spectromètre de masse dont la pression est beaucoup plus basse, on compartimente l'appareil afin que la pression diminue graduellement, et on optimisera les paramètres de l'appareil pour accélérer le moins possible les molécules, pour ne pas leur fournir d'énergie. Par ailleurs, les effets de charge induisent un dépliement des systèmes pour les hauts états de charges, alors que les bas états de charge sont plus compacts [11]. Il a été montré que la composition du solvant influait sur l'état de charge du système transféré en phase gazeuse [12]. La spectrométrie de masse native requiert donc un soin particulier quant au choix du solvant utilisé. Le fait que la composition du solvant influe sur la forme du système observée en phase gazeuse montre que des éléments de structure sont conservés lors de la transition vers la phase gazeuse. Puisque la possibilité de transférer des systèmes en phase gazeuse tout en maintenant la structure native a été montrée, il devient important d'avoir des outils de détermination de ces structures. Le premier outil est la mobilité ionique, couplée à la spectrométrie de masse.

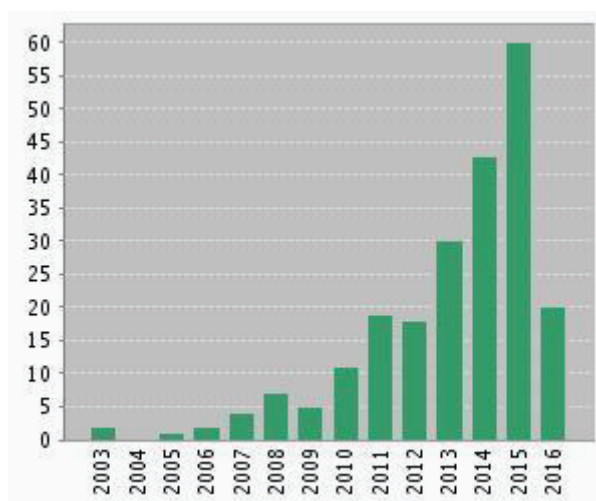


Figure 1. Nombre de publications, par année, sur la spectrométrie de masse native au cours de ces 15 dernières années.

En plus d'être un outil pour l'analyse conformationnelle des protéines (mesure de section efficace de collision), la spectrométrie de mobilité ionique offre la possibilité d'étudier la dynamique des systèmes. Par exemple, il est possible de suivre le dépliement des protéines par spectrométrie de mobilité ionique en tandem : lorsqu'une structure est déterminée, elle peut être sélectionnée et il est possible d'étudier de quelle manière elle va évoluer selon la façon dont elle va être activée [12]. L'activation entraînant des variations de conformation peut être faite par collision, ou alors photo-induite. Ainsi, des expériences d'isomérisation, de fragmentation ou de transfert de charge peuvent être réalisées.

Une autre dimension d'analyse structurale peut être atteinte en couplant la spectrométrie de mobilité ionique à la spectroscopie optique. En effet, l'étude des propriétés optiques des systèmes représente un enjeu en biologie structurale, car les spectres optiques (IR, UV...) peuvent être sensibles à la structure des systèmes étudiés[13]. De plus, certaines réactions biologiques, telles que la photosynthèse, sont photo-induites. En ce qui concerne la structure des protéines, les différentes techniques analytiques telles que la spectroscopie ou la spectrométrie de mobilité ionique ne sont pas sensibles au même niveau de structure des protéines. Ainsi, la spectroscopie est sensible à la structure secondaire des protéines et permet d'obtenir des informations locales sur la structure, alors que la spectrométrie de mobilité ionique donne une information sur la forme globale des systèmes. Le couplage des deux techniques analytiques permet donc de recouper ces informations. Par ailleurs, la spectroscopie optique est déjà largement utilisée sur des systèmes en solution, mais présente l'inconvénient d'être moyennée sur l'ensemble des conformations en équilibre dans la solution, et de subir des interférences venant du solvant ou des autres molécules en solution, bien que, comme déjà mentionné, il est possible d'obtenir une résolution pour une simple molécule, en solution. En transférant cette technique sur des systèmes en phase gazeuse, on espère pouvoir s'affranchir de ces interférences. Le couplage de la spectroscopie optique à la spectrométrie de

masse a permis le développement de la spectroscopie d'action, dans laquelle on ne mesure plus l'absorption du faisceau lumineux, mais les phénomènes induits sur le système par l'irradiation (détachement d'électron, fragmentation...), suivis par spectrométrie de masse. Les premières mesures de spectroscopie d'action sur des ions isolés en masse ont été faites dans les années 60 [14]. La spectroscopie d'action a ensuite connu un essor dans les années 70 et 80 [15], notamment grâce aux progrès de la spectrométrie de masse et au développement de nouvelles sources laser. Cependant, même lorsque la spectroscopie optique est couplée à la spectrométrie de masse, les mesures sont effectuées sur des ions sélectionnés en masse, et sont donc moyennées sur l'ensemble des isomères présents. C'est en cela que le couplage avec la spectrométrie de mobilité ionique apporte un progrès : les différents isomères peuvent être sélectionnés en mobilité pour que la spectroscopie optique soit réalisée sur un isomère spécifique.

C'est dans l'optique de ce couplage que nous avons développé un appareil couplant spectrométrie de masse, spectrométrie de mobilité ionique en tandem et spectroscopie laser, dans le but d'étudier des systèmes peptidiques ou protéiques. La construction de l'appareil tandem-IMS s'est faite sur une durée d'un an. Il a fallu ensuite tester et caractériser cet appareil sur des systèmes déjà étudiés sur d'autres appareils de mobilité, avant de pouvoir effectuer des expériences de spectroscopie sur des conformères sélectionnés en mobilité.

La première partie de ce mémoire est consacrée au principe de la spectrométrie de mobilité ionique. Il y est expliqué comment, à partir de la mesure d'un temps de dérive, nous pouvons déterminer la structure d'un système, en passant par le calcul de sa section efficace de collision avec un gaz tampon. Les différents types de mobilité ionique existants y sont également décrits.

Le deuxième chapitre couvre le travail d'assemblage de l'appareil. Chacun des éléments constituant l'appareil est décrit dans le détail. Les principales contraintes qui expliquent les choix instrumentaux qui ont été faits sont données. Au travers des premiers résultats expérimentaux, les principales caractéristiques de l'appareil sont déterminées, comme par exemple la fréquence de fonctionnement ou la résolution. Les différents modes d'utilisation de l'appareil sont listés, répertoriant ainsi les différentes dimensions d'analyse possibles.

Une fois l'appareil caractérisé et les premiers réglages effectués, nous avons pu effectuer des mesures de spectroscopie d'action spécifiques de conformères sélectionnés. Les trois chapitres suivants donnent trois exemples d'analyses spectroscopiques différentes qu'il est possible de faire sur l'appareil tandem-IMS.

Dans le chapitre trois, nous donnons un exemple de photo-isomérisation cis/trans d'une molécule modèle. Nous montrons la possibilité de sélectionner un isomère et d'induire par laser une isomérisation trans $\rightarrow$ cis suivie par mobilité ionique. Le spectre d'action de photo-isomérisation (PISA) est obtenu, et les effets de la complexation du système avec des éthers couronne sur le taux d'isomérisation sont étudiés.

Dans le chapitre 4, nous étudions la relation entre la conformation d'un système et ses propriétés optiques. Pour cela, nous avons choisi un peptide modèle marqué par un chromophore absorbant dans le visible, et dont la principale réponse optique mesurée par spectroscopie d'action

est le détachement d'un électron. La réponse optique des différents états de charge du système, ainsi que des différentes conformations dans un même état de charge seront comparées.

Le chapitre 5 est consacré à montrer la possibilité de faire des mesures de spectroscopie d'action basée sur le Transfert d'Energie par Résonance de Förster (FRET), en phase gazeuse, sur un conformère spécifique. Le système étudié est un peptide marqué par deux chromophores : un chromophore donneur et un chromophore accepteur. Par spectroscopie d'action, nous suivons le taux de fragmentation du chromophore accepteur spécifique du FRET, selon l'état de charge du système, ou, pour un même état de charge, selon la conformation du peptide.

Une conclusion sur les résultats obtenus, ainsi que les perspectives pour de futures expériences termineront ce mémoire de thèse.

1. Chiti, F. and C.M. Dobson, *Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease*. Annu. Rev. Biochem., 2006. **75**(1): p. 333-366.
2. Betzig, E. and R.J. Chichester, *Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy*. Science, 1993. **262**(5138): p. 1422-1425.
3. Shera, E.B., et al., *Detection of single fluorescent molecules*. Chem. Phys. Lett., 1990. **174**(6): p. 553-557.
4. van Heel, M., et al., *Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution*. Quarterly Reviews of Biophysics, 2000. **33**(04): p. 307-369.
5. Koeniger, S.L., S.I. Merenbloom, and D.E. Clemmer, *Evidence for Many Resolvable Structures within Conformation Types of Electrosprayed Ubiquitin Ions*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(13): p. 7017-7021.
6. Bleiholder, C., et al., *Ion mobility-mass spectrometry reveals a conformational conversion from random assembly to β -sheet in amyloid fibril formation*. Nat. Chem., 2011. **3**(2): p. 172-177.
7. Ruotolo, B.T., et al., *Evidence for Macromolecular Protein Rings in the Absence of Bulk Water*. Science, 2005. **310**(5754): p. 1658-1661.
8. Canon, F., et al., *Folding of a Salivary Intrinsically Disordered Protein upon Binding to Tannins*. J. Am. Chem. Soc., 2011. **133**(20): p. 7847-7852.
9. Ruotolo, B.T., et al., *Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes*. Nat. Protocols, 2008. **3**(7): p. 1139-1152.
10. Debaene, F., et al., *Innovative Native MS Methodologies for Antibody Drug Conjugate Characterization: High Resolution Native MS and IM-MS for Average DAR and DAR Distribution Assessment*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(21): p. 10674-10683.
11. Hudgins, R.R., J. Woenckhaus, and M.F. Jarrold, *High resolution ion mobility measurements for gas phase proteins: correlation between solution phase and gas phase conformations*. Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1997. **165-166**: p. 497-507.
12. Shi, H.L., et al., *Solution Dependence of the Collisional Activation of Ubiquitin M+7H (7+) Ions*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2014. **25**(12): p. 2000-2008.
13. Fromherz, R., G. Ganteför, and A.A. Shvartsburg, *Isomer-Resolved Ion Spectroscopy*. Phys. Rev. Lett., 2002. **89**(8): p. 083001.
14. Dunn, G., *Studies of Photodissociation of Molecular Ions*. Atomic Collision Processes. 1964, Joint Inst. for Lab. Astrophysics, Boulder, Colo.
15. Freiser, B.S. and J.L. Beauchamp, *Laser photodissociation of benzene radical cations. Evidence for a two photon process involving a long lived intermediate*. Chem. Phys. Lett., 1975. **35**(1): p. 35-40.

Chapitre 1 :

La mobilité ionique

I.	Origine et principe de la mobilité ionique.....	14
II.	Mobilité et section efficace de collision	15
A.	Théorie : relation entre mobilité et section efficace de collision.....	15
B.	Largeur théorique des pics de mobilité et résolution maximale	18
C.	Application : détermination expérimentale des sections efficaces de collision	20
III.	Les différents types de mobilité ionique	22
A.	Séparation temporelle et spatiale.....	22
B.	Les filtres en mobilité	23
C.	Piégeage et libération sélective des ions	26
D.	Mobilité ionique multidimensionnelle : tandem IMS	27
IV.	Détermination de la structure des molécules	29
A.	Calcul de la structure des molécules.....	29
B.	Calcul des sections efficaces de collision	31
V.	Couplage laser : la spectroscopie d'action	35
A.	Couplage MS-laser.....	35
B.	Couplage IMS-laser.....	36
VI.	Conclusion	39

I. Origine et principe de la mobilité ionique

Dans une expérience de spectrométrie de mobilité ionique «classique» les ions en phase gazeuse sont accélérés par un champ électrique faible et homogène le long d'un tube de dérive (voir figure 1) dans lequel est maintenue une pression constante de gaz tampon. Si le champ électrique est suffisamment faible, les ions se déplacent à une vitesse constante qui dépend de leur masse, de leur charge, de leur section efficace de collision (CCS) avec le gaz ainsi que de la pression et de la température du gaz. Les ions peuvent ainsi être séparés en fonction du temps qu'ils mettent à parcourir une distance donnée. Comme la section efficace dépend de la géométrie des ions, la spectrométrie par mobilité ionique permet de séparer des isomères. En effet, les collisions avec le gaz tampon (diazote, hélium ou argon) vont ralentir les ions en fonction de leur conformation : si deux ions de même masse et de même charge sont placés dans le tube de mobilité, le plus compact subira moins de collisions et aura une vitesse de dérive plus grande que l'ion dont la structure est plus étendue, qui sera quant à lui fortement ralenti par les forces de frottement. La mobilité ionique peut donc servir de technique de séparation préalable à une analyse par spectrométrie de masse. Par ailleurs, la mesure de la répartition des ions selon différents temps de dérive permet de déterminer leurs mobilités respectives dans le gaz, et de déduire leurs sections efficaces de collision. En comparant les résultats expérimentaux de mobilité ionique avec des calculs, on peut donc obtenir des informations structurales sur les systèmes en phase gazeuse.

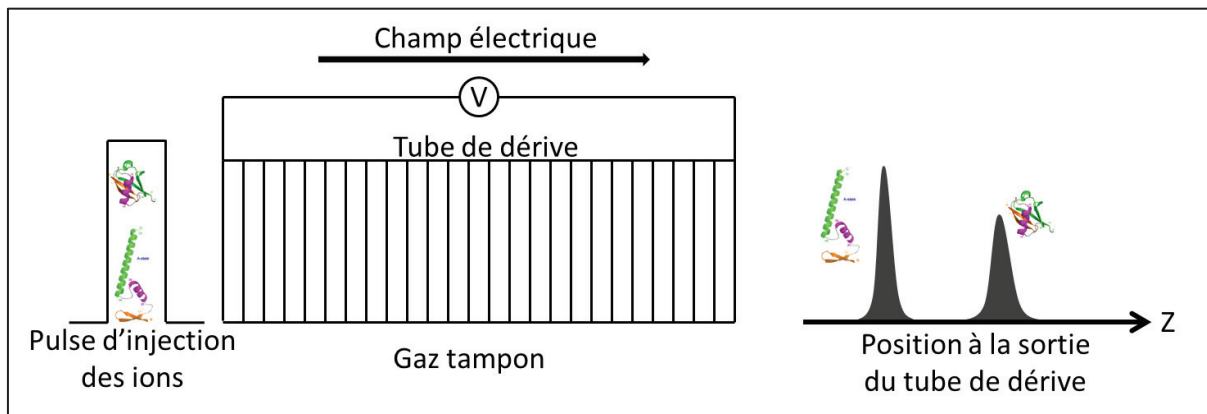


Figure 1. Schéma de la séparation de deux ions par mobilité ionique.

La spectrométrie de mobilité ionique est largement utilisée de manière autonome ou en combinaison avec la spectrométrie de masse ou la chromatographie gazeuse pour la détection de composés volatils, tels que des explosifs [1] ou des produits stupéfiants [2]. Son application à l'étude de la structure des molécules s'est développée plus récemment en parallèle avec le développement de nouvelles sources d'ionisation pour la spectrométrie de masse. Les bases théoriques de cette technique ont été énoncées au début du XX^{ème} siècle, en particulier par Paul Langevin lors de ses études du déplacement des ions dans un champ électrique [3]. Dans les années 1950 et 1960, McDaniel met au point les premières cellules de dérive pour l'étude de la mobilité des ions et des

réactions ion/molécule neutre en phase gazeuse [4, 5]. La détection des ions se fait alors avec un spectromètre de masse à secteur magnétique. Ce n'est que dans les années 1970 que le premier instrument commercial est présenté par Cohen et Karasek, sous le nom de chromatographie plasma [6]. Cet appareil utilise alors un analyseur quadrupolaire au lieu de l'analyseur à secteur magnétique. Dans les années 1990, l'utilisation de nouvelles sources d'ionisation électro-spray (ESI) et de désorption laser assistée par matrice (MALDI) et les progrès en spectrométrie de masse permettent d'élargir le champ d'application de la technique, en particulier à des biomolécules. Les pionniers dans ce domaine sont Bowers [7] pour le couplage avec une source MALDI, Hill [8] et Smith [9] pour l'utilisation de la source ESI. Outre l'utilisation de nouvelles sources d'ionisation, les performances du couplage IMS/MS ont considérablement été améliorées ces vingt dernières années par les groupes de Jarrold [10, 11] et Bowers [12-14] en particulier. Ces améliorations ont porté sur l'efficacité de transmission, de focalisation et de piégeage des ions par des champs électromagnétiques, et ont permis l'étude de clusters, puis de polymères et biomolécules. De nombreux travaux ont ainsi permis d'étudier l'influence de la répartition des charges [15], de la séquence [16, 17] ou de la solvation [18] sur la structure de peptides et de protéines en phase gazeuse. La structure d'acides nucléiques [19] et de glucides [20] a également pu être étudiée. La possibilité de préserver des édifices biomoléculaires faiblement liés dans le cadre de la spectrométrie de masse native a en outre permis la caractérisation de complexes non-covalents de protéines [21]. Ainsi, Bowers *et al.* [22] ont étudié l'agrégation de l'amyloïde β et proposé des mécanismes d'oligomérisation différents selon les alloformes. Les groupes de Robinson [23, 24] et Heck [25] ont étudié des complexes moléculaires de très grande taille, faisant de la mobilité ionique un outil pour la biologie structurale.

II. Mobilité et section efficace de collision

A. Théorie : relation entre mobilité et section efficace de collision

Lorsqu'un ion est accéléré dans un gaz par un champ électrique, sa vitesse (v_d) dépend de sa mobilité K et de la valeur du champ électrique (E), selon la relation suivante :

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

La mobilité (K) de l'ion dépend de sa section efficace de collision Ω avec le gaz. Pour expliciter cette relation, nous reprendrons le raisonnement développé par Revercomb et Mason [26].

L'accélération de l'ion de masse m et de charge q par le champ électrique E est $(qE)/m$. Soit τ le temps moyen entre deux collisions. Le gain de vitesse de l'ion entre deux collisions avec le gaz neutre est donc $(qE/m)\tau$. Or, à l'échelle macroscopique, la vitesse de l'ion v_d est constante, c'est-à-dire que la quantité de mouvement gagnée entre deux collisions est en moyenne égale à la quantité de mouvement transférée au gaz neutre lors de la collision :

$$M\langle \mathbf{V}' - \mathbf{V} \rangle = qE\tau \quad \text{Eq. II 2}$$

Avec M la masse de gaz neutre ; $\mathbf{V}'$ et $\mathbf{V}$ les vecteurs définissant les vitesses du gaz respectivement après et avant la collision. $\langle \mathbf{V}' - \mathbf{V} \rangle$ est une moyenne faite sur un grand nombre de collisions. On considère que la densité de gaz est suffisamment faible pour que seules les collisions binaires soient importantes, et qu'il y a assez peu d'ions relativement aux molécules de gaz pour les collisions entre deux ions soient négligeables par rapport aux collisions entre un ion et une molécule de gaz neutre. De même, on considère que la probabilité qu'une molécule de gaz entre en collision avec deux ions successivement est négligeable.

En notant qu'en l'absence de flux net de gaz, la vitesse des molécules de gaz avant collision est nulle en moyenne, l'équation précédente se réduit à :

$$M\langle \mathbf{V}' \rangle = qE\tau \quad \text{Eq. II 3}$$

Pour calculer $\langle \mathbf{V}' \rangle$, on considère que les collisions se font dans toutes les directions de l'espace avec la même probabilité. Donc les vitesses de l'ion ($\langle \mathbf{v}' \rangle$) et du gaz après collisions sont égales en moyenne, car la vitesse relative après collision est nulle en moyenne :

$$\langle \mathbf{V}' \rangle = \langle \mathbf{v}' \rangle \quad \text{Eq. II 4}$$

On peut maintenant utiliser la conservation de la quantité de mouvement lors d'une collision, aussi valable sur les valeurs moyennes des vitesses :

$$m\langle \mathbf{v} \rangle + M\langle \mathbf{V} \rangle = m\langle \mathbf{v}' \rangle + M\langle \mathbf{V}' \rangle \quad \text{Eq. II 5}$$

Avec $\langle \mathbf{v} \rangle \equiv v_d$; $\langle \mathbf{V} \rangle = 0$; et $\langle \mathbf{V}' \rangle = \langle \mathbf{v}' \rangle$.

Donc :

$$v_d = \frac{m + M}{m} \langle \mathbf{V}' \rangle \quad \text{Eq. II 6}$$

En insérant l'équation II 3 on obtient :

$$v_d = \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right) qE\tau \quad \text{Eq. II 7}$$

Il faut maintenant exprimer la valeur de τ . D'après la théorie cinétique des gaz, en prenant $\langle \mathbf{v}_r \rangle = \langle \mathbf{v} - \mathbf{V} \rangle$, la vitesse relative de l'ion et de la molécule de gaz avant collision, on obtient :

$$N = \frac{1}{\langle v_r \rangle \tau \Omega_D} \quad \text{Eq. II 8}$$

Avec Ω_D la section efficace de collision moyenne et N le nombre de densité.

D'où :

$$v_d = \frac{qE}{N} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right) * \frac{1}{\langle v_r \rangle \Omega_D} \quad \text{Eq. II 9}$$

Il faut désormais donner une approximation de la vitesse relative moyenne.

$$\langle v_r \rangle^2 \approx \langle v_r^2 \rangle = \langle |\mathbf{v} - \mathbf{V}|^2 \rangle = \langle v^2 \rangle + \langle V^2 \rangle - 2\langle \mathbf{v} \cdot \mathbf{V} \rangle \quad \text{Eq. II 10}$$

Or $\langle \mathbf{v} \cdot \mathbf{V} \rangle = 0$ car la vitesse $\mathbf{V}$ est distribuée de manière isotrope. On peut déterminer $\langle V^2 \rangle$ par l'énergie thermique des molécules :

$$\frac{1}{2} M \langle V^2 \rangle = \frac{3}{2} k_B T \quad \text{Eq. II 11}$$

Avec k_B la constante de Boltzmann et T la température.

Pour déterminer $\langle v^2 \rangle$, on se place dans le cas où le champ électrique est faible. L'énergie des ions est alors avant tout thermique.

$$\frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle = \frac{3}{2} k_B T \quad \text{Eq. II 12}$$

On peut donc donner une approximation de $\langle v_r \rangle^2$:

$$\langle v_r \rangle^2 = \frac{3k_B T}{m} + \frac{3k_B T}{M} \quad \text{Eq. II 13}$$

En injectant ceci dans l'équation II 9 on obtient :

$$v_d = \frac{1}{3^{1/2}} \frac{qE}{N} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{1/2} \left(\frac{1}{k_B T} \right)^{1/2} * \frac{1}{\Omega_D} \quad \text{Eq. II 14}$$

Cette équation a été obtenue en faisant les calculs sur des vitesses moyennes. En intégrant sur toutes les collisions possibles entre l'ion et le gaz selon les angles de dispersion et les énergies de collision, on obtient l'équation suivante :

$$v_d = \frac{3\sqrt{2\pi} qE}{16 N} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{1/2} \left(\frac{1}{k_B T} \right)^{1/2} * \frac{1}{\Omega_D} \quad \text{Eq. II 15}$$

Comme $v_d = KE$, on obtient l'équation de Mason-Schamp, qui donne la relation entre la mobilité et la section efficace de collision :

$$K = \frac{3\sqrt{2\pi} q}{16 N} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{1/2} \left(\frac{1}{k_B T} \right)^{1/2} * \frac{1}{\Omega_D} \quad \text{Eq. II 16}$$

D'après l'équation II.15, la vitesse de dérive de l'ion est proportionnelle à $\frac{E}{P}$; ou $\frac{E}{N}$, avec P la pression. Cependant cette équation n'est valable que pour les champs électriques faibles, car lorsque le champ électrique est élevé, la mobilité K dépend de la valeur du champ électrique, et v_d n'est plus proportionnelle à E . Un critère semi-quantitatif pour considérer que le champ électrique est faible est de vérifier le rapport : $\frac{E}{N} < \left(\frac{m}{m+M} \right)^2 * \frac{d^2}{z}$; où d est la somme des rayons de l'ion et de la molécule de gaz neutre (en angström), et z est le nombre de charge de l'ion. Le rapport $\frac{E}{N}$ s'exprime en Townsend ($1Td = 10^{-17} V.cm^2$). Les expériences de mobilité ionique sont typiquement menées dans des conditions où le rapport $\frac{E}{N}$ est compris entre 1 et 2 Td.

B. Largeur théorique des pics de mobilité et résolution maximale

Un paquet d'ions est envoyé dans le tube à un instant $t=0$. Ce paquet d'ion va s'élargir lors de sa dérive dans le tube de mobilité, sous l'effet de la diffusion. Les ions vont donc se disperser dans toutes les directions de l'espace, suivant un gradient de concentration, comme décrit par la loi de Fick :

$$J = -D \frac{dn}{dz} \quad \text{Eq. II 17}$$

Avec J le nombre d'ions qui diffusent à travers une unité d'aire par unité de temps ; D le coefficient de diffusion ; n le nombre d'ions par unité de volume et z un axe de dispersion. Le coefficient de diffusion D est lié à la vitesse de dérive des ions par la relation de Nernst-Einstein :

$$v_d = \frac{FD}{k_B T} \quad \text{Eq. II 18}$$

Avec $F = -\frac{dV}{dx}$; V la tension appliquée sur le tube de mobilité ; k_B la constante de Boltzmann ; T la température du tube de mobilité.

Comme $F = qE$ et $v_d = KE$; l'équation II 18 devient :

$$K = \frac{qD}{k_B T} \quad \text{Eq. II 19}$$

Avec q la charge de l'ion. La mobilité d'un ion donné dans un gaz dépend donc de son coefficient de diffusion dans ce gaz. L'élargissement du paquet d'ion se faisant dans toutes les directions de l'espace, la densité d'ions s'écrit alors :

$$\rho(x, y, z, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2+y^2+z^2}{4Dt}} \quad \text{Eq. II 20}$$

Le centre de la distribution se déplace à une vitesse v_d le long de l'axe z . Sa position est définie par :

$$z_0(t) = v_d t \quad \text{Eq. II 21}$$

La densité d'ions dans le tube, à un instant t s'écrit alors :

$$\rho(x, y, z, t) = \frac{1}{\sqrt{(4\pi Dt)^3}} \cdot e^{-\frac{x^2+y^2}{4Dt}} \cdot e^{-\frac{(z_0(t)-z)^2}{4Dt}} \quad \text{Eq. II 22}$$

Le nombre d'ions détectés au temps t à la fin du tube ($z = L$) est

$$N(t) = \int_{x,y} dx \cdot dy [\rho(x, y, z, t)] = \frac{I_0}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot e^{-\frac{v_d^2(t-t_d)^2}{4Dt}} \quad \text{Eq. II 23}$$

Avec : I_0 somme des ions selon x et y .

Cette répartition temporelle des ions selon une gaussienne est vraie si l'on considère que tous les ions sont envoyés dans le tube au même instant $t=0$. La largeur à mi-hauteur (FWHM) de la distribution temporelle est alors :

$$FWHM = \sigma * 2\sqrt{2 \ln(2)} \quad \text{Eq. II 24}$$

Avec :

$$\sigma = \frac{\sqrt{2Dt_d}}{v_d} \quad \text{Eq. II 25}$$

En injectant l'équation II 18 dans l'équation II 25, on obtient :

$$\sigma = t_d \sqrt{\frac{2k_B T}{qV}} \quad \text{Eq. II 26}$$

$$FWHM = 4t_d \sqrt{\ln(2)} \sqrt{\frac{k_B T}{qV}} \quad \text{Eq. II 27}$$

Comme la résolution R est par définition :

$$R = t_d / FWHM \quad \text{Eq. II 28}$$

En insérant l'équation II 27 dans l'équation II 28, on obtient la formule donnant la résolution maximale, limitée par la diffusion:

$$R_{max} = \frac{1}{4\sqrt{\ln(2)}} \sqrt{\frac{qV}{k_B T}} \quad \text{Eq. II 29}$$

D'après cette équation, pour un ion de charge q donnée, la résolution de la mesure de mobilité ne dépend que de la tension appliquée sur le tube de dérive, et de la température du gaz, une haute tension et une basse température correspondant aux meilleures conditions de mesure. On note que la résolution augmente également avec la charge de l'ion.

C. Application : détermination expérimentale des sections efficaces de collision

Comme démontré précédemment, la section efficace de collision d'un ion dans un gaz donné est liée à la mobilité de l'ion dans ce même gaz (équation II 16). Et d'après l'équation II 1 qui exprime la vitesse de dérive de l'ion dans le tube de mobilité en fonction de sa mobilité, on déduit :

$$t_d = \frac{L}{KE} \quad \text{Eq. II 30}$$

Avec L , la longueur du tube de dérive. Or, lors des expériences de mobilité/masse, nous mesurons le temps total (t) entre l'injection des ions dans le tube de mobilité, et leur détection dans le spectromètre de masse.

$$t = t_0 + t_d \quad \text{Eq. II 31}$$

Avec t_0 , le temps passé par l'ion dans l'ensemble des éléments d'optique ionique de l'appareil, excepté dans les tubes de dérive. t_0 est indépendant du champ électrique appliqué sur le tube de mobilité. On peut alors exprimer :

$$t = t_0 + \frac{L}{K} * \frac{1}{E} \quad \text{Eq. II 32}$$

En faisant varier la tension appliquée sur le tube et en gardant tous les autres paramètres constants, on peut tracer la droite $= f\left(\frac{1}{E}\right)$, dont l'ordonnée à l'origine correspond à t_0 et le coefficient directeur est $\frac{L}{K}$. En insérant la pente dans l'équation de Mason-Schamp, on obtient :

$$\Omega_D = \frac{3\sqrt{2\pi}}{16} \frac{q}{N} \left(\frac{1}{\mu}\right)^{1/2} \left(\frac{1}{k_B T}\right)^{1/2} * \frac{Pente}{L} \quad \text{Eq. II 33}$$

Avec la densité d'ions $= \frac{p}{k_B T}$, et p la pression dans le tube de mobilité et μ la masse réduite. Connaissant tous les autres paramètres, en mesurant expérimentalement la pente, on peut déterminer la section efficace de collision.

III. Les différents types de mobilité ionique

Bien que la mobilité ionique repose toujours sur le même principe de séparation des ions selon leur mobilité dans un gaz, il existe une grande variété d'appareils ayant des modes de fonctionnement divers. Tout d'abord, certains appareils permettent d'analyser les ions selon leur dispersion, temporelle ou spatiale, alors que d'autres appareils fonctionnent comme des filtres en fonction de la mobilité des ions. Ensuite, il est possible de piéger et libérer sélectivement les ions sur d'autres géométries d'appareils. Et enfin, la technique de spectrométrie de mobilité ionique a connu un fort développement ces dernières années et il existe aujourd'hui des appareils permettant une analyse en tandem.

A. Séparation temporelle et spatiale

Mobilité ionique dans un tube de dérive (DTIMS).

Cette technique de séparation est la configuration traditionnelle des appareils de mobilité ionique. Le principe de fonctionnement en a déjà été détaillé dans la partie I. Origine et principe de la mobilité ionique. En DTIMS, les ions sont analysés dans un champ électrique homogène et continu. Ils sont séparés puis analysés selon leur temps de dérive dans le tube de mobilité. Le premier appareil commercial date de 1970 [6], sous le nom de chromatographie plasma, et en 2014, Agilent Technologies a commercialisé un appareil DTIMS de haute performance (IMS-Q-ToF).

Mobilité ionique à champ oscillant (TWIMS).

La technique TWIMS a été présentée pour la première fois en 2004 par Gilles *et al.* [27]. L'appareil est constitué d'un guide d'ion de type SRIG (Stacked Ring Ion Guide) sur lequel une tension oscillante radiofréquence est appliquée. Une composante de tension continue est de plus appliquée successivement sur les électrodes du dispositif de manière à générer une « vague » de potentiel qui entraîne les ions le long de l'appareil à une vitesse qui dépend de leur mobilité. On obtient ainsi une dispersion temporelle des ions de mobilité différente qui peut être optimisée en ajustant l'amplitude et de la vitesse de la vague. Bien que la séparation se fasse dans des conditions de champ faible, il n'existe pas, comme dans un tube de dérive, de relation simple entre le temps de parcours des ions et leur section efficace de collision (CCS). En effet, la vitesse des ions varie au cours du temps d'une manière qui dépend des réglages de l'appareil. Ceci constitue une des principales limites de la technique TWIMS : pour obtenir une estimation des CCS une calibration doit être réalisée avec des composés similaires dont les CCS sont connues [28]. Le premier appareil TWIMS a été commercialisé par Waters en 2006 [29].

Mobilité ionique à boucle ouverte (OLIMS).

Cette technique de mobilité ionique permet une analyse des ions selon leur distribution spatiale. En effet, dans les appareil OLIMS [30], les ions sont entraînés par un gaz à travers un champ électrique transversal généré par une série de paires d'électrodes servant de détecteur (voir figure 2). Les ions de mobilité élevée, entraînés avant tout par le champ électrique, vont entrer en collision avec les premières électrodes. Les ions de faible mobilité vont être poussés par le gaz plus loin dans l'appareil et percuter des électrodes plus éloignées.

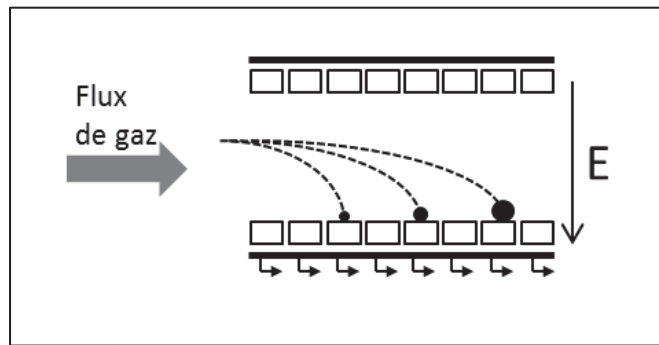


Figure 2. Schéma du fonctionnement d'un appareil OLIMS.

B. Les filtres en mobilité

Mobilité ionique à haut champ asymétrique (FAIMS).

Cette technique, qui fonctionne à champ électrique fort, se décline en deux types d'appareils : soit avec des électrodes circulaires, soit avec des électrodes planaires, aussi appelé Mobilité Différentielle (DMS). Le principe des analyses FAIMS [31] repose sur la différence de mobilité des ions à champ faible et à champ fort. Les ions, entraînés par un flux de gaz, passent entre deux électrodes planaires (voir figure 3). L'une des électrodes est reliée à la masse, sur l'autre est appliqué un courant asymétrique de radiofréquence et une tension continue de compensation. Les ions sont donc alternativement attirés par l'une ou l'autre des électrodes, par un champ faible ou un champ fort. Selon la différence de mobilité à champ fort et champ faible, la trajectoire de l'ion est stable, ou non. En effet, l'expression de la mobilité est donnée par l'équation suivante :

$$K(E) = K(0) \left[1 + \alpha_1 \left(\frac{E}{N} \right)^2 + \alpha_2 \left(\frac{E}{N} \right)^4 + \dots \right] \quad \text{Eq. III 1}$$

A champ faible, on peut faire une approximation au premier ordre : la mobilité est donc constante. Cependant à champ élevé, cette approximation n'est plus valable, et la mobilité dépend

du champ électrique. La relation entre la vitesse de l'ion (v) et sa mobilité dans le gaz (K) donnée par l'expression $v = K * E$ n'est donc plus linéaire.

Les appareils FAIMS peuvent être utilisés à pression atmosphérique, et permettent de détecter simultanément des anions et des cations. Cependant les CCS ne peuvent pas être mesurées par cette technique, du fait de l'absence de relation de proportionnalité entre la vitesse de l'ion et sa section efficace de collision dans le gaz tampon.

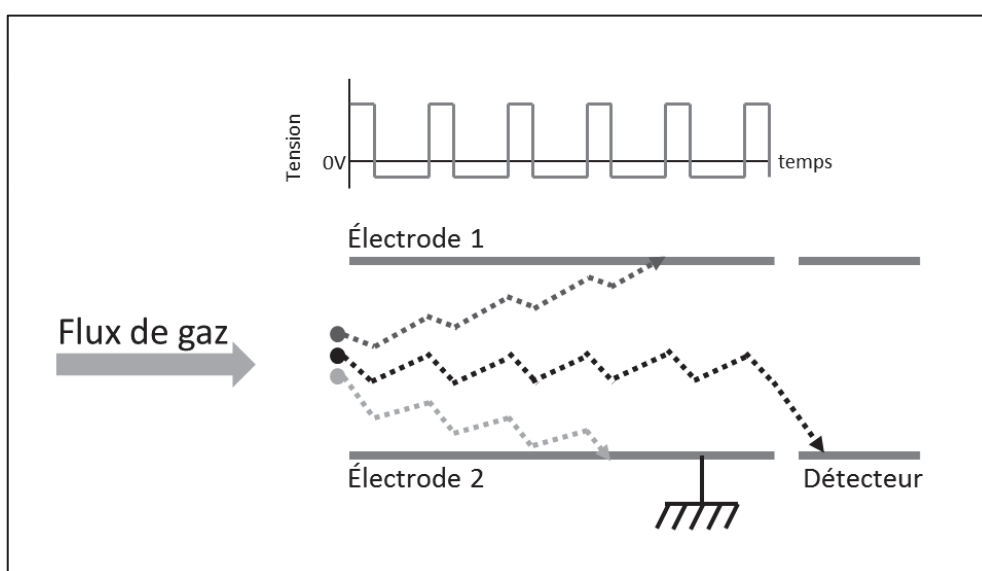


Figure 3. Schéma d'un appareil de mobilité FAIMS

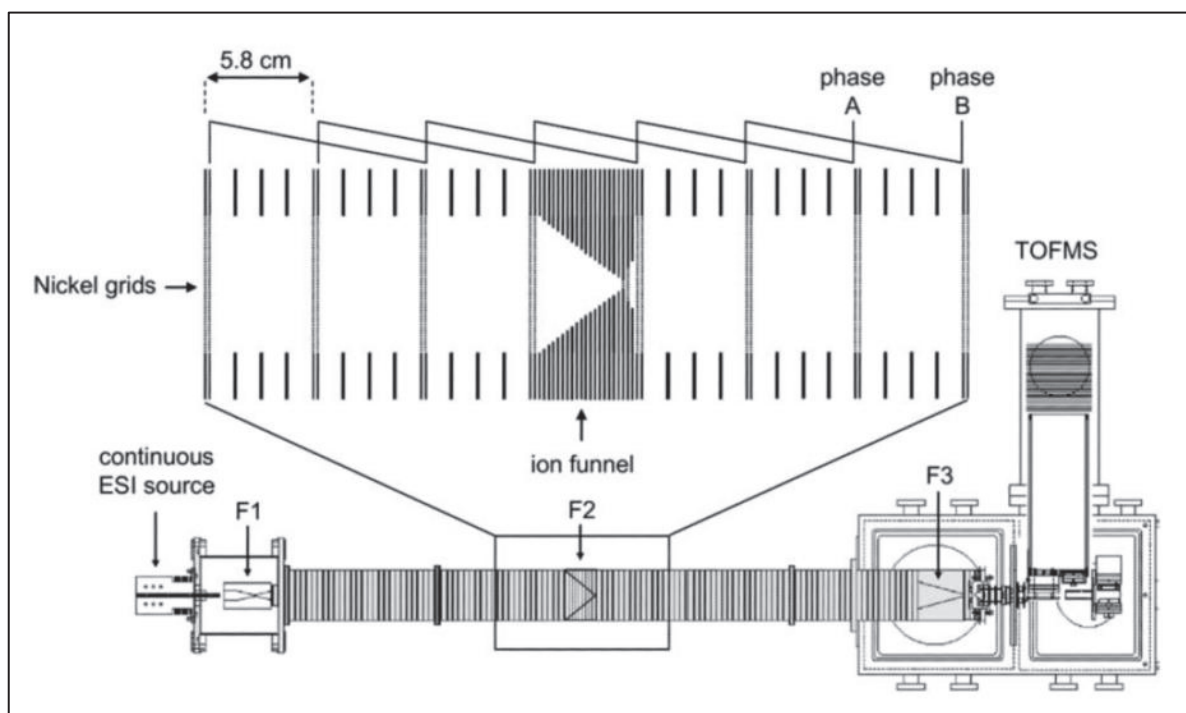


Figure 4. Schéma d'un appareil de mobilité OMS.

Mobilité ionique harmonique (OMS).

La technique OMS a été décrite par Clemmer *et al.* en 2009 [32, 33]. L'appareil OMS est un tube de dérive linéaire qui est utilisé comme filtre de mobilité ionique continu. Celui-ci est composé de multiples segments de région de dérive (voir figure 4). Sur chaque segment, ou groupe de segments, un même champ électrique décroissant est appliqué. La phase de ce champ électrique est modulée (voir figure 4, phase A et B). Pour qu'un ion soit transmis, il faut qu'en traversant le tube il voit un potentiel toujours décroissant. Ainsi, seuls les ions dont la vitesse de dérive est en phase avec les modulations du champ électrique sont transmis. En changeant la fréquence ou la phase de ces modulations, il est possible de transmettre des ions ayant des mobilités différentes. La technique se nomme ainsi car de meilleures résolutions de mobilité ont été obtenues pour des fréquences correspondant aux harmoniques de la fréquence de résonance d'un ion. La fréquence de résonance de l'ion est alors définie comme l'inverse du temps nécessaire à l'ion pour traverser un segment du tube.

Autres techniques de filtre en mobilité.

Les deux techniques de séparation spatiale par mobilité ionique suivantes présentent des similarités avec les appareils OLIMS. Dans la technique d'analyse par mobilité différentielle (DMA) [34], les ions sont, comme en mobilité à boucle ouverte, entraînés par un flux de gaz entre deux électrodes générant un champ électrique transversal. La trajectoire des ions résulte à la fois de l'entraînement par le gaz et de l'entraînement par le champ électrique. Seuls les ions ayant une certaine mobilité ont une trajectoire allant vers le détecteur (voir figure 5.a). La technique de mobilité ionique par modulation transversale (TMIMS) [35] est un sous-type de DMA. Les ions sont accélérés par un champ électrique axial, et un champ électrique oscillant transversal modifie leurs trajectoires en fonction de leur mobilité (voir figure 5.b.). Seuls les ions focalisés atteignent le détecteur.

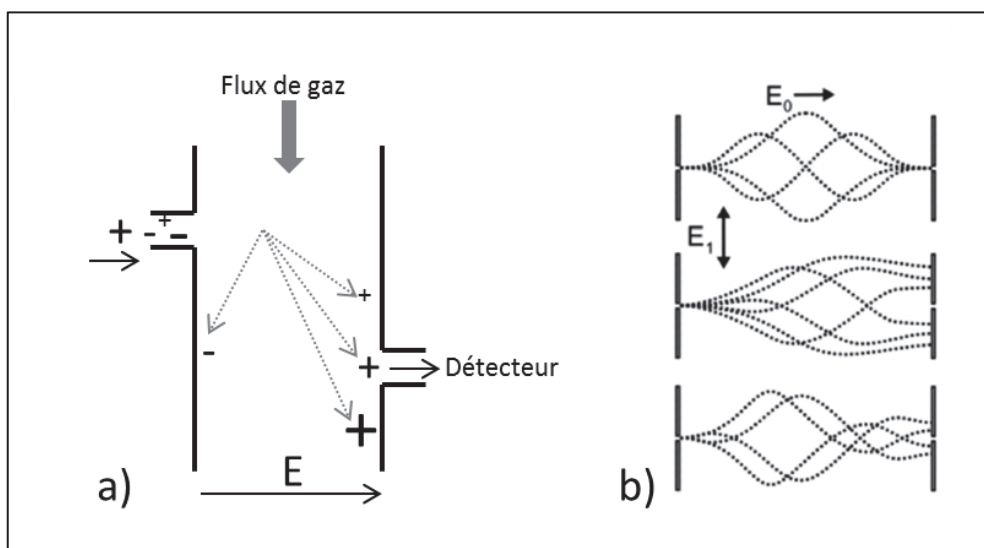


Figure 5. Schéma des appareils de mobilité a) DMA et b) TMIMS

C. Piégeage et libération sélective des ions

Mobilité à trappe ionique (TIMS).

Les appareils de mobilité ionique TIMS [36] fonctionnent comme des tubes de dérive à contre-courant. Ils se composent d'un tube de dérive, ou d'un entonnoir à ion sur lequel un champ électrique faible non uniforme croissant est appliqué. Le flux de gaz entraîne les ions le long de l'appareil, tandis que le champ électrique les ralentit. Un courant alternatif de radio-fréquence maintient les ions focalisés au centre du tube. Les ions sont séparés en fonction de leur mobilité : ils migrent dans le tube jusqu'à la région où le champ électrique est suffisamment fort pour compenser les forces de dérive générées par le flux de gaz. Ils sont ensuite élués en abaissant le champ électrique : les premiers ions détectés sont ceux ayant la mobilité la plus faible.

IMS circulaire.

Avec la technique DTIMS, les principales limites pour augmenter la résolution sont la longueur du tube de dérive et l'intensité du champ électrique. Pour dépasser ces limites, Clemmer *et al.* ont développé un appareil de mobilité à tube de dérive cyclique [37]. Celui-ci se compose de huit régions : quatre tubes de dérive incurvés séparés par quatre entonnoirs à ion qui focalisent en permanence les paquets d'ions (voir figure 6). Les ions sont introduits et éjectés de la boucle via des segments en Y (segments D1 et D4). Une porte électrostatique permet aux ions de rester dans le tube de dérive pendant un grand nombre de boucles. En effet, il est possible de piéger des ions pendant plus de 100 cycles, ce qui revient à faire une séparation dans un tube de 180 cm. Piéger les ions un grand nombre de cycles nécessite de réaugmenter le potentiel appliqué sur chaque tube de dérive, afin que les ions aient assez d'énergie potentielle pour dériver malgré les collisions. Le champ électrique est donc changé à une fréquence en résonance avec le temps de dérive des ions à travers chaque région, de manière comparable à une séparation en mobilité OMS à quatre phases.

En utilisant la technique TWIMS, il n'est pas nécessaire de réaugmenter le potentiel électrique à chaque cycle, puisque les ions entrent et sortent du tube de mobilité au même potentiel. Un appareil de mobilité ionique cycle TWIMS a ainsi été développé par Giles en 2014 en modifiant un appareil commercial Synapt G2-S [38].

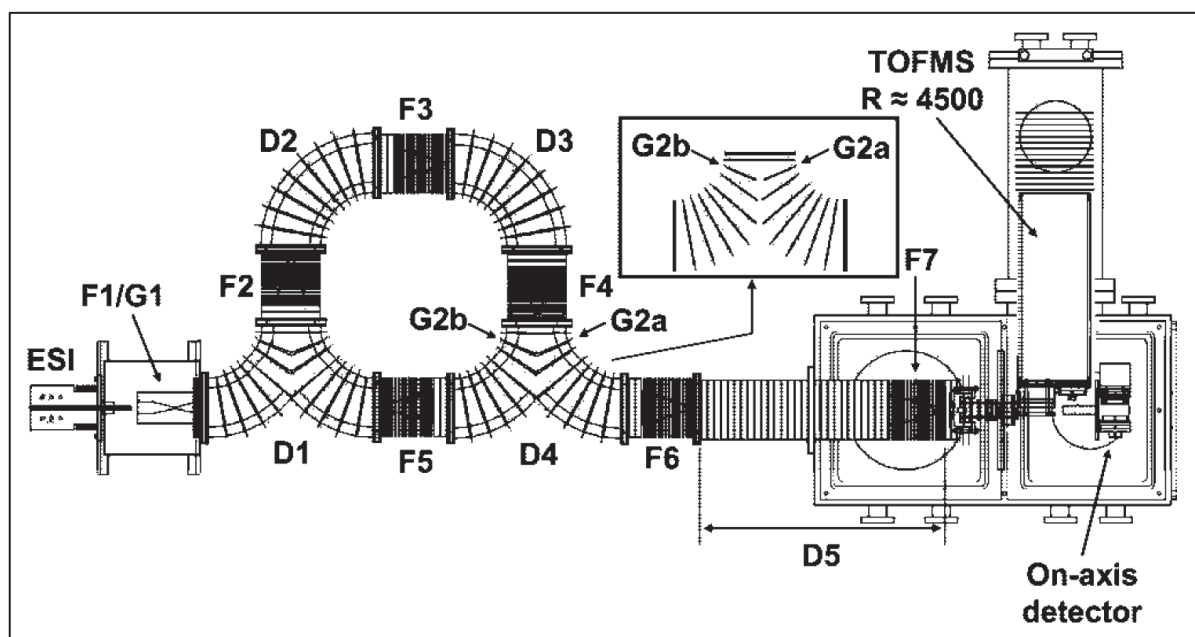


Figure 6. Schéma de l'appareil de mobilité DTIMS cyclique.

D. Mobilité ionique multidimensionnelle : tandem IMS

La spectrométrie de mobilité ionique (IMS) est une technique d'analyse d'ions en phase gazeuse qu'il est possible de coupler avec d'autres techniques analytiques, telles que la spectrométrie de masse (MS). Le spectromètre de masse sert alors à la détection des ions. Le couplage IM-MS permet une séparation des analytes en fonction de leur rapport taille sur charge, dans un premier temps, par mobilité ionique, suivie d'une séparation en fonction de leur rapport masse sur charge, dans un deuxième temps, par spectrométrie de masse, permettant d'accéder à deux dimensions d'analyse simultanément. Il est ainsi possible d'analyser les fragments produits par l'activation d'un conformère spécifiquement sélectionné en mobilité, soit par collisions [39], soit par laser [40].

Pour effectuer l'analyse de produits d'activation autres que des fragments (isomérisation ou conversion interne), le simple couplage IM-MS n'est pas suffisant. On peut alors avoir recours à une analyse IMS en tandem : on effectue deux séparations successives en mobilité, préalables à la détection par spectrométrie de masse. Le principe peut être décrit par analogie à la spectrométrie de masse en tandem (MS^2). En MS^2 , les ions sont d'abord sélectionnés en fonction de leur rapport masse sur charge, puis activés, et enfin analysés. En tandem IMS, les ions sont séparés en fonction de leur rapport taille sur charge, puis les conformères sélectionnés peuvent être activés et les produits d'activation sont séparés selon leur mobilité avant d'être analysés par spectrométrie de masse.

Les techniques d'instrumentation de mobilité ionique DTIMS en tandem ont été largement développées par le groupe de Clemmer. En effet, il présente en 2006 des instruments $DTIMS^2$ -MS [41], et $DTIMS^3$ -MS [42] (voir figure 7), permettant l'analyse de protéines [43, 44]. Ce dernier appareil se compose de trois tubes de dérive successifs (notés D1, D2 et D3), séparés par deux entonnoirs à ions (F2 et F3) et des portes électromagnétiques (G2 et G3) permettant la sélection des ions selon

leur mobilité et leur activation par collisions. Cependant la mobilité ionique en tandem ne se limite pas à la technique DTIMS. Ainsi, un couplage FAIMS-DTIMS est présenté par Smith [45, 46], un appareil IMS-DMS par Hill [47], et un appareil DMS-DMS par Menlyadiev et Eiceman [48]. Le couplage DMS-DMS présente un avantage en cela qu'il permet une sélection facile et en continu des ions. Par ailleurs, l'instrument DTIMS circulaire présenté ci-avant peut également être considéré comme un appareil de mobilité ionique en tandem permettant des analyses DTIMSⁿ-MS, n dépendant du nombre de boucles effectuées.

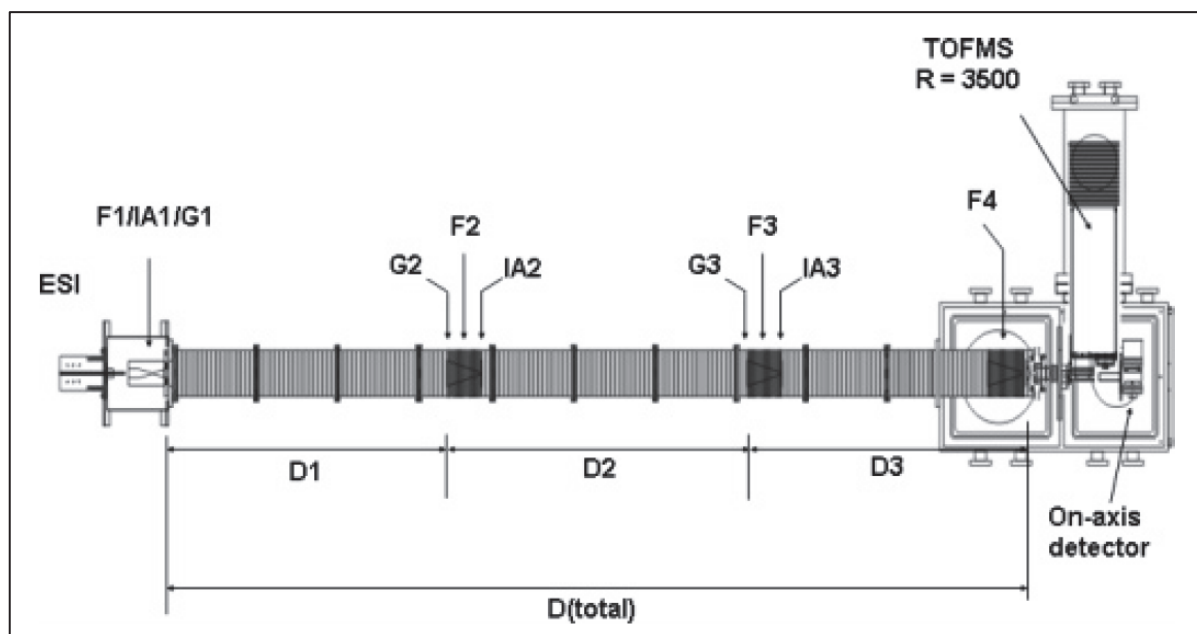
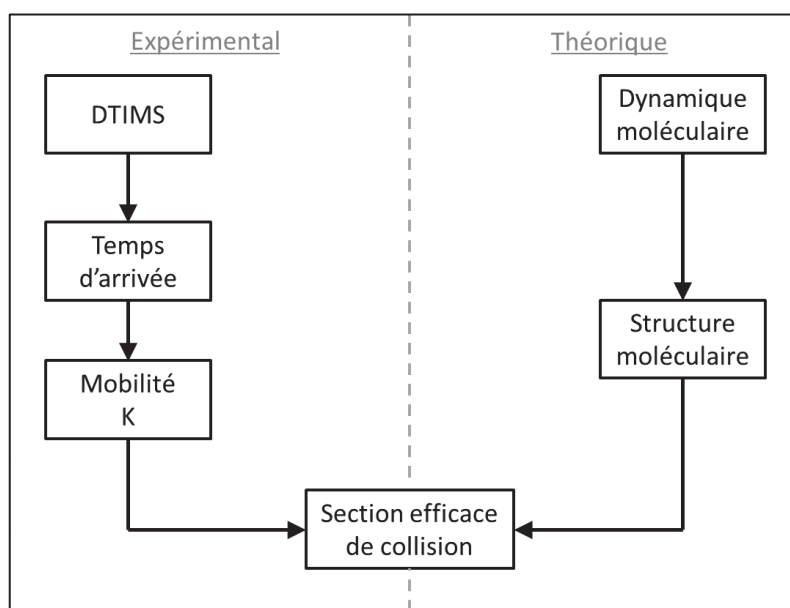


Figure 7. Schéma de l'appareil DTIMS³-MS développé par Clemmer.

IV. Détermination de la structure des molécules

La spectrométrie de mobilité ionique ne permet pas de déterminer directement la structure des systèmes étudiés. En revanche, la mesure de la mobilité permet de calculer la section efficace de collision expérimentale des ions. Cette valeur expérimentale doit être considérée comme une propriété de la molécule qui peut être comparée à une valeur calculée pour une structure obtenue par des méthodes de chimie théorique. La comparaison expérience/théorie permet au minimum d'exclure des structures dont la section efficace ne correspond pas aux mesures. Dans le cas où les structures obtenues par simulation ont des sections efficaces compatibles avec celles mesurées, il est possible d'attribuer des structures aux différentes espèces détectées expérimentalement.

Au niveau de la théorie, deux problèmes se posent : il faut d'une part déterminer des structures « réalistes » par optimisation globale de la structure, et d'autre part calculer les sections efficaces de collision de ces structures. Dans le paragraphe suivant, nous donnerons un aperçu des méthodes possibles pour l'exploration conformationnelle des molécules étudiées. Nous décrirons ensuite différentes méthodes de calcul des sections efficaces.



A. Calcul de la structure des molécules

Dans le cas le plus simple, on dispose déjà de structures pour les systèmes étudiés. Celles-ci ont été obtenues par d'autres méthodes analytiques telles que la diffraction X, ou la RMN.

Lorsque ce n'est pas le cas, le problème est de trouver des structures réalistes pour les molécules étudiées. Pour cela, on va essayer de déterminer la ou les structures les plus stables en énergie, ce qui pose problème pour les peptides et les protéines car ce sont des chaînes d'acides aminés qui peuvent adopter un grand nombre de structures [49]. Il faudrait donc explorer toutes les structures possibles et comparer leurs énergies pour trouver le minimum (voir figure 8). C'est

pourquoi, les méthodes de chimie quantique comme les calculs ab-initio, la DFT, et les méthodes semi-empiriques sont exclues. L'approche généralement utilisée consiste donc à modéliser les interactions par des champs de forces classiques.

Même en champs de forces, il est difficile d'explorer la totalité du paysage conformationnel des systèmes étudiés par des méthodes de dynamique moléculaire simples. Pour les petits systèmes (peptides jusqu'à une vingtaine d'acides aminés), la méthode REMD (Replica Exchange Molecular Dynamics) [50] est une méthode d'exploration efficace. Le principe de la méthode REMD est représenté en figure 8. Cela consiste à lancer de manière indépendante n simulations de dynamique moléculaire à n températures différentes (sur la figure 8, $n=3$). Les simulations à basses températures permettent d'identifier les minima d'énergie. Cependant, les barrières de potentiel entre différentes conformations correspondant à différents minima peuvent être difficilement franchissables à basses températures. En revanche, à hautes températures, ces mêmes barrières de potentiel sont aisément franchissables, mais les minima d'énergie sont difficilement identifiables. C'est pourquoi, occasionnellement, des échanges sont effectués entre les répliques, toujours de sorte à ce qu'il n'y ait qu'une réplique par température. Ainsi, les barrières de potentiel peuvent être et les différents minima d'énergie peuvent être identifiés.

Pour des systèmes plus gros, il est cependant souvent nécessaire d'utiliser des méthodes de type gros grains [51, 52]. Dans le cas des peptides, il est également possible de contraindre les simulations en utilisant des données expérimentales : on peut ainsi ajouter des contraintes imposant par exemple des distances entre certains atomes [50]. Enfin, on peut citer les travaux récents de Stow *et al.* reposant sur une exploration purement géométrique de l'espace des configurations ne faisant appel à aucun champ de forces [53].

Pour chacune des structures identifiées au cours de la dynamique, une section efficace peut être calculée et comparée à la valeur mesurée. Pour attribuer une structure au système étudié, on se base sur un compromis entre l'énergie de la structure (la plus basse possible) et son accord avec la section efficace de collision expérimentale. Dans le cas des simulations REMD, il est de plus possible de générer des distributions des différentes structures présentes à la température de l'expérience. En effet, la méthode REMD consiste à générer X copies d'un système, et à faire évoluer ces copies à des températures fixées (X températures différentes, de sorte qu'il n'y ait qu'une réplique par température). On explore ainsi le paysage conformationnel à des températures données. On peut ensuite calculer les CCS théoriques des structures présentes à une températures données, et obtenir de la sorte une distribution théoriques des CCS. Cela permet une comparaison directe avec les distributions de temps d'arrivées mesurés plutôt qu'une simple comparaison avec une valeur moyenne [17, 54].

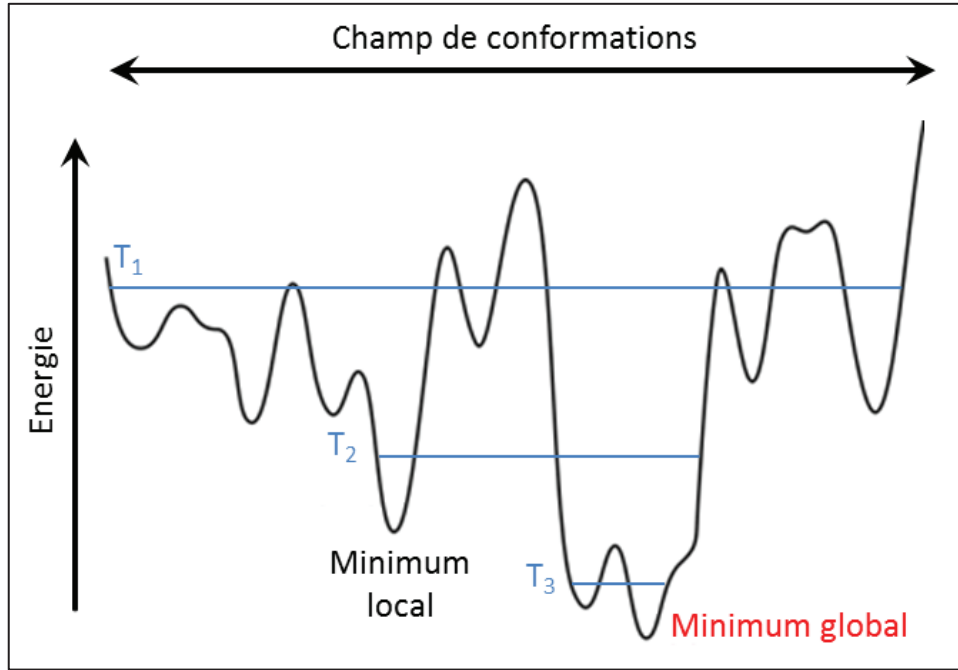


Figure 8. Schéma du champ de conformation d'un système, avec minima locaux et minimum global d'énergie.

B. Calcul des sections efficaces de collision

Le calcul d'une section efficace pour une structure candidate n'est pas un problème trivial. Il s'agit de calculer la section efficace moyenne (Ω_{moy}) de transfert d'impulsion lors des collisions ion-gaz en prenant en compte la distribution des vitesses relatives accessibles à la température de l'expérience, ainsi que l'ensemble des paramètres d'impact et des orientations possibles de l'ion :

$$\Omega_{moy} = \frac{1}{4\pi^2} \int_0^{2\pi} d\theta \int_0^\pi d\varphi \sin\varphi \int_0^{2\pi} d\gamma \frac{\pi}{8} \quad \text{Eq. IV 1}$$

$$* \left(\frac{\mu}{k_B T} \right)^3 \int_0^\infty dg e^{-\mu g^2 / 2k_B T} * \int_0^\infty db 2b (1 - \cos\chi(\theta, \varphi, \gamma, g, b))$$

Avec θ , φ et γ les paramètres définissant la géométrie de collision ; $\chi(\theta, \varphi, \gamma, g, b)$ l'angle de déflexion ; g la vitesse relative ; μ la masse réduite et b le paramètre d'impact.

Ce calcul n'est pas possible analytiquement dans le cas général et demande donc une intégration numérique.

Différentes méthodes, donnant des descriptions des collisions différentes, ont été développées. Afin de moyenner les orientations, toutes ces méthodes sont basées sur des intégrations de Monte-Carlo. L'approche la plus simple consiste à faire l'approximation que la CCS est égale à la surface moyenne projetée de la structure (PA) [55], la plus complexe se base sur un calcul de diffusion sur une surface d'isodensité électronique [56]. Nous ne décrivons ici que les méthodes les plus utilisées.

Projection de sphères dures (PA) [55].

Dans le modèle de projection de sphères dures, chaque atome est assimilé à une sphère dure dont le rayon dépend du type d'atome. L'approximation faite consiste à assimiler la section efficace de collision à une surface géométrique obtenue par projection de l'ion subissant une rotation dans toutes les directions de l'espace (voir figure 9.b). En effet, en première approximation, pour qu'une collision ait lieu, l'ion et la molécule de gaz doivent se trouver dans un cylindre (noté cylindre de collision sur la figure 9.a) dont le rayon est égal à la somme du rayon de l'ion et du gaz. La base du cylindre correspond alors à la section efficace de collision (notée CCS sur la figure). Ce modèle ne prend en compte ni les interactions à longue distance entre l'ion et le gaz, ni l'influence de la surface de la molécule (concavité) sur les collisions. Les CCS sont donc sous-estimées.

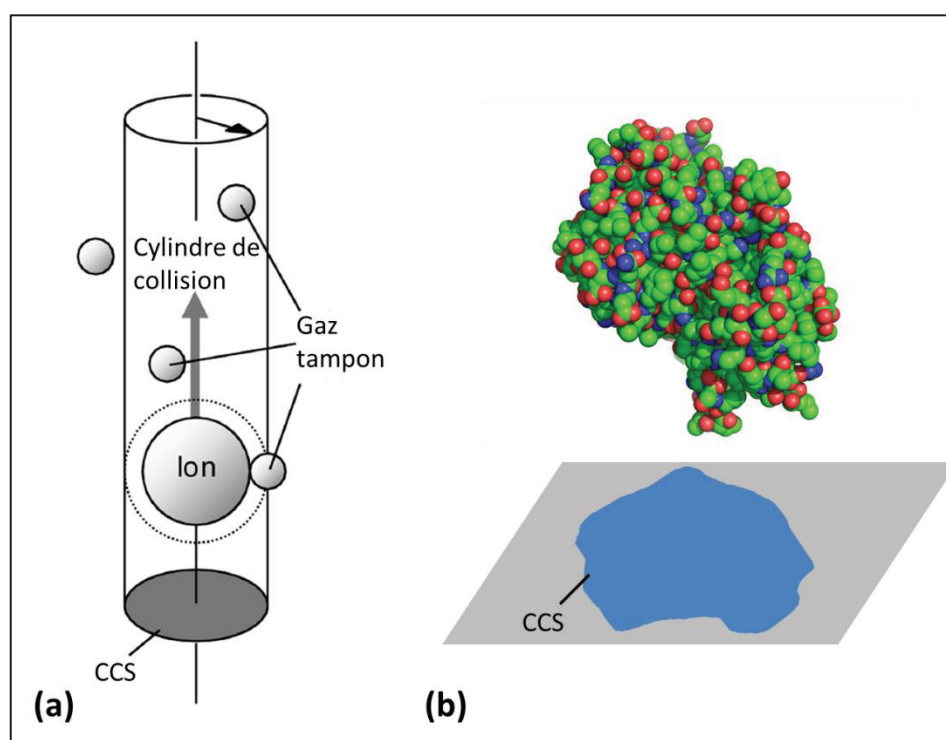


Figure 9. Modèle de projection de sphères dures.

Modèle de calcul des trajectoires de diffusion exacte avec modèle des sphères dures (EHSS) [57].

Dans ce modèle, les atomes de l'ion moléculaire et du gaz sont également assimilés à des sphères dures. On cherche ici à déterminer l'angle de déflexion χ d'une molécule de gaz lors d'une collision (voir figure 10.b). La trajectoire du projectile est calculée en considérant des collisions élastiques entre sphères dures. La simulation est répétée pour toutes les orientations possibles dans l'espace de l'ion moléculaire.

La forme de la surface de l'ion moléculaire est cette fois prise en compte à travers la possibilité pour un projectile de subir plusieurs collisions avec différents atomes de la surface de l'ion. Plus un

ion moléculaire comporte de concavités à sa surface, plus il y a des collisions multiples, ce qui modifie les transferts d'impulsion. La CCS est plus exacte que par le modèle PA. Cependant ce modèle ne tient pas compte des interactions à longues distances.

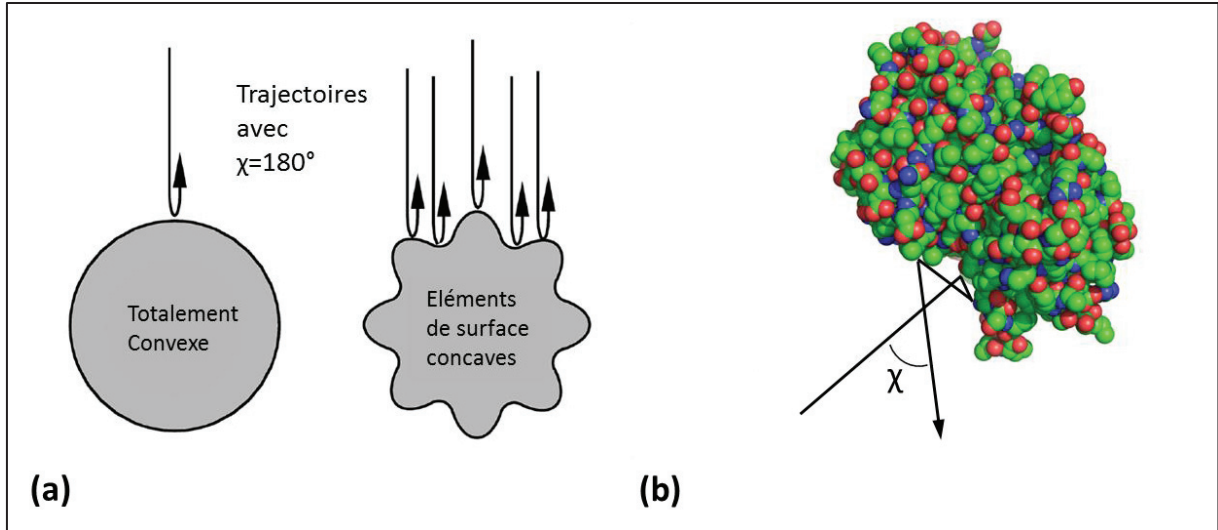


Figure 10. Trajectoires de diffusion exactes avec mode des sphères dures.

Modèle de calcul des trajectoires en utilisant un potentiel plus réaliste [58].

Dans ce modèle, on s'intéresse également aux trajectoires de diffusion du gaz après collision avec l'ion moléculaire. Mais cette fois, la trajectoire du gaz est propagée dans un potentiel créé par l'ensemble des atomes. L'interaction entre les atomes de l'ion et le gaz tampon est modélisée par une énergie potentielle, notée E_{pot} sur la figure 11.a, combinant les interactions ion-dipôle induit et le potentiel de paire entre le gaz et chaque atome de l'ion, de la forme Lennard-Jones, paramétrisé pour quelques atomes seulement. Ce modèle permet donc de prendre en compte les interactions longue distance. En effet, cette énergie dépend de la distance entre l'ion et la molécule de gaz, notée r sur la figure. Le potentiel de Lennard-Jones entre deux atomes s'exprime de la manière suivante :

$$E_{L-J}(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{d}{r} \right)^{12} - \left(\frac{d}{r} \right)^6 \right] \quad \text{Eq. IV 2}$$

Avec r la distance entre les noyaux atomiques ; d la distance entre les noyaux atomiques pour laquelle le potentiel est nul ($E_{L-J}(d) = 0$) ; et ε la profondeur du puit de potentiel.

Le potentiel considéré dans le modèle des trajectoires est la somme des interactions de Lennard-Jones et des interactions ion-dipôle induit, qui prend en compte la répartition des charges.

Pour un ion moléculaire composé de n atomes, le potentiel entre un atome de gaz et l'ensemble des atomes de l'ion moléculaire peut s'écrire comme suit :

$$E_{pot} = 4\varepsilon \sum_i^n \left[\left(\frac{d}{r_i} \right)^{12} - \left(\frac{d}{r_i} \right)^6 \right] - \frac{\alpha}{2} \left(\frac{ze}{n} \right)^2 \left[\left(\sum_i^n \frac{x_i}{r_i^3} \right)^2 + \left(\sum_i^n \frac{y_i}{r_i^3} \right)^2 + \left(\sum_i^n \frac{z_i}{r_i^3} \right)^2 \right] \quad \text{Eq. IV 3}$$

Avec x_i ; y_i ; et z_i les coordonnées définissant les positions relatives du gaz et des atomes de l'ion moléculaire ; r_i la distance entre les noyaux atomiques du gaz et des atomes de l'ion. ze est la charge de l'ion et α est la polarisabilité du gaz tampon.

Comme indiqué sur le diagramme de la figure 11.a, l'énergie potentielle est répulsive à très courte distance, attractive à distance moyenne et nulle à très longue distance. Les trajectoires des molécules de gaz environnant un ion moléculaire sont représentées sur la figure 11.b. La valeur de la section efficace de collision calculée avec ce modèle est donc plus précise qu'avec le modèle des sphères dures. Le modèle des trajectoires est valable quelle que soit la taille de l'ion. Cependant les calculs sont longs : il faut calculer les trajectoires pour l'ensemble des orientations possibles de l'ion. C'est pourquoi on privilégiera le modèle des sphères dures pour les petits ions, et on utilisera davantage le modèle des trajectoires pour les ions de taille moyenne (200 à 1000 atomes). De même, ce modèle, qui prend en compte les interactions ion-dipôle induit, est le seul avec lequel on peut reproduire l'effet de gaz de polarisabilités différentes.

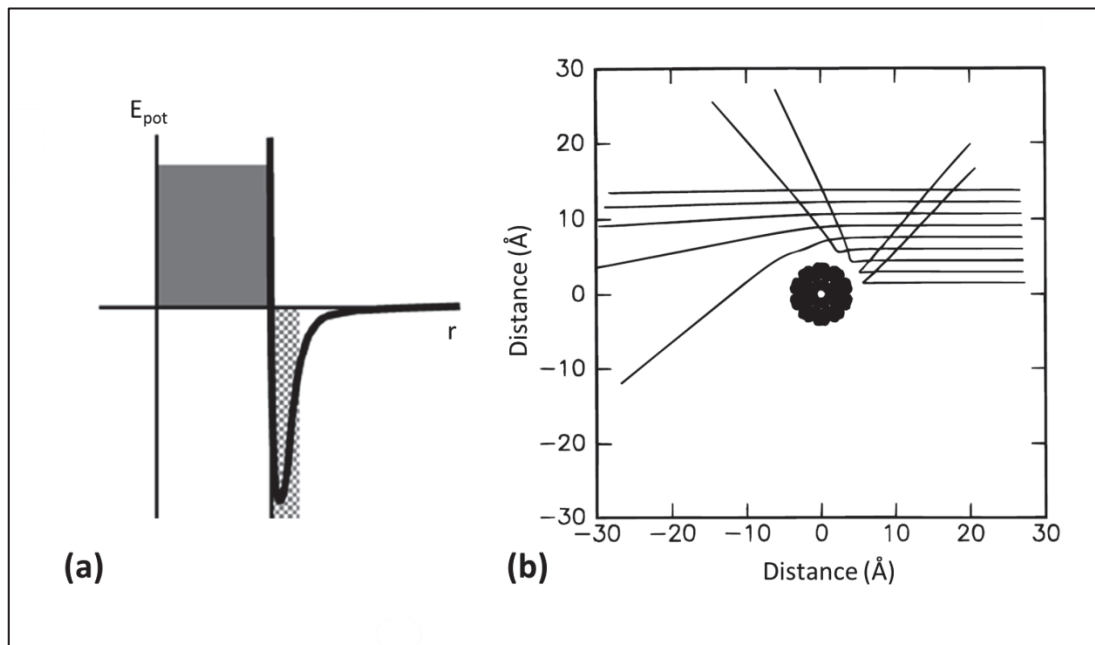


Figure 11. Modèle des trajectoires de diffusion en utilisant un potentiel intermoléculaire. a) potentiel de Lennard-Jones. b) trajectoires des molécules de gaz environnant l'ion moléculaire.

V. Couplage laser : la spectroscopie d'action

Les spectroscopies d'absorption et de fluorescence sont des outils largement utilisés pour la caractérisation de biomolécules en solution. Leurs applications sont diverses : détermination de la concentration d'analytes en solution via la loi de Beer-Lambert ou étude de la structure de molécules telles que les protéines. Néanmoins, en solution, les interactions entre l'analyte et le solvant ou entre deux molécules d'analyte peuvent générer des interférences. L'étude spectroscopique de ces mêmes systèmes en phase gazeuse permet d'éviter les effets de solvation, d'étudier les propriétés optiques intrinsèques de la molécule isolée et de déterminer l'influence de l'environnement sur les propriétés optiques du système. Cependant la principale difficulté de la spectroscopie d'ions en phase gazeuse vient de la faible densité des ions qui rend les mesures d'absorption [59, 60] ou de fluorescence [61-63] difficiles. Il est possible de contourner cette difficulté dans le cadre de la spectroscopie d'action qui consiste à mesurer l'effet de l'absorption d'une onde lumineuse sur les ions, essentiellement à travers la fragmentation ou le détachement d'électrons, au lieu de mesurer directement l'atténuation du flux lumineux.

A. Couplage MS-laser

Principe de la spectroscopie d'action.

Lorsqu'une onde lumineuse est absorbée par une molécule, différents phénomènes peuvent survenir, tels que la réémission de photon, la conversion interne, la photodissociation, l'émission d'électron ou la photo isomérisation. Comme la mesure de l'absorption est difficile en phase gazeuse, on va s'intéresser à la détection de ces phénomènes : c'est la spectroscopie d'action. Ce type de spectroscopie peut être réalisé par couplage avec une autre technique analytique, comme la spectrométrie de masse. L'un des phénomènes largement étudié est la photo dissociation : l'absorption d'un ou plusieurs photons par l'analyte provoque une rupture de liaisons covalentes, et les fragments peuvent être détectés par spectrométrie de masse. Le couplage de la spectroscopie laser avec la spectrométrie de masse en tandem permet de sélectionner un ion parent en fonction de son rapport masse sur charge, d'induire une photo dissociation, puis de détecter les fragments générés en fonction de leur rapport masse sur charge. Cette technique est à la fois sélective et très sensible, et permet différentes analyses selon que le spectromètre de masse est couplé à un laser dans le domaine du visible, de l'infrarouge ou de l'ultraviolet.

Expérimentation.

La spectroscopie d'action est une technique relativement récente, présentée pour la première fois en 1964, et qui a connu un essor dans les années 70 et 80, notamment grâce au développement des appareils de spectrométrie de masse (piège à ion, nouvelles sources d'ionisation) et au développement de nouvelles sources laser.

La première spectroscopie sur un ion sélectionné en masse a été présentée par Dunn en 1964 [64]. Il s'agit d'un couplage laser sur spectromètre de masse ICR permettant la photodissociation d'ions moléculaires, à des longueurs d'onde allant de 265 à 450 nm. La photodissociation dans l'UV et le visible s'est ensuite développée dans les années 70. L'une des avancées clés a été l'observation du processus de dissociation à deux photons par Beauchamp *et al.* en 1975 [65], dans le domaine de l'infrarouge et de l'UV-visible, ouvrant la voie aux études de dissociation par multi photons infrarouge (IRMPD). Cependant, cette dernière technique ne s'est développée que récemment, avec l'apparition des lasers à électrons libres (FEL) comme sources infrarouges accordables et puissantes, aux Pays-Bas (FELIX) [66] et en France (CLIO) [67]. Le développement des sources d'ionisation douces (ESI et MALDI) a permis d'élargir le champ d'étude à des systèmes présentant un intérêt biologique. La source ESI, qui donne accès à l'étude en phase gazeuse de molécule d'intérêt en solution, constitue un lien entre la spectroscopie en solution et la spectroscopie en phase gazeuse. Ainsi, les effets de solvatation ont pu être étudiés par comparaison des spectres obtenus en solution et en phase gazeuse dans le groupe de Metz [68], mettant ainsi en évidence un décalage de 1500 cm^{-1} entre les deux techniques. Par ailleurs, la possibilité d'observer des ions négatifs a permis l'étude de photo détachement d'électrons [69, 70]. Actuellement, un domaine de la spectroscopie en phase gazeuse particulièrement dynamique est la spectroscopie dans des pièges à ions froids, à des températures inférieures à 20 K, notamment dans les groupes de Maier [71] et Rizzo [72].

B. Couplage IMS-laser

Lors de l'analyse spectroscopique d'un mélange d'isomères, le spectre obtenu est la superposition des spectres des diverses structures du système. En effet, des isomères peuvent avoir des spectres différents, et leur superposition n'est plus représentative d'aucune géométrie. Différentes approches utilisant plusieurs laser ont été utilisées pour remédier à ce problème. Une autre approche est de séparer les isomères avant d'effectuer la spectroscopie. Le principe du couplage laser-IMS a été dans un premier temps d'effectuer une séparation des isomères, préalablement à une irradiation laser d'un isomère sélectionné. Un exemple de montage expérimental est présenté en figure 12. Il s'agit d'un tube de dérive placé avant un spectromètre de masse à piège à ion linéaire. Le tube de mobilité ionique sert ainsi de filtre, pour sélectionner un isomère qui est ensuite piégé dans le spectromètre de masse où il est irradié, pour obtenir un spectre d'action.

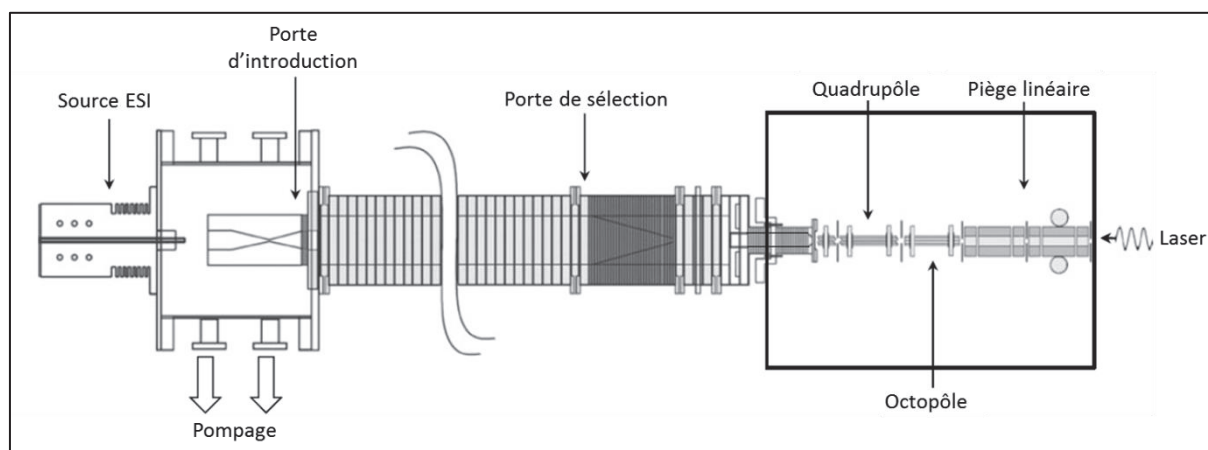


Figure 12. Couplage IMS-MS-laser, par Reilly et Clemmer [40].

Le couplage de la mobilité ionique comme filtre pour sélectionner un isomère avant irradiation a été présenté par Shvartsburg *et al.* en 2002 [73]. Il s'agit d'un couplage DTIMS-ToF utilisé pour faire de la spectroscopie photo-électronique sur des isomères cycliques ou linéaires d'agrégats de carbone. Shvartsburg a pu ainsi décomposer le spectre superposé d'un agrégat de carbone en différents spectres d'isomères sélectionnés. La spectroscopie photo-électronique a été également utilisée plus récemment pour l'étude structurale de l'ADN par Kappes *et al.* [74]. Les petits agrégats de carbone ont par ailleurs été étudiés par Misaizu *et al.* [75], sur un couplage DTIMS-ToF, fonctionnant en mode positif, afin de faire de la dissociation multi-photons. Dans ces expériences, Misaizu met en évidence des fragments spécifiques aux isomères linéaires ou cycliques des agrégats de carbone, et compare également les fragments obtenus par photodissociation de ceux obtenus par dissociation induite pas collision. En 2011, Reilly et Clemmer [40] étudient les différences de fragmentation par photodissociation ultraviolet (UVPD) d'isomères de trisaccharides sur l'appareil DTIMS-MS présenté sur la figure 12. En 2014, Warnke *et al.* [76] effectuent l'analyse spectroscopique d'un isomère spécifique de l'ubiquitine par UVPD. Ils montrent alors la dépendance des spectres UVPD des protéines en phase gazeuse envers la conformation de ces protéines, et la possibilité d'utiliser l'UVPD comme outils d'analyse conformationnelle.

Les expériences présentées précédemment sont issues de couplage de tubes de dérivation avec des spectromètres de masse. Cependant, des études spectroscopiques ont également été menées sur des couplages basés sur d'autres types de mobilité ionique. Ainsi, en 2011, Papadopoulos *et al.* [77] couplent un appareil FAIMS avec un piège à ions refroidi pour réaliser l'étude par UVPD des isomères de l'état de charge 2+ de la bradykinine. Ils décomposent ainsi un spectre dense en contribution des différentes familles conformationnelles. En 2014, Bellina *et al.* [78] étudient la dépendance conformationnelle de la photo-fragmentation de la Flavine MonoNucléotide par UVPD sur un couplage TWIMS-Q-ToF, et en 2015, Hernandez *et al.* [79] effectuent de la spectroscopie infrarouge sur des anomères α et β de glucose et mannose sur un couplage DIMS-piège ionique.

Dans toutes les expériences présentées ci-dessus, l'appareil de mobilité ionique est utilisé comme filtre pour sélectionner un isomère, et la spectroscopie d'action est effectuée dans le spectromètre de masse situé en aval. De tels couplages constituent un outil puissant pour l'étude des voies de photodissociation ou de détachement d'électrons. Cependant, l'étude de certains phénomènes tels que la photo-isomérisation reste inaccessible de par le fait que les produits de l'activation laser possèdent le même rapport masse sur charge que les ions parents, et ne sont donc pas discernables par spectrométrie de masse.

Le premier appareil permettant l'étude de photo-isomérisation a été présenté par Bieske *et al.* en 2013 [80]. Cet appareil (voir figure 13) se compose de deux tubes de dérive placés entre une source électro-spray et un spectromètre de masse à analyseur quadripolaire. L'activation laser peut se faire de trois manières, indiquées par des flèches rouges sur la figure 13 et notées modes 1, 2 et 3. Le laser peut être injecté soit perpendiculairement à l'axe du tube de mobilité (modes 1 et 2), soit coaxialement au tube de dérive (mode 3). Deux portes ioniques sont placées respectivement à l'entrée du premier tube et entre les deux tubes de mobilité. Cet appareil permet ainsi la sélection d'un isomère après une séparation dans le premier tube de mobilité, et l'activation laser spécifique de cet isomère entre la seconde porte ionique et le second tube de mobilité. Les produits de l'activation laser sont ensuite séparés dans le deuxième tube de mobilité, puis détectés par spectrométrie de masse. Il est ainsi possible de mesurer des spectres de photo-isomérisation (PISA), car les isomères produits par l'activation laser n'ont pas les mêmes temps de dérive. Les premières études de photo-isomérisation ont ainsi été réalisées par Bieske *et al.* sur différents systèmes tels que les carbocyanines [80, 81] et le rétinol [82-84]. Les mécanismes de photo-isomérisation présentent un intérêt biologique certain, puisqu'ils interviennent dans des phénomènes biochimiques tels que la vision.

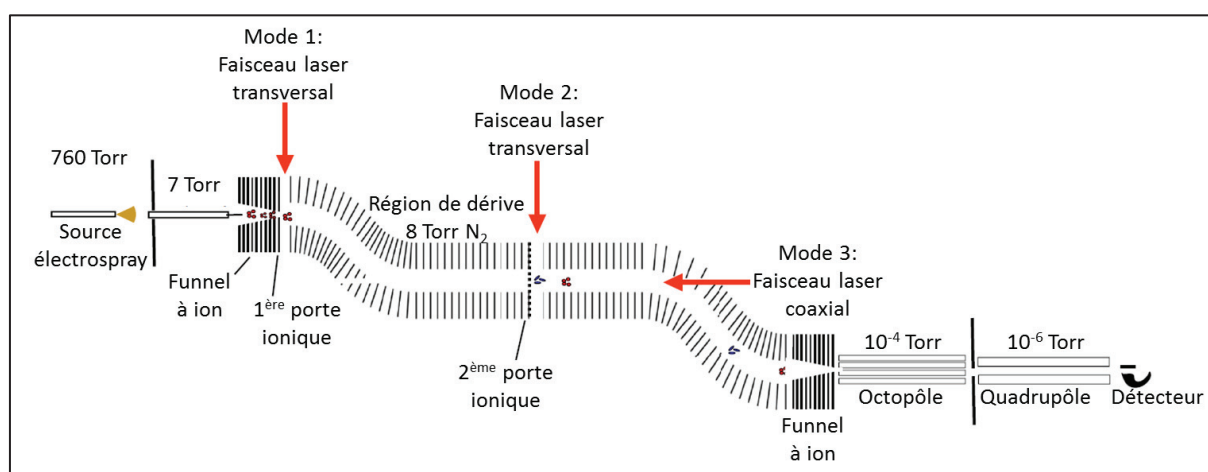


Figure 13. Schéma de l'appareil de double mobilité couplé à de l'activation laser de Bieske [85].

VI. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons expliqué le principe de la spectrométrie de mobilité ionique, ainsi que les méthodes de détermination de la structure des systèmes étudiés par cette technique. Les différents appareils de mobilité ionique existants ont été présentés, de même que les divers couplages existants avec la spectrométrie de masse et la spectroscopie laser. Ces couplages sont utilisés pour l'étude de phénomènes tels que le photo-détachement d'électron, la photodissociation, ou la photo-isomérisation. Dans la suite du manuscrit, nous détaillerons le développement dans notre laboratoire d'un appareil couplant ces trois techniques, de type IMS-Laser-IMS-MS, reposant sur un principe voisin de celui présenté par Bieske *et al.*

1. Makinen, M., M. Nousiainen, and M. Sillanpaa, *Ion spectrometric detection technologies for ultra-traces of explosives: a review*. Mass Spectrom. Rev., 2011. **30**(5): p. 940-973.
2. Lawrence, A., *Detection of drug residues on the hands of subjects by surface sampling and ion mobility spectrometry*. Forensic Sci. Int., 1987. **34**(1-2): p. 73-83.
3. Langevin, P., *A fundamental formula of kinetic theory*. Ann. Chim. Phys., 1905. **5**: p. 245-288.
4. McDaniel, E.W., D.W. Martin, and W.S. Barnes, *Drift Tube-Mass Spectrometer for Studies of Low-Energy Ion-Molecule Reactions*. Rev. Sci. Instrum., 1962. **33**(1): p. 2-7.
5. Barnes, W.S., D.W. Martin, and E.W. McDaniel, *Mass Spectrographic Identification of the Ion Observed in Hydrogen Mobility Experiments*. Phys. Rev. Lett., 1961. **6**(3): p. 110-111.
6. Cohen, M.J. and F.W. Karasek, *Plasma Chromatography™—A New Dimension for Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. J. Chromatogr. Sci, 1970. **8**(6): p. 330-337.
7. von Helden, G., T. Wyttenbach, and M.T. Bowers, *Inclusion of a MALDI ion source in the ion chromatography technique: conformational information on polymer and biomolecular ions*. Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1995. **146–147**: p. 349-364.
8. Wittmer, D., et al., *Electrospray Ionization Ion Mobility Spectrometry*. Anal. Chem., 1994. **66**(14): p. 2348-2355.
9. Smith, R.D., et al., *Principles and practice of electrospray ionization—mass spectrometry for large polypeptides and proteins*. Mass Spectrom. Rev., 1991. **10**(5): p. 359-452.
10. Clemmer, D.E. and M.F. Jarrold, *Ion mobility measurements and their applications to clusters and biomolecules*. J. Mass Spectrom., 1997. **32**(6): p. 577-592.
11. Dugourd, P., et al., *High-resolution ion mobility measurements*. Rev. Sci. Instrum., 1997. **68**(2): p. 1122-1129.
12. Kemper, P.R. and M.T. Bowers, *A hybrid double-focusing mass-spectrometer - High-pressure drift reaction cell to study thermal-energy reactions of mass-selected ions*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1990. **1**(3): p. 197-207.
13. Wyttenbach, T., P.R. Kemper, and M.T. Bowers, *Design of a new electrospray ion mobility mass spectrometer*. Int. J. Mass Spectrom., 2001. **212**(1–3): p. 13-23.
14. Kemper, P.R., N.F. Dupuis, and M.T. Bowers, *A new, higher resolution, ion mobility mass spectrometer*. Int. J. Mass Spectrom., 2009. **287**(1–3): p. 46-57.
15. Jarrold, M.F., *Helices and Sheets in vacuo*The HTML version of this article has been enhanced with colour images. Phys. Chem. Chem. Phys., 2007. **9**(14): p. 1659-1671.
16. Chen, L., et al., *Molecular Dynamics and Ion Mobility Spectrometry Study of Model β -Hairpin Peptide, Trpzip1*. J. Phys. Chem. A, 2011. **115**(17): p. 4427-4435.
17. Albrieux, F., et al., *Conformation of Polyalanine and Polyglycine Dications in the Gas Phase: Insight from Ion Mobility Spectrometry and Replica-Exchange Molecular Dynamics*. J. Phys. Chem. A, 2010. **114**(25): p. 6888-6896.
18. Woenckhaus, J., Y. Mao, and M.F. Jarrold, *Hydration of gas phase proteins: Folded +5 and unfolded +7 charge states of cytochrome c*. J. Phys. Chem. B, 1997. **101**(6): p. 847-851.
19. Gabelica, V., et al., *Stabilization and structure of telomeric and c-myc region intramolecular G-quadruplexes: The role of central cations and small planar ligands*. J. Am. Chem. Soc., 2007. **129**(4): p. 895-904.
20. Li, H.L., et al., *Carbohydrate Structure Characterization by Tandem Ion Mobility Mass Spectrometry (IMMS)*(2). Anal. Chem., 2013. **85**(5): p. 2760-2769.
21. Canon, F., et al., *Folding of a Salivary Intrinsically Disordered Protein upon Binding to Tannins*. J. Am. Chem. Soc., 2011. **133**(20): p. 7847-7852.
22. Bernstein, S.L., et al., *Amyloid β -Protein: Monomer Structure and Early Aggregation States of A β 42 and Its Pro19 Alloform*. J. Am. Chem. Soc., 2005. **127**(7): p. 2075-2084.
23. Ruotolo, B.T., et al., *Evidence for Macromolecular Protein Rings in the Absence of Bulk Water*. Science, 2005. **310**(5754): p. 1658-1661.
24. Ruotolo, B.T., et al., *Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes*. Nat. Protocols, 2008. **3**(7): p. 1139-1152.

25. Uetrecht, C., et al., *Interrogating viral capsid assembly with ion mobility–mass spectrometry*. Nat. Chem., 2011. **3**(2): p. 126-132.
26. Revercomb, H.E. and E.A. Mason, *Theory of plasma chromatography/gaseous electrophoresis. Review*. Anal. Chem., 1975. **47**(7): p. 970-983.
27. Giles, K., et al., *Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2004. **18**(20): p. 2401-2414.
28. Bush, M.F., et al., *Collision Cross Sections of Proteins and Their Complexes: A Calibration Framework and Database for Gas-Phase Structural Biology*. Anal. Chem., 2010. **82**(22): p. 9557-9565.
29. Pringle, S.D., et al., *An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument*. Int. J. Mass Spectrom., 2007. **261**(1): p. 1-12.
30. Sacristan, E. and A.A. Solis, *A swept-field aspiration condenser as an ion-mobility spectrometer*. IEEE T. Instrum. Meas., 1998. **47**(3): p. 769-775.
31. Buryakov, I.A., et al., *A new method of separation of multi-atomic ions by mobility at atmospheric pressure using a high-frequency amplitude-asymmetric strong electric field*. Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1993. **128**(3): p. 143-148.
32. Kurulugama, R.T., et al., *Overtone Mobility Spectrometry: Part 1. Experimental Observations*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2009. **20**(5): p. 729-737.
33. Valentine, S.J., et al., *Overtone Mobility Spectrometry: Part 2. Theoretical Considerations of Resolving Power*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2009. **20**(5): p. 738-750.
34. Intra, P. and N. Tippayawong, *An overview of differential mobility analyzers for size classification of nanometer-sized aerosol particles*. Songklanakarin J. Sci. Technol, 2008. **30**(2): p. 243-256.
35. Vidal-de-Miguel, G., M. Macia, and J. Cuevas, *Transversal Modulation Ion Mobility Spectrometry (TM-IMS), A New Mobility Filter Overcoming Turbulence Related Limitations*. Anal. Chem., 2012. **84**(18): p. 7831-7837.
36. Fernandez-Lima, F.A., D.A. Kaplan, and M.A. Park, *Note: Integration of trapped ion mobility spectrometry with mass spectrometry*. Rev. Sci. Instrum., 2011. **82**(12): p. 126106.
37. Merenbloom, S.I., et al., *High-Resolution Ion Cyclotron Mobility Spectrometry*. Anal. Chem., 2009. **81**(4): p. 1482-1487.
38. May, J.C. and J.A. McLean, *Ion Mobility-Mass Spectrometry: Time-Dispersive Instrumentation*. Anal. Chem., 2015. **87**(3): p. 1422-1436.
39. Hoaglund-Hyzer, C.S., et al., *Coupling ion mobility separations, collisional activation techniques, and multiple stages of MS for analysis of complex peptide mixtures*. Anal. Chem., 2002. **74**(5): p. 992-1006.
40. Zucker, S., et al., *An Ion Mobility/Ion Trap/Photodissociation Instrument for Characterization of Ion Structure*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2011. **22**(9): p. 1477-1485.
41. Koeniger, S.L., et al., *An IMS–IMS Analogue of MS–MS*. Anal. Chem., 2006. **78**(12): p. 4161-4174.
42. Merenbloom, S.I., et al., *IMS–IMS and IMS–IMS–IMS/MS for Separating Peptide and Protein Fragment Ions*. Anal. Chem., 2006. **78**(8): p. 2802-2809.
43. Valentine, S.J., et al., *Developing IMS–IMS–MS for rapid characterization of abundant proteins in human plasma*. Int. J. Mass Spectrom., 2009. **283**(1–3): p. 149-160.
44. Kurulugama, R.T., et al., *Development of a high-throughput IMS–IMS–MS approach for analyzing mixtures of biomolecules*. J. Proteomics, 2008. **71**(3): p. 318-331.
45. Tang, K.Q., et al., *Two-dimensional gas-phase separations coupled to mass Spectrometry for analysis of complex mixtures*. Anal. Chem., 2005. **77**(19): p. 6381-6388.
46. Shvartsburg, A.A., et al., *Characterizing the structures and folding of free proteins using 2-D gas-phase separations: Observation of multiple unfolded conformers*. Anal. Chem., 2006. **78**(10): p. 3304-3315.

47. Pollard, M.J., et al., *Ion mobility spectrometer—field asymmetric ion mobility spectrometer-mass spectrometry*. Int. J. Ion Mobil. Spectrom., 2011. **14**(1): p. 15-22.
48. Menlyadiev, M.R. and G.A. Eiceman, *Tandem Differential Mobility Spectrometry in Purified Air for High-Speed Selective Vapor Detection*. Anal. Chem., 2014. **86**(5): p. 2395-2402.
49. Wales, D., *Energy Landscapes: Applications to Clusters, Biomolecules and Glasses*. 2003: Cambridge University Press.
50. Chirof, F., et al., *Statistical Analysis of Ion Mobility Spectrometry. I. Unbiased and Guided Replica-Exchange Molecular Dynamics*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2012. **23**(2): p. 386-396.
51. Korkut, A. and W.A. Hendrickson, *A force field for virtual atom molecular mechanics of proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2009. **106**(37): p. 15667-15672.
52. Politis, A., et al., *Integrating Ion Mobility Mass Spectrometry with Molecular Modelling to Determine the Architecture of Multiprotein Complexes*. PLoS ONE, 2010. **5**(8): p. e12080.
53. Stow, S.M., et al., *Distance Geometry Protocol to Generate Conformations of Natural Products to Structurally Interpret Ion Mobility-Mass Spectrometry Collision Cross Sections*. J. Phys. Chem. B, 2014. **118**(48): p. 13812-13820.
54. Fernandez-Lima, F.A., et al., *On the Structure Elucidation Using Ion Mobility Spectrometry and Molecular Dynamics*. J. Phys. Chem. A, 2009. **113**(29): p. 8221-8234.
55. von Helden, G., et al., *Carbon cluster cations with up to 84 atoms: structures, formation mechanism, and reactivity*. J. Phys. Chem., 1993. **97**(31): p. 8182-8192.
56. Shvartsburg, A.A., et al., *Modeling ionic mobilities by scattering on electronic density isosurfaces: Application to silicon cluster anions*. J. Chem. Phys., 2000. **112**(10): p. 4517-4526.
57. Shvartsburg, A.A. and M.F. Jarrold, *An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions*. Chem. Phys. Lett., 1996. **261**(1–2): p. 86-91.
58. Mesleh, M.F., et al., *Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential*. J. Phys. Chem., 1996. **100**(40): p. 16082-16086.
59. Terasaki, A., T. Majima, and T. Kondow, *Photon-trap spectroscopy of mass-selected ions in an ion trap: Optical absorption and magneto-optical effects*. J. Chem. Phys., 2007. **127**(23): p. 231101.
60. Egashira, K. and A. Terasaki, *Optical absorption spectrum of the chromium dimer cation: Measurements by photon-trap and photodissociation spectroscopy*. Chem. Phys. Lett., 2015. **635**: p. 13-15.
61. Khoury, J.T., S.E. Rodriguez-Cruz, and J.H. Parks, *Pulsed fluorescence measurements of trapped molecular ions with zero background detection*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2002. **13**(6): p. 696-708.
62. Dashtiev, M. and R. Zenobi, *Effect of Buffer Gas on the Fluorescence Yield of Trapped Gas-Phase Ions*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2006. **17**(6): p. 855-858.
63. Kordel, M., et al., *Laser-Induced Fluorescence of Rhodamine 6G Cations in the Gas Phase: A Lower Bound to the Lifetime of the First Triplet State*. J. Phys. Chem. A, 2010. **114**(17): p. 5509-5514.
64. Dunn, G., *Studies of Photodissociation of Molecular Ions. Atomic Collision Processes*. 1964, Joint Inst. for Lab. Astrophysics, Boulder, Colo.
65. Freiser, B.S. and J.L. Beauchamp, *Laser photodissociation of benzene radical cations. Evidence for a two photon process involving a long lived intermediate*. Chem. Phys. Lett., 1975. **35**(1): p. 35-40.
66. Jos, O., et al., *Gas-Phase Infrared Photodissociation Spectroscopy of Cationic Polyaromatic Hydrocarbons*. Astrophys. J., 2000. **542**(1): p. 404.
67. Lemaire, J., et al., *Gas Phase Infrared Spectroscopy of Selectively Prepared Ions*. Phys. Rev. Lett., 2002. **89**(27): p. 273002.
68. Faherty, K.P., et al., *Electronic spectroscopy and photodissociation dynamics of hydrated Co²⁺ clusters: Co₂+(H₂O)(n) (n=4-7)*. J. Phys. Chem. A, 2001. **105**(44): p. 10054-10059.

69. Brunet, C., et al., *Photo-induced electron detachment of protein polyanions in the VUV range*. J. Chem. Phys., 2013. **138**(6): p. 064301.
70. Brunet, C., et al., *Soret Band of the Gas-Phase Ferri-Cytochrome c*. J. Phys. Chem. Lett., 2012. **3**(6): p. 698-702.
71. Hardy, F.X., et al., *Absorptions in the Visible of Protonated Pyrene Collisionally Cooled to 15 K*. Astrophys. J. Lett., 2013. **778**(2): p. L30.
72. Rizzo, T.R., J.A. Stearns, and O.V. Boyarkin, *Spectroscopic studies of cold, gas-phase biomolecular ions*. Int. Rev. Phys. Chem., 2009. **28**(3): p. 481-515.
73. Fromherz, R., G. Ganteför, and A.A. Shvartsburg, *Isomer-Resolved Ion Spectroscopy*. Phys. Rev. Lett., 2002. **89**(8): p. 083001.
74. Vonderach, M., et al., *Combining Ion Mobility Spectrometry, Mass Spectrometry, and Photoelectron Spectroscopy in a High-Transmission Instrument*. Anal. Chem., 2011. **83**(3): p. 1108-1115.
75. Koyasu, K., et al., *Isomer-resolved dissociation of small carbon cluster cations, C7+–C10+*. Chem. Phys. Lett., 2012. **523**(0): p. 54-59.
76. Warnke, S., et al., *Photodissociation of Conformer-Selected Ubiquitin Ions Reveals Site-Specific Cis/Trans Isomerization of Proline Peptide Bonds*. J. Am. Chem. Soc., 2014. **136**(29): p. 10308-10314.
77. Papadopoulos, G., et al., *Spectroscopy of mobility-selected biomolecular ions*. Faraday Discuss., 2011. **150**: p. 243-255.
78. Bellina, B., et al., *UV photodissociation of trapped ions following ion mobility separation in a Q-ToF mass spectrometer*. Analyst, 2014. **139**(24): p. 6348-6351.
79. Hernandez, O., et al., *Probing Mobility-Selected Saccharide Isomers: Selective Ion–Molecule Reactions and Wavelength-Specific IR Activation*. J. Phys. Chem. A, 2015. **119**(23): p. 6057-6064.
80. Adamson, B.D., et al., *Changing the shape of molecular ions: photoisomerization action spectroscopy in the gas phase*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2013. **15**(24): p. 9540-9548.
81. Adamson, B.D., et al., *Photoisomerization Action Spectroscopy of the Carbocyanine Dye DTC+ in the Gas Phase*. J. Phys. Chem. A, 2013. **117**(50): p. 13319-13325.
82. Coughlan, N.J.A., et al., *Photoisomerization action spectrum of retinal protonated Schiff base in the gas phase*. J. Chem. Phys., 2014. **140**(16): p. -.
83. Coughlan, N.J.A., et al., *Ion Mobility Unlocks the Photofragmentation Mechanism of Retinal Protonated Schiff Base*. J. Phys. Chem. Lett., 2014. **5**(18): p. 3195-3199.
84. Coughlan, N.J.A., et al., *Retinal shows its true colours: photoisomerization action spectra of mobility-selected isomers of the retinal protonated Schiff base*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2015. **17**(35): p. 22623-22631.
85. Adamson, B.D., et al., *An ion mobility mass spectrometer for investigating photoisomerization and photodissociation of molecular ions*. Rev. Sci. Instrum., 2014. **85**(12): p. 123109.

Chapitre 2 :

Développement instrumental

I.	Introduction.....	46
II.	Description de l'appareil	47
A.	Description globale.....	47
B.	Régulation de la pression	49
C.	Transmission des ions entre les différentes zones de l'appareil.....	50
D.	La source électro spray.....	54
E.	Les tubes de mobilité	56
F.	Le Q-ToF, Maxis Impact	57
G.	Le couplage laser	58
H.	Pilotage de l'appareil.....	60
III.	Les modes d'acquisition	62
A.	Mode IMS-MS.....	62
B.	Mode tandem IMS-MS	63
C.	Modes laser-IMS.....	64
IV.	Caractéristiques techniques de l'appareil en fonctionnement	67
A.	Réglage des flux de gaz.....	67
A.1.	Tests de vide	67
A.2.	Calibrations des vannes de pompage.....	67
A.3.	Réglage du flux d'hélium	68
B.	Caractéristiques du Q-ToF	69
C.	Caractéristiques de la mobilité.....	70
D.	Largeur théorique des pics de mobilité, limitée par la diffusion	70
E.	Mesure de CCS absolue	75
F.	Tests de sélection d'un isomère	76
G.	Activation par collisions.....	78
V.	Conclusion	81

I. Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons l'appareil de mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse et à la spectroscopie laser, développé dans le laboratoire. Une description des différents éléments composant l'appareil sera donnée, ainsi que des modes d'acquisition possibles. Enfin, nous présenterons les principales caractéristiques de l'appareil au travers des premiers résultats expérimentaux obtenus.

Le principal défi dans le développement de l'instrument a été de coupler en un seul appareil trois techniques d'analyse fonctionnant dans des conditions différentes (pressions, temps caractéristiques, tensions...). Pour cela, le point critique est de mettre en place des interfaces entre chaque partie (source, mobilité ionique et analyseur par spectrométrie de masse) afin que chacune d'elle puisse être utilisée dans des conditions spécifiques qui n'influent pas sur les conditions d'utilisation des autres sections, tout en permettant la transmission des ions d'une partie à l'autre. En effet, la transmission des ions est, dans ce type d'expérience, un défi : elle doit être efficace mais ne doit pas entraîner un échauffement des ions. Ensuite, l'appareil a été conçu dès le début pour pouvoir être couplé à des lasers, ce qui explique entre autres l'agencement particulier de la source par rapport au reste de l'appareil. Enfin, le laser, le tube de mobilité et le spectromètre de masse ayant chacun des fréquences ou des gammes de fréquences de fonctionnement différentes, il a été nécessaire de synchroniser l'ensemble.

II. Description de l'appareil

A. Description globale

L'appareil couplant spectrométrie de masse, spectrométrie de mobilité ionique et spectroscopie laser a été développé à partir d'un spectromètre de masse commercial à analyseur quadripolaire et temps de vol (Q-ToF) Maxis Impact (Bruker). Ce dernier a été modifié afin de pouvoir insérer la zone de mobilité ionique entre la source électro spray et le reste de l'appareil. Le Q-ToF est utilisé comme détecteur après les mesures de mobilité ionique. Cet appareil a déjà fait l'objet d'une description dans une publication [1], et un schéma global en est donné en figure 1. L'usinage des pièces mécaniques utilisées pour la construction du tube de mobilité a été réalisé par la société SMGOP.

Les ions en solution sont injectés dans l'appareil et passent en phase gazeuse via la source électro-spray et une chambre de désolvatation. Ils traversent ensuite une chambre de mobilité ionique composée de deux tubes de dérive (notés DT1 et DT2 sur le schéma) sous pression constante d'hélium, puis une zone de transfert vers le spectromètre de masse. A l'intérieur du spectromètre de masse, les ions passent à travers deux entonnoirs à ion, puis un hexapôle, un quadupôle, une cellule de collision et la zone d'extraction orthogonale de l'analyseur à temps de vol (ToF).

Le transfert entre les différentes chambres et entre les deux tubes de mobilité se fait par des dispositifs de type entonnoir à ion (notés A, B et C sur le schéma), décrits dans le paragraphe II.C. Ces derniers assurent la transmission des ions entre des zones de différentes pressions. Pour des raisons d'encombrement entre le DT2 et le Q-ToF, il n'est pas possible de connecter directement l'entonnoir C à l'entrée du Q-ToF. Il a donc été nécessaire d'installer un guide d'ions (noté IG) pour assurer la transmission des ions dans cette région. Ce guide d'ion, de type SRIG (Stacked Ring Ion Guide) [2], est composé d'un empilement d'électrodes sur lequel sont appliquées des radiofréquences.

La chambre de désolvatation ainsi que la zone de transfert et les chambres contenant les deux tubes de mobilité et les entonnoirs à ion sont constituées de 9 segments en aluminium, isolés électriquement les uns des autres. Afin d'éviter des décharges électriques, chaque segment de la chambre est porté à un potentiel électrique voisin de celui appliqué sur les électrodes qu'il contient. Le dernier segment, connecté directement sur le spectromètre de masse, est relié à la masse.

Le couplage de l'appareil avec les lasers se fait grâce à deux fenêtres, l'une située au niveau de la source, l'autre située au niveau du ToF. Dans les deux cas, le laser peut être injecté parallèlement au faisceau d'ions.

La température des tubes de mobilité peut être régulée. En effet, la chambre entourant les deux tubes a été conçue de manière à pouvoir faire circuler un fluide dans l'épaisseur de la paroi. Nous utilisons une huile de silicone isolante (SIL 180, ThermoFisher Scientific) dont la température est ajustée dans un bain externe (WCR-P30, Witeg Labortechnik GmbH) entre -20 et 100°C.

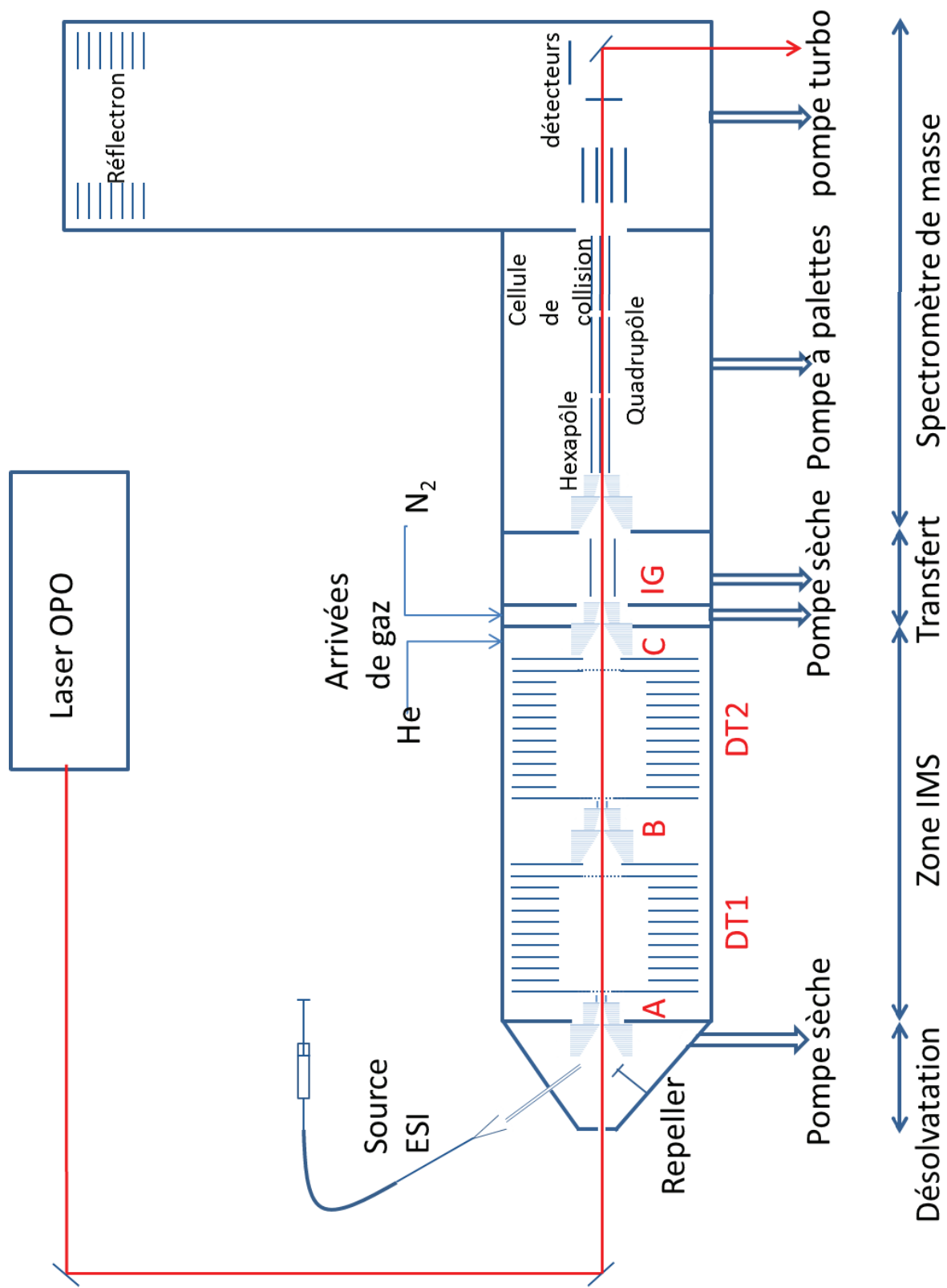


Figure 1. Schéma global de l'appareil.

B. Régulation de la pression

La régulation de la pression est un point critique du développement instrumental. En effet, les différents éléments de l'appareil ne fonctionnent pas aux mêmes pressions : la source est à pression atmosphérique, le tube de mobilité fonctionne entre 4 et 15 Torr, et le spectromètre de masse à une pression allant de 10^{-5} à 10^{-7} mbar. De plus, la composition des gaz et la pression sont deux paramètres clé des mesures de mobilité. Ils doivent être stables dans le tube de mobilité. C'est pourquoi des zones bien distinctes les unes des autres, notée I à IV sur la figure 2, ont été délimitées par trois ouvertures de séparation, notés $\phi_{I,II}$; $\phi_{II,III}$ et $\phi_{III,IV}$. Un système de pompage a été mis en place à chacune des interfaces entre la zone de mobilité ionique et le reste de l'appareil, comme indiqué sur la figure 2. Ces ouvertures de petits diamètres ($\phi_{I,II} = 1$ mm; $\phi_{II,III} = 0.7$ mm; $\phi_{III,IV} = 1$ mm) ainsi que le système de pompage permettent de maintenir le différentiel de pression entre les zones : les valeurs typiques sont $P_I = 3$ Torr; $P_{II} = 4$ Torr; $P_{III} = 1$ Torr; et $P_{IV} = 0.1$ Torr.

L'une des principales contraintes dans la régulation de la pression est que la chambre de mobilité ionique doit impérativement ne contenir que de l'hélium pur. Il faut en effet éviter toute contamination par diffusion d'air ou de solvant depuis la source vers le tube de mobilité. Pour cela, un contre-flux d'hélium est mis en place à l'interface entre la mobilité et la source, au niveau de l'entonnoir A. Ce contre-flux est contrôlé à la fois par le réglage des débits de gaz et par le réglage du pompage en source. L'optimisation de ces réglages est un prérequis à toute mesure de mobilité, et les détails de cette optimisation sont donnés dans la section IV. A. (Réglage des flux de gaz). D'autre part, pour effectuer des mesures de section efficace de collision, il est nécessaire que la pression du tube soit stable et connue de manière précise. Enfin, un flux d'azote a été installé sur la zone intermédiaire entre la mobilité et le Q-ToF, afin de découpler la régulation de la pression du tube de celle du Q-ToF. Ainsi, la pression dans cette zone n'est pas déterminée uniquement par le pompage et le flux d'hélium. Ce flux d'azote assure également une autre fonction : dans la gamme de pression de fonctionnement de l'appareil, des décharges électriques surviennent facilement entre les électrodes lorsque celles-ci sont dans l'hélium. Le flux d'azote permet de stabiliser sensiblement la région de transfert, en diminuant le risque de décharges électriques.

Pour répondre à ces contraintes, un régulateur de débit massique (SLA5850, Brooks), symbolisé en rouge sur le schéma, et contrôlé par logiciel, a été installé sur chaque arrivée de gaz, entre le tube de mobilité et une vanne d'arrêt (symbolisée en bleu), également contrôlée par logiciel.

Le pompage au niveau de la zone de mobilité est assuré par trois pompes sèches. Une pompe est placée en source (ACP 28, Adixen) et deux pompes sont installées au niveau de la zone de transfert entre le tube de mobilité et le Q-ToF (ACP 15, Adixen). Des vannes 1000 tours (symbolisées avec une flèche bleue) sont installées avant chaque pompe, et permettent de régler la vitesse de pompage.

Trois manomètres à capacitance (CMX2T21 et CMX2T31, Brooks), notés baratron sur le schéma, installés au niveau de la source, du tube de mobilité et de la zone de transfert, permettent un suivi

de la pression. Ces manomètres fonctionnent indépendamment du gaz présent dans l'enceinte du tube, et permettent de faire également des mesures à une température plus élevée. Des jauges Pirani (925 micropirani, MSK) sont installées sur chaque pompe, ainsi qu'au niveau de la zone de transfert, et assurent une fonction de contrôle de la pression, principalement pour vérifier le bon fonctionnement des pompes.

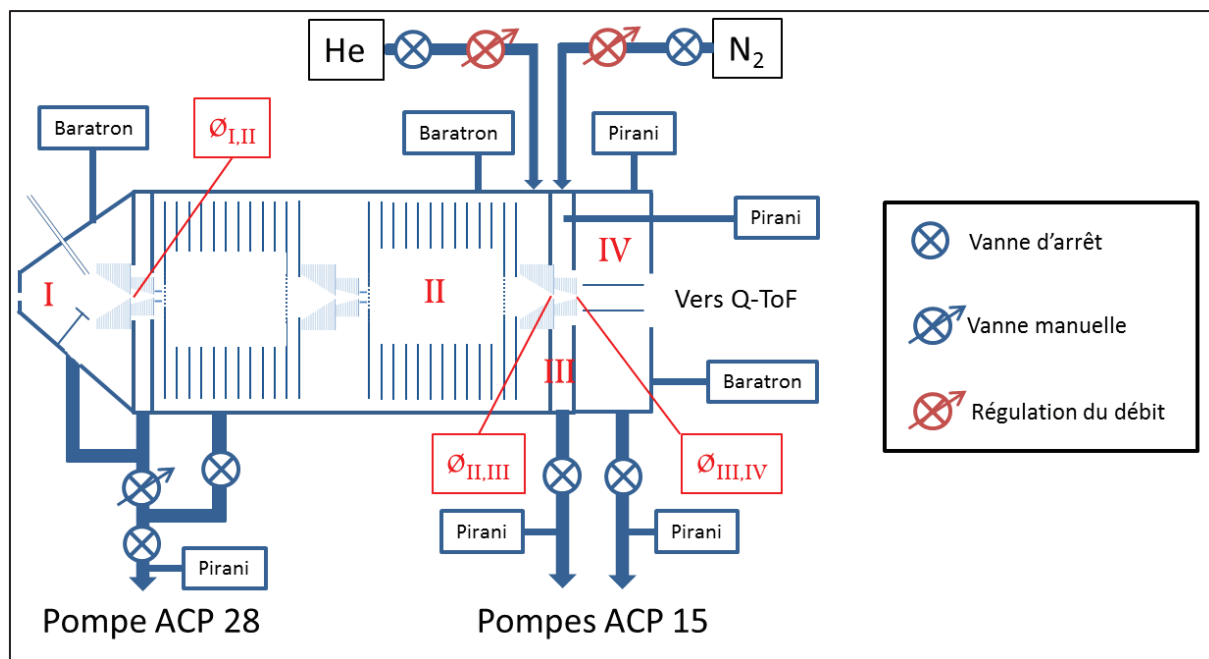


Figure 2. Schéma du système de régulation de la pression de la zone de mobilité ionique.

C. Transmission des ions entre les différentes zones de l'appareil

Le fait d'insérer une zone de mobilité ionique entre la source et l'analyseur du spectromètre de masse génère deux interfaces : la première interface est située entre la source et le premier tube de mobilité, et la deuxième interface est située entre le deuxième tube de mobilité et le Q-ToF. Chacune de ces interfaces a été conçue pour répondre à des exigences bien précises.

Interface Source/Zone de mobilité ionique

Comme expliqué précédemment, la source fonctionnant à pression atmosphérique et le tube de mobilité entre 4 et 15 Torr, une interface est nécessaire pour éviter une contamination du tube de mobilité par le solvant, l'air et les molécules neutres venant de la source. Cette interface se présente sous la forme d'une chambre intermédiaire, notée I sur la figure 2, dont le pompage est réglé pour évacuer l'air et les molécules neutres. La forme triangulaire de la chambre s'explique par le fait que la source est montée avec un angle de 50° par rapport à l'axe du tube, de manière à pouvoir injecter le laser dans l'axe du tube de mobilité (voir figure 3). Grâce à cet angle, l'air et les molécules neutres ne sont pas envoyés directement dans le tube de mobilité, mais à côté de l'entrée du tube, limitant

ainsi le risque de contamination. Afin de guider les ions vers l'entrée de la zone de mobilité ionique, une électrode en acier inoxydable a été installée du côté opposé à la source. Cette dernière, appelée Repeller sur le schéma global de l'instrument, est maintenue à un potentiel légèrement plus élevé que celui de l'extrémité du capillaire de la source, de manière à repousser les ions vers l'entrée du tube de mobilité, et ainsi maximiser leur transmission. L'entrée dans le tube de mobilité est contrôlée par un double entonnoir à ions, décrit ci-après, qui sert à focaliser le faisceau d'ions pour les transmettre vers le tube de mobilité malgré le contre-flux d'hélium, et à piéger les ions avant leur injection dans le premier tube de dérive.

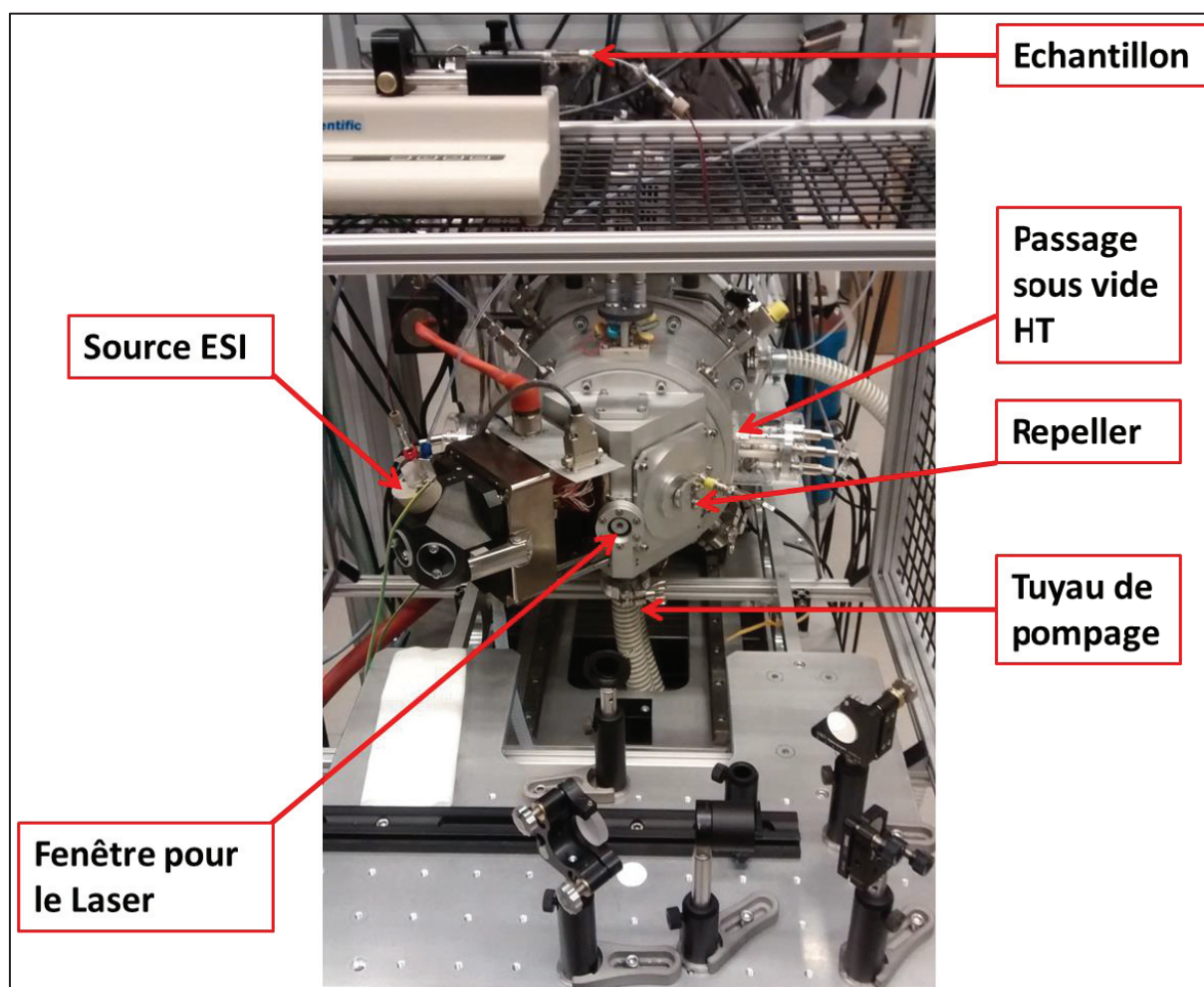


Figure 3. Photo de l'interface source/mobilité ionique

Interface Zone de mobilité ionique/Q-ToF

Cette interface se compose d'une chambre intermédiaire maintenue à une pression inférieure à celle du tube de mobilité, et dans laquelle on fait circuler un flux d'azote, comme décrit précédemment. Le transfert des ions de la zone de mobilité ionique vers le Q-ToF se fait par un double entonnoir à ion (Bruker Daltonics) identique aux deux premiers. Ce double entonnoir sert à

focaliser le faisceau d'ions à la sortie du deuxième tube de mobilité. Pour des raisons d'encombrement, ce double entonnoir à ion ne peut pas être mis directement en regard de l'entrée de l'analyseur du spectromètre de masse. Nous avons donc fixé à la sortie du double entonnoir un guide d'ion de type SRIG, fabriqué au laboratoire. Celui-ci se compose de 40 électrodes circulaires de 5 mm de diamètre interne et 40 mm de diamètre externe. Chaque électrode, en acier inoxydable a une épaisseur de 1 mm et est espacée de 2 mm de l'électrode adjacente. A l'instar du tube de mobilité, des tensions continues sont appliquées sur la première et la dernière électrode du guide d'ion, et les électrodes adjacentes sont reliées par des résistances de 500 k Ω . La différence de potentiel typiquement appliquée sur le guide est de 50 à 100 V. Des tensions alternatives (radiofréquences de 1.1 MHz) opposées sont appliquées sur les électrodes adjacentes, via des condensateurs de 10 pF. L'amplitude des tensions alternatives est maintenue faible (5 à 30 Vpp) afin d'éviter le piégeage des ions dans les guide, ou leur activation par collisions.

Les entonnoirs à ions

Pour la transmission des ions au niveau des interfaces de l'appareil, nous avons utilisé des doubles entonnoirs à ions. En effet, les multipôles utilisés en spectrométrie de masse permettent une bonne transmission des ions à de faibles pressions (~ 10 mTorr). A des pressions plus élevées, le mouvement des ions est dominé par les collisions avec le gaz. Les guides d'ions de type hexapôle ou quadrupôle sont alors moins efficaces, et on utilise des entonnoirs à ions, présentés par Smith *et al.* [3]. Par ailleurs, pour réaliser des mesures de mobilité ionique, il est nécessaire de connaître de manière précise le moment d'injection des ions dans le tube de mobilité. Comme les fréquences d'injection sont faibles (de 5 à 10 Hz), il est nécessaire de piéger les ions entre chaque cycle IMS pour augmenter la sensibilité de l'appareil. Dans l'assemblage de deux entonnoirs, le premier sert à focaliser le faisceau d'ions, et le deuxième permet de piéger les ions et de les envoyer dans le tube à des moments précis.

Les trois doubles entonnoirs à ions situés avant le premier tube de mobilité, entre les deux tubes et après le deuxième tube, ont été achetés chez Bruker Daltonics

Chacun de ces doubles entonnoirs est composé d'un empilement d'électrodes circulaires de 0.5 mm d'épaisseur, espacées de 0.5 mm, et de diamètres internes décroissants (voir figure 4). Des tensions continues sont appliquées sur la première électrode (notée Fun In sur la figure 4) et la dernière électrode (notée Fun Out). Les électrodes adjacentes sont reliées par des résistances de 100 k Ω . Des tensions opposées sont appliquées sur les électrodes adjacentes.

La première partie de l'assemblage mesure 6 cm de long, et les diamètres intérieurs des électrodes décroissent de 45 à 1 mm. La deuxième partie mesure 2.2 cm de long, et le diamètre intérieur des électrodes décroît de 7.2 à 4 mm. Entre ces deux parties, et après la deuxième partie se trouvent des électrodes (notées respectivement Base et Gate) sur lesquelles des tensions continues sont appliquées indépendamment des autres électrodes. Les diamètres internes de ces deux électrodes varient entre les différents assemblages de doubles entonnoirs. Nous avons ajouté une

électrode circulaire de 5 mm de long (notée Focus) après l'électrode Base, et avant l'entrée dans chaque tube de mobilité.

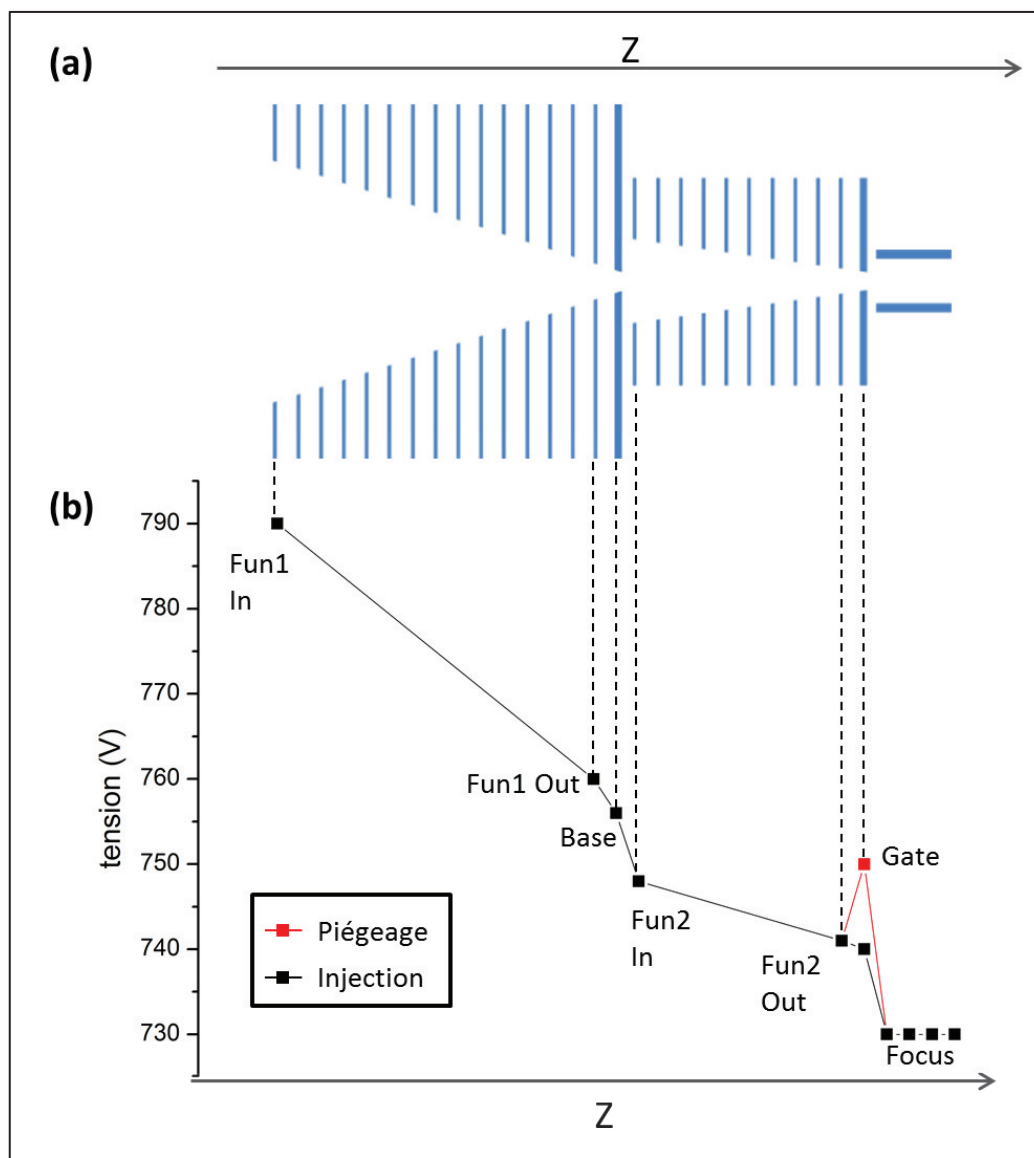


Figure 4. A) Schéma d'un double entonnoir à ions. B) Tensions appliquées lors des phases de piégeage et d'injection des ions.

Sept tensions continues différentes sont appliquées sur l'assemblage (une sur chaque électrode représentée sur la figure 4). Ces tensions continues, ainsi que les amplitudes et les fréquences des tensions alternatives sont contrôlées par logiciel. Les fréquences des tensions alternatives sont respectivement de 750 kHz et 1230 kHz pour les premières et deuxième parties de chaque assemblage d'entonnoir.

Pour piéger les ions, ou les injecter de manière précise dans le tube de mobilité, on peut faire varier la tension pulsée appliquée sur l'électrode Gate. En effet, lors de la phase de piégeage des ions, une tension haute est appliquée sur l'électrode Gate, bloquant ainsi le passage des ions (tension représentée en rouge sur la figure 4). Les radiofréquences appliquées sur les électrodes de

l'entonnoir permettent alors de piéger les ions dans des trajectoires oscillantes. A un temps donné, la tension appliquée sur l'électrode Gate est abaissée, permettant ainsi le passage des ions vers le tube de mobilité. L'ouverture du piège dure de 75 à 500 μ s. Dans ces conditions, il est possible de piéger les ions pendant plusieurs dizaines de millisecondes. L'efficacité du piégeage se mesure par la variation de l'intensité du signal total d'ions lorsque l'on passe d'un mode opératoire où les ions sont transmis en continu dans l'entonnoir, à un mode opératoire où ils sont piégés et envoyés par impulsions dans l'appareil. Lorsque le piégeage est efficace, le courant total d'ions ne diminue pas ou peu. On constate alors qu'à basse pression (4 Torr), moins d'un quart des ions sont perdus. A plus haute pression (15 Torr), le piégeage est moins efficace et, dépendamment du système étudié, les pertes d'ions peuvent être plus importantes.

D. La source électro spray

La source électro spray (ESI), qui permet la production d'ions en phase gazeuse, a été présentée par Masamichi Yamashita et John Fenn en 1984[4, 5]. Elle permet une ionisation douce des molécules à pression atmosphérique, en produisant des ions multichargés, et, par conséquent, est particulièrement adaptée à l'étude des peptides et protéines par spectrométrie de masse. En effet, si les macromolécules sont mises en solution dans un solvant non dénaturant, de pH et force ionique similaires aux conditions physiologiques, le fait d'utiliser une source d'ionisation douce permet de les faire passer en phase gazeuse sous leur forme native, c'est-à-dire avec une structure 3D similaire à celle dans les conditions biologiques. De plus, la source électro-spray peut être utilisée en mode positif (production de cations) ainsi qu'en mode négatif (production d'anions), le plus souvent par perte ou gain de proton. Le principe de la source ESI (Electro Spray Ionisation) est de produire, grâce à un capillaire, un spray contenant de fines gouttelettes de solvant et d'analyte. Ces gouttelettes vont ensuite s'évaporer et produire des ions en phase gazeuse qui seront analysés par spectrométrie de masse.

Une solution contenant du solvant et l'analyte est injectée dans le capillaire. Au niveau du ménisque situé l'extrémité du capillaire, les charges s'accumulent sous l'effet de la différence de potentiel entre le capillaire et les contre-électrodes situées à l'entrée du spectromètre de masse. En raison du double effet de l'accumulation de charge et de la différence de potentiel appliquée, le ménisque se déforme pour prendre la forme du cône de Taylor [6, 7], jusqu'à atteindre la limite de Rayleigh [8]. Il y a alors formation de fines gouttelettes sous la forme d'un spray. Avec l'évaporation du solvant, la taille des gouttelettes diminue, augmentant ainsi la densité de charges à la surface de la gouttelette. La limite de Rayleigh est alors atteinte une deuxième fois, provoquant une fission asymétrique de la gouttelette. La dernière étape du processus d'électro spray est la production d'ions en phase gazeuse. Deux modèles décrivent cette dernière étape : l'IEM (Modèle d'Evaporation Ionique) et le CRM (Modèle de Charge Résiduelle). Le mécanisme IEM a été développé par Iribarne et Thomson en 1976 [9]. Il prévoit que lorsque les gouttelettes on atteint une certaine taille (de 7 à 14 nm), il est possible d'émettre directement des ions en phase gazeuse à partir de la surface de la gouttelette. Dans le mécanisme CRM, proposé par Dole en 1968[10], l'analyte reste à l'intérieur de la

gouttelette. Le processus d'évaporation et de fission se poursuit donc jusqu'à ce que la gouttelette ne contienne plus qu'un seul analyte. Une fois tout le solvant évaporé, l'ion est produit en phase gazeuse.

L'appareil de double mobilité a été conçu pour être utilisé avec la source électro spray Apollo II (Bruker Daltonics). L'assemblage électrique de la source a été modifié afin de l'isoler de la première chambre du tube portée à 2kV. Les gouttelettes (représentées en rouge sur la figure 5) formées par le spray sont dirigées vers le spectromètre de masse par une différence de potentiel de 3 à 5 kV appliquée entre le capillaire métallique (voir figure 5), mis à la masse, et les contre-électrodes, ainsi que par le différentiel de pression entre la source ESI (à pression atmosphérique) et le spectromètre de masse (sous vide). Les gouttelettes traversent ensuite un capillaire en verre de 18 cm de long, doté d'un revêtement résistif, chauffé par un gaz desséchant (N_2) dont la température et le débit sont réglés via le logiciel Bruker. La désolvatation se poursuit donc à l'intérieur du capillaire en verre.

Les systèmes étudiés étant principalement des peptides et des protéines, la température de la source est maintenue à une température caractéristique du Q-ToF relativement basse (150°C) afin de ne pas dégrader les ions étudiés.

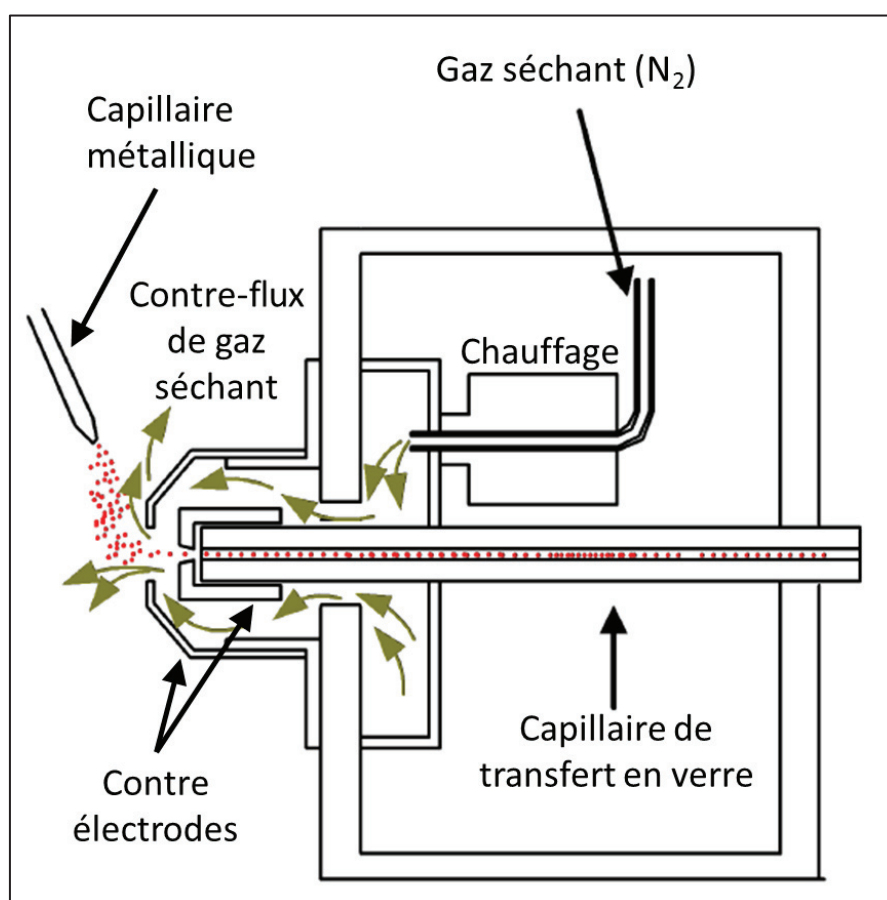


Figure 5. Schéma de la source électro spray Apollo II, Bruker Daltonics [11]

E. Les tubes de mobilité

Les deux tubes de mobilité (DT1 et DT2 sur la figure 6) sont identiques, et mesurent 79 cm chacun. Ils sont tous les deux composés de trois sections connectées électriquement les unes aux autres par des contacts à ressort en laiton (A), pour faciliter l'assemblage. Les électrodes qui composent chaque section sont des anneaux en acier inoxydable de 15 cm de diamètre externe et 10 cm de diamètre interne (B), et sont espacées par des cales en PEEK de 1 cm de long. Le tout est monté sur trois tiges en PEEK, au bout desquelles des écrous en PEEK (C) et des joints à viton (D) maintiennent les cales et les électrodes en place. Les joints en viton permettent de compenser la dilatation des matériaux lorsque la température à l'intérieur de la chambre varie. Chaque section est ensuite montée sur un rail, fixé sur la chambre.

Des tensions continues sont appliquées sur la première électrode et la dernière électrode du tube. Afin que le champ électrique soit constant, les électrodes adjacentes sont reliées par des résistances de 75 k Ω (E). Des grilles en nickel (70 lignes par pouce) permettant 80% de transmission sont placées sur la première et la dernière électrode, afin de maintenir un champ homogène sur une distance bien définie.

Après la dernière électrode du tube de mobilité, une électrode supplémentaire est montée sur la dernière section du tube. Cette électrode, de diamètres interne et externe similaires à ceux de la dernière électrode du tube, comporte également une grille en nickel. Une tension continue y est appliquée indépendamment des autres électrodes du tube. Cette électrode peut être utilisée pour la sélection des ions en fonction de leur temps de dérive. En effet, il est possible de bloquer le passage des ions en appliquant un potentiel élevé sur cette électrode, et d'abaisser ce potentiel à un moment donné et pendant une durée déterminée pour transmettre les ions sélectionnés selon leur temps de dérive vers la suite de l'appareil.

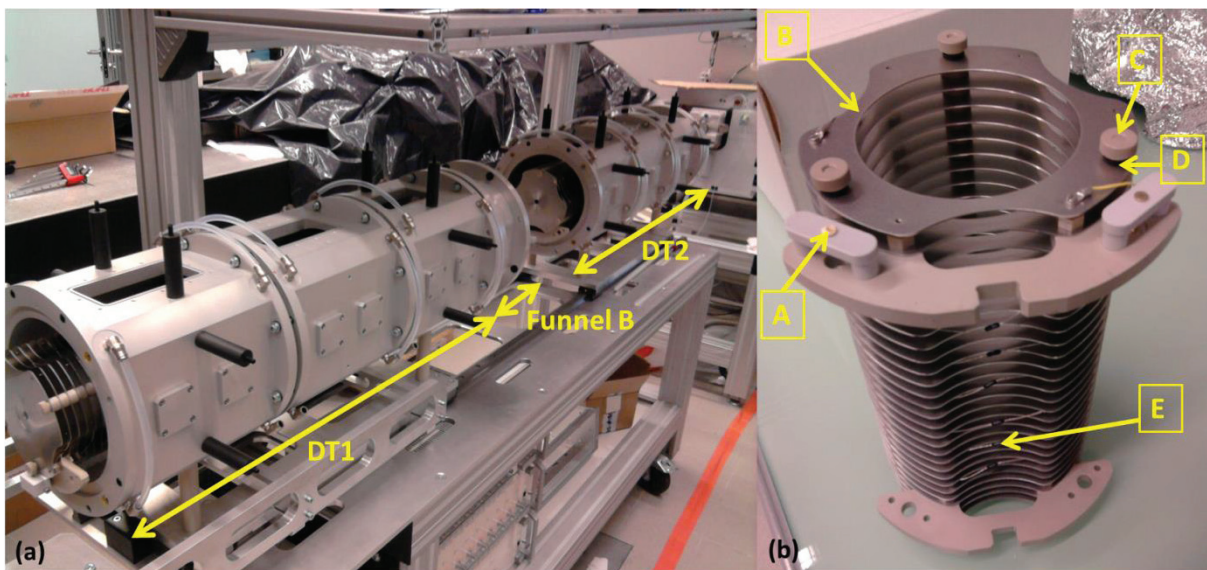


Figure 6. Photographies des tubes de mobilité. (a) Tubes installés dans la chambre. (b) Une des trois sections constituant un tube de mobilité

F. Le Q-ToF, Maxis Impact

A la suite de la séparation en mobilité, les ions sont transmis au spectromètre de masse. Ce dernier est un Maxis Impact (Bruker Daltonics) de type Q-ToF. Il se compose d'un double entonnoir à ions (non représenté sur la figure 7), identique à ceux utilisés au niveau des interfaces, servant à focaliser le faisceau d'ions, puis d'un hexapôle, transmettant les ions vers l'analyseur. L'analyseur comporte un quadrupôle, une cellule de collision et un temps de vol à accélération orthogonale, avec réflectron. L'agencement de ces différents composants est schématisé dans la figure 7). Les pointillés symbolisent les ions se déplaçant dans l'appareil.

Cet appareil offre la possibilité de faire de la spectrométrie de masse en tandem. Le quadrupôle permet alors de sélectionner les ions en fonction de leur rapport masse sur charge, et la cellule de collision permet d'effectuer une activation ou une dissociation induite par collisions (CID) avec de l'azote (N_2). Comme indiqué sur la figure 7, à la sortie de la cellule de collision, les ions passent dans une zone d'extraction dans laquelle ils sont accélérés vers le haut à une fréquence comprise entre 1 et 20 kHz. Le réflectron les renvoie vers le détecteur MCP.

L'appareil comporte deux détecteurs. Le premier est une dynode (notée détecteur SEM sur la figure 7) placée dans l'axe du faisceau d'ions, après la zone d'extraction. Elle permet de mesurer le courant total d'ions entre chaque accélération du ToF. Le deuxième détecteur est une galette de micro canaux (notée détecteur MCP sur la figure 7). Ce deuxième détecteur est placé après le ToF et détecte les ions en fonction de leur temps de vol, ce qui permet de mesurer le spectre de masse.

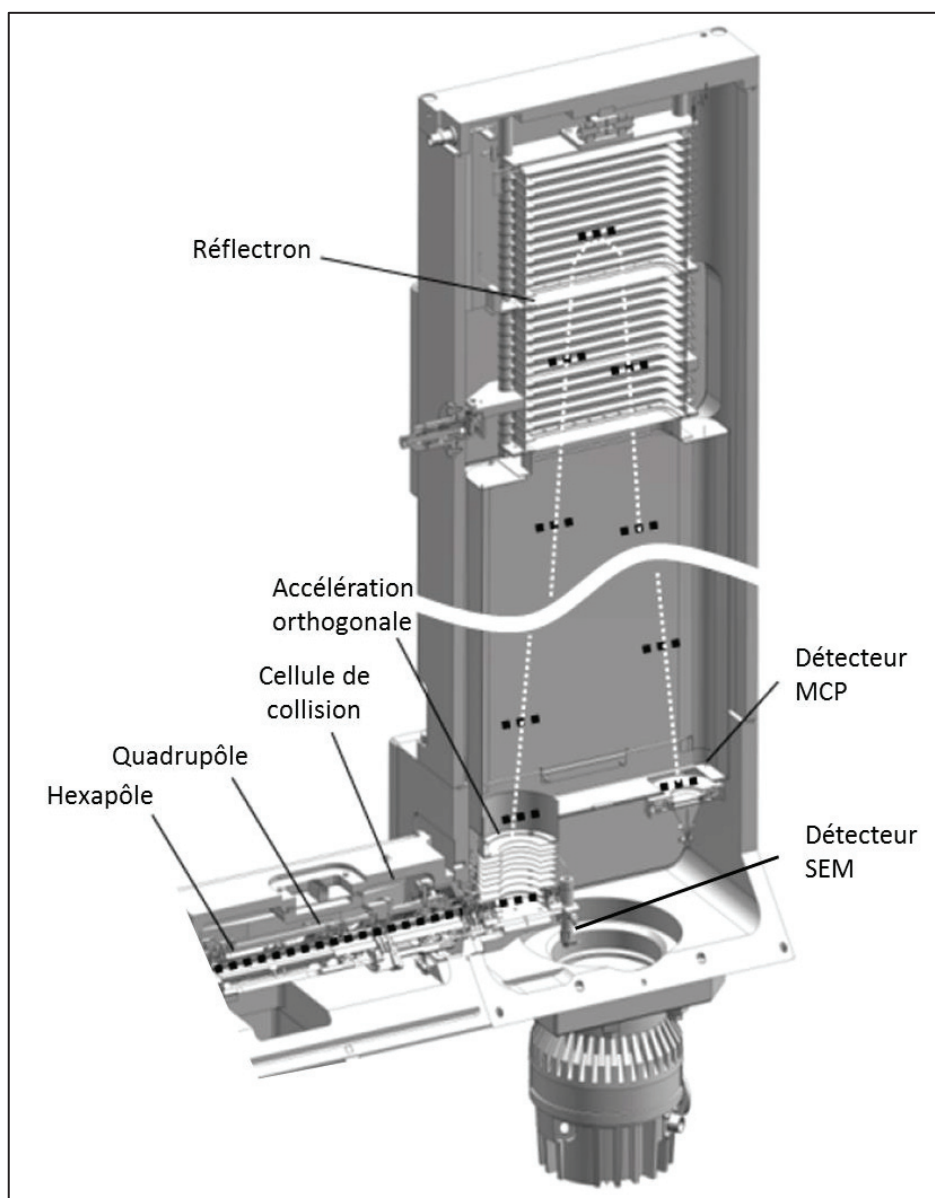


Figure 7. Schéma du Maxis Impact, Bruker Daltonics [11].

G. Le couplage laser

Le couplage de l'appareil avec des lasers a été prévu pour pouvoir irradier les ions soit dans le tube de mobilité, soit dans la cellule de collision du Q-ToF. Pour cela, deux fenêtres ont été installées, l'une entre la source et le repeller, et l'autre à l'arrière de l'appareil, au niveau du ToF (voir figure 8. Schéma optique). Ainsi, il est possible d'injecter le laser dans le tube de mobilité en suivant l'axe du tube via la fenêtre placée à côté de la source. Cela permet d'irradier les ions dans la zone de mobilité ionique, en particulier dans les entonnoirs à ions. Le laser ressort de l'appareil au niveau du ToF grâce à un miroir installé à 45° après le détecteur dans l'axe, ce qui permet d'ajuster l'alignement. Ce parcours optique est représenté en trait plein sur le schéma optique. Il est également possible d'envoyer le laser dans l'appareil par la fenêtre placée au niveau du ToF, pour irradier les ions dans le Q-ToF, au niveau de la cellule de collision. Pour cela, un miroir abaissable (M1) est installé sur le

chemin du laser. En abaissant ce miroir, le laser suit un autre parcours, représenté en pointillés : il est injecté dans l'appareil par le ToF et ressort via la fenêtre installée en source. La seule modification instrumentale apportée au spectromètre de masse a consisté à percer le détecteur SEM de manière à faire passer le laser au travers, et installer un miroir et une fenêtre pour faire sortir le laser de l'appareil.

Pour travailler avec des longueurs d'onde dans l'UV ou le visible, on utilise des fenêtres en quartz de 25.6 mm de diamètre au niveau de la source et au niveau du ToF.

Deux lasers ont été alternativement utilisés pour réaliser les expériences présentées ci-après : le premier est un laser à diode, continu (cw), d'une longueur d'onde de 488 nm et de 200 mW (Cobolt MLD™, 06-01 Series), symbolisé par un trait bleu sur le schéma optique. Le deuxième laser est un laser OPO/OPA picoseconde (PG403 Ekspla), représenté en vert sur le schéma. Ce dernier laser génère des impulsions d'une largeur de 25 ps, à une fréquence de 1 kHz, et d'une valeur de 350 μ J/pulse. La puissance du laser dépend de la longueur d'onde générée. Ces valeurs ont été reportées dans la figure 9 (Puissance en fonction de la longueur d'onde du laser). Ce laser OPO permet de faire varier la longueur d'onde entre 225 et 2300 nm. Afin de ne pas modifier l'alignement, un miroir abaissable (M2) est placé sur le chemin optique du laser OPO. Ce miroir est abaissé lorsque le laser OPO est utilisé, et est remonté pour utiliser le laser continu. La principale contrainte dans l'utilisation du laser OPO est la divergence du faisceau. Or le trajet optique est long et le laser doit entrer dans l'appareil via des ouvertures de quelques mm de diamètre. Pour focaliser le laser, des lentilles convergentes (L1 à L6) sont placées sur le trajet optique. Dans le but de pouvoir mener des expériences laser ON/laser OFF, un obturateur électro-mécanique, noté O sur le schéma, est installé sur le parcours du laser. Pour faire varier la puissance du laser et ainsi mesurer la dépendance du signal vis-à-vis de la puissance du laser, un filtre à densité neutre (noté F) peut être placé après l'obturateur.

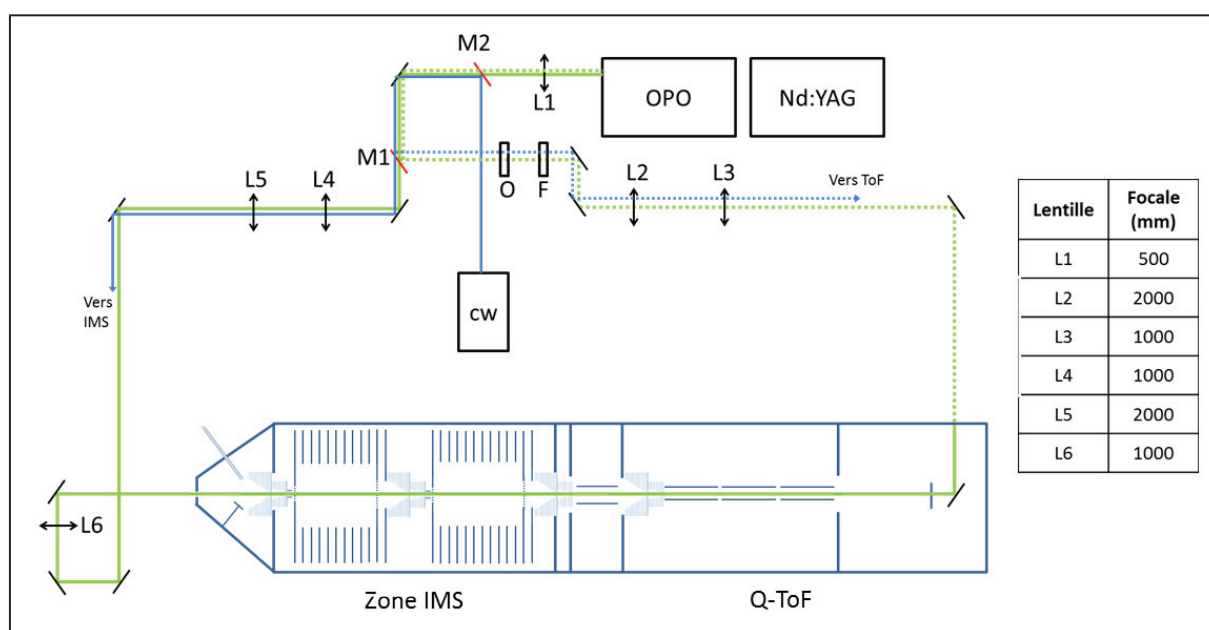


Figure 8. Schéma optique du montage.

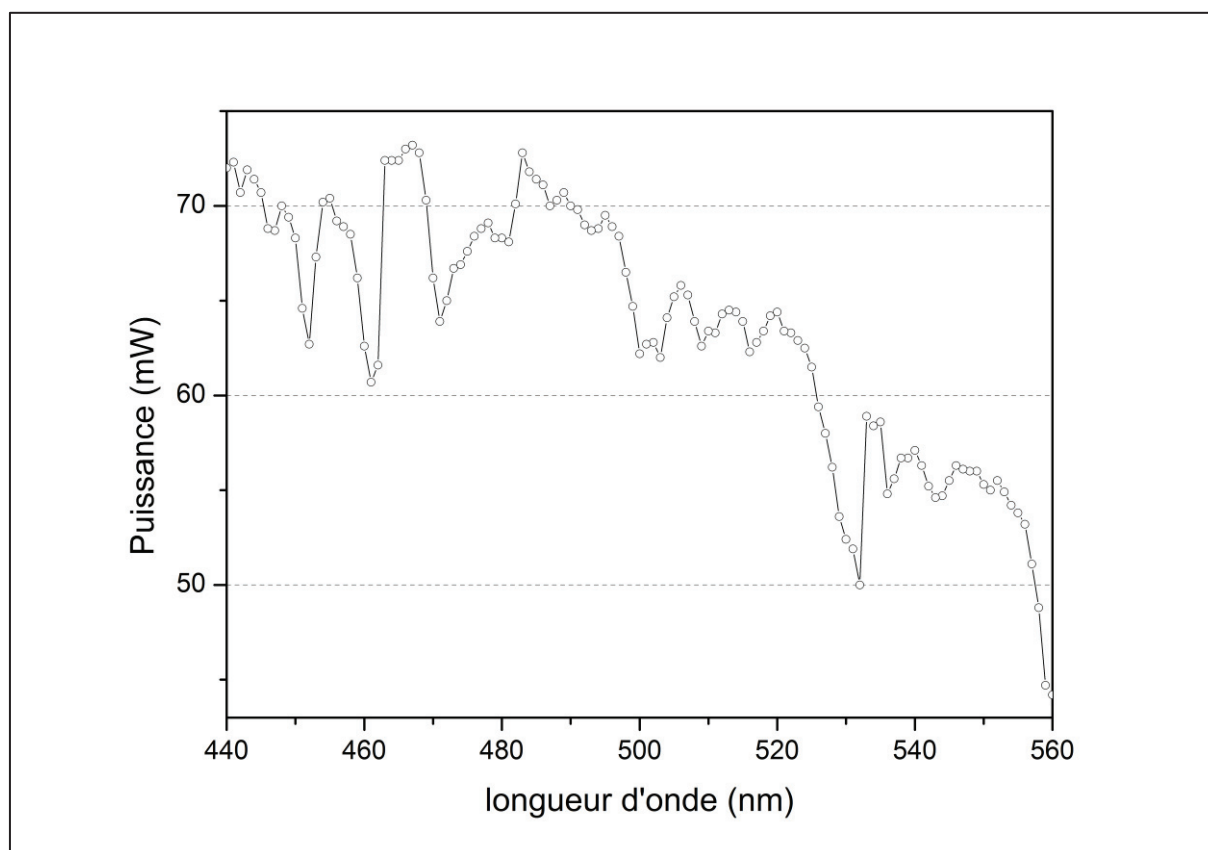


Figure 9. Puissance du laser mesurée en fonction de la longueur d'onde.

H. Pilotage de l'appareil

Les connexions électriques entre l'intérieur et l'extérieur de la chambre se font par un système de connecteurs métalliques montés sur des tiges fixées sur des passages sous vide en PEEK (polyétheréthercétone). Les tensions continues appliquées sur les entonnoirs à ions ainsi que les électrodes du tube de mobilité et les segments de la chambre sont générées par des modules haute tension de 1, 2 et 3 kV (Iseg), contrôlés via un réseau ethernet local. Les générateurs de radiofréquences utilisés pour les entonnoirs et le guide d'ion au niveau du transfert vers le spectromètre de masse ont été achetés chez Bruker Daltonics (QTIII Funnel Generator 1, QTIII Funnel Generator 2 pour les entonnoirs et QT ESIHEX pour le guide d'ions).

Le schéma du pilotage de l'appareil est donné en figure 10. L'ensemble des tensions et flux de gaz est contrôlé et piloté par un logiciel développé à l'aide de la bibliothèque graphique wxWidget (C++). Ce même logiciel est également utilisé pour contrôler la carte d'acquisition et les trois cartes entrées/sorties analogiques et numériques (NI PXI 6723, NI PXI 6225, NI PXI 6221, National Instrument) et une carte compteur/timer (NI PXI 6602, National Instrument). Ces cartes sont utilisées pour diriger les radiofréquences, les flux de gaz et les pulses de synchronisation (de type TTL). Pour le brassage entre les cartes PCI et l'appareil, nous avons installé une carte électronique spécialement construite au laboratoire.

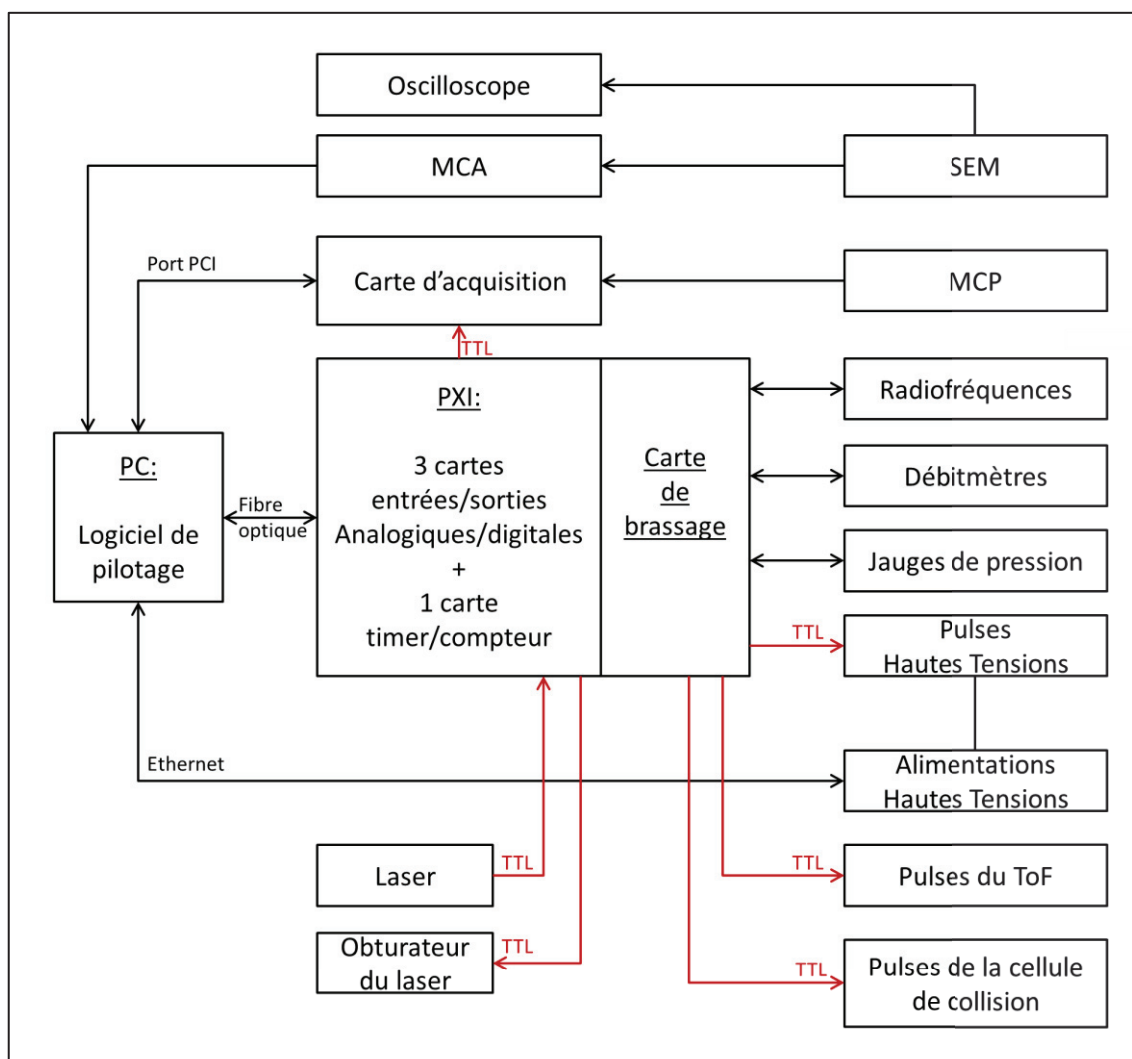


Figure 10. Schéma du pilotage de l'appareil.

Pour l'acquisition des données, le détecteur MCP est utilisé pour détecter les ions après le ToF. Il est relié de manière indépendante à deux cartes d'acquisition Agilent : la carte originale du Maxis Impact, et une carte additionnelle (U1084A high-speed digitizer, Agilent Technologies). Cette deuxième carte a été ajoutée afin de supporter les acquisitions IMS-MS, qui demandent plus de mémoire que les simples acquisitions de spectrométrie de masse. Il est ainsi possible d'enregistrer des cartes 2D comportant le spectre de masse selon un axe, et le profil de mobilité ionique selon de deuxième axe.

Enfin, un oscilloscope ou un analyseur MCA (Multi Channel Analyser) est relié au détecteur placé dans l'axe du faisceau d'ion, afin de suivre en continu le courant total d'ions au cours du cycle de mobilité, permettant ainsi l'optimisation des mesures avant l'enregistrement. Ce détecteur peut également être utilisé pour enregistrer le temps d'arrivée d'un ion précis. Pour cela, le détecteur est connecté à un préamplificateur et un MCA, et l'ion de rapport m/z souhaité est sélectionné avec le quadrupôle.

III. Les modes d'acquisition

L'appareil de mobilité ionique couplé à la spectroscopie laser offre diverses possibilités d'analyse. En effet, il est possible de l'utiliser pour une simple séparation des ions par mobilité ionique suivie d'une analyse par spectrométrie de masse en n'utilisant qu'un tube de mobilité (mode IMS-MS). Les deux tubes de mobilités peuvent également être utilisés pour des séparations en mobilité successives (mode tandem IMS-MS). Par ailleurs, l'effet de l'irradiation laser (mode laser-IMS) peut être analysé à la fois en IMS (photo-isomérisation) ou en masse (photo-fragmentation). Le mode tandem-IMS offre en effet la possibilité de faire de la spectroscopie d'action sur des espèces sélectionnées par IMS. Les différents modes d'opération sont décrits ci-après.

A. Mode IMS-MS

Dans le mode IMS-MS, on réalise une simple séparation en mobilité, suivie d'une détection par spectrométrie de masse. Il est possible de réaliser la séparation en mobilité en n'utilisant que le deuxième tube de mobilité. Pour cela, on n'applique aucun pulse sur le premier double entonnoir, de manière à laisser passer les ions en continu aussi bien dans l'entonnoir que dans le premier tube de mobilité. Les ions sont ensuite piégés dans le deuxième double entonnoir, grâce à l'application d'un pulse sur l'électrode Gate (notée Gate B sur la figure 11), définissant la durée de piégeage ainsi que le moment d'injection des ions dans le deuxième tube de mobilité. Dans cette configuration, la séparation en mobilité se fait donc sur 79 cm de tube de dérive, puis les ions sont analysés par spectrométrie de masse.

Le schéma des temps réglant une séquence d'acquisition IMS-MS est donné en figure 11 (Schéma des synchronisations pour le mode IMS-MS). Le pulse appliqué sur l'électrode Gate du deuxième double entonnoir définit le moment d'injection des ions dans le tube de mobilité, ainsi que le $t=0$ de la mesure du temps d'arrivée (AT).

La taille des données enregistrées étant importante, l'acquisition ne se fait pas sur toute la durée du cycle IMS, mais uniquement sur une gamme de temps choisie pour inclure le temps d'arrivée des différents ions analysés. Pour définir cette gamme de temps, on applique un délai (τ_{TOF}) entre l'injection des ions dans le tube de mobilité et le début de l'enregistrement des spectres de masse. Après ce délai, le nombre de pulses du ToF (n_{TOF}) définit la durée de l'enregistrement (δ_{TOF}) et le nombre de points sur le profil de mobilité. La gamme de masse et la fréquence d'enregistrement du ToF sont réglées par les paramètres de la carte d'acquisition.

Le temps d'arrivée d'un ion apparaissant sur le spectre de masse indexé i_{TOF} est défini par la formule suivante :

$$AT = \tau_{TOF} + i_{TOF} * \frac{\delta_{TOF}}{n_{TOF}} \quad \text{Eq. III 1}$$

A chaque cycle IMS, la même séquence d'acquisition est répétée. Les données sont enregistrées sur la carte d'acquisition Agilent additionnelle sous la forme d'une matrice. L'une des dimensions donne la distribution du temps d'arrivée (profil de mobilité). Le nombre de point est déterminé par n_{TOF} et l'espacement des points par $\frac{\delta_{TOF}}{n_{TOF}}$, soit l'inverse de la fréquence du ToF. L'autre dimension correspond au temps de vol des ions, et permet de déterminer leur rapport m/z .

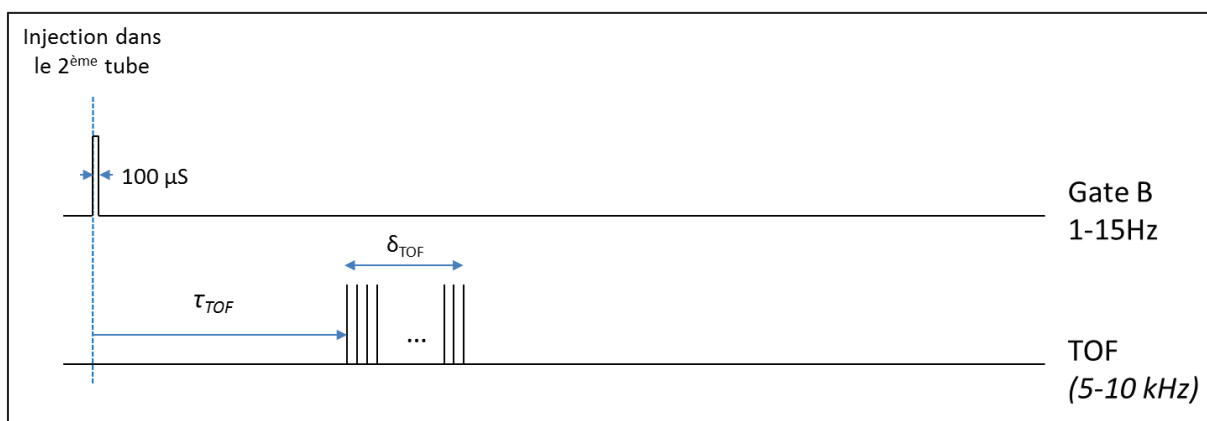


Figure 11. Schéma des synchronisations pour le mode IMS-MS

B. Mode tandem IMS-MS

Le montage comportant deux tubes de mobilité successifs, il est possible d'utiliser l'appareil en mode tandem IMS. En effet, par analogie avec la spectrométrie de masse en tandem, dans laquelle un ion de rapport m/z donné peut être sélectionné dans un premier temps, puis activé pour produire des fragments qui seront analysés dans un deuxième temps, il est possible en mobilité ionique en tandem de sélectionner un ion en fonction de son temps de dérive, de l'activer, puis de séparer les ions produits par l'activation dans le deuxième tube de mobilité.

Pour cela, les ions sont piégés dans la deuxième section du premier double entonnoir, puis injectés dans le premier tube de mobilité à un temps $t=0$ grâce à un pulse appliqué sur l'électrode Gate A (voir figure 12). Les différentes espèces sont séparées en mobilité. Une espèce donnée est sélectionnée en fonction de son temps de dérive, grâce à l'électrode de sélection située entre le tube de mobilité et le deuxième double entonnoir. Pour cela, on applique un délai (t_{sel}) entre l'injection dans le tube de mobilité et l'ouverture de la porte ionique. Seules la ou les espèces dont le temps de dérive correspond à la fenêtre d'ouverture de la porte ionique (Δt_{sel}) sont transmises dans le deuxième double entonnoir, où elles sont piégées. Le temps de piégeage peut être réglé en modifiant le délai appliqué entre la sélection et l'injection dans le deuxième tube de mobilité. En effet, ce délai correspond à la fois au temps de transfert des ions dans le double entonnoir et au temps de piégeage. Dans le deuxième double entonnoir, pendant le temps de piégeage, les ions peuvent être activés, soit par collisions avec l'hélium, soit par activation laser. Ces deux modes d'activation sont décrits dans la suite du manuscrit. Les espèces activées sont ensuite injectées dans

le deuxième tube de mobilité, où elles sont séparées avant d'être analysées par spectrométrie de masse. Les données sont traitées de manière identique à ce qui a été décrit pour le mode IMS-MS. La synchronisation des différents pulses appliqués est schématisée dans la figure 12.

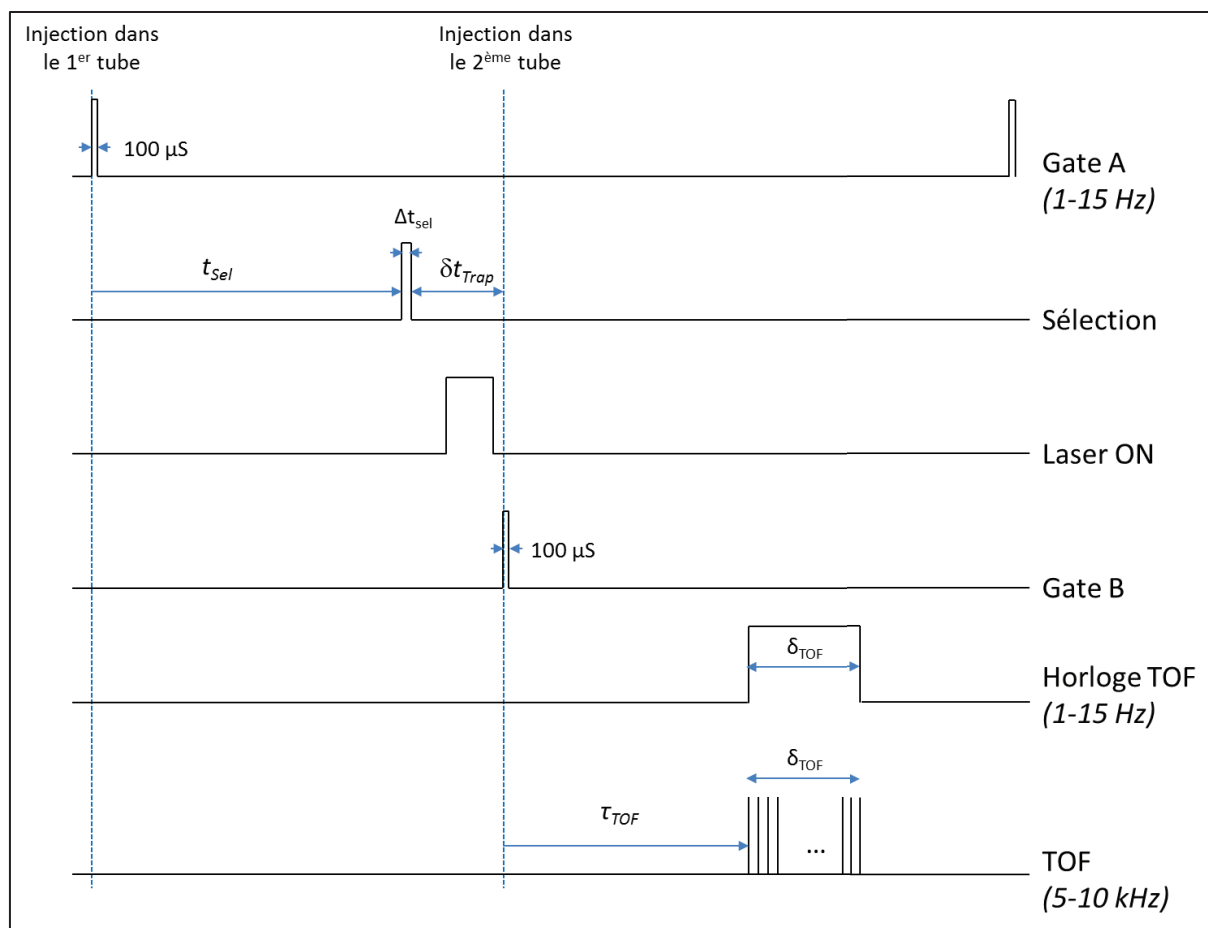


Figure 12. Schéma des synchronisations pour le mode tandem IMS-MS

C. Modes laser-IMS

L'appareil peut être couplé à un laser de deux manières différentes. Il est possible d'irradier les ions dans le tube de mobilité (mode IMS-Laser-IMS) ou bien d'irradier les ions après leur analyse par mobilité, dans le spectromètre de masse (mode IMS-Laser-MS). Ceci correspond à deux modes de spectroscopie d'action :

Mode IMS-Laser-IMS : irradiation dans le tube de mobilité.

Dans le mode IMS-Laser-IMS, le laser est injecté dans le tube de mobilité via la fenêtre placée à côté de la source électro spray, pendant une durée déterminée, correspondant au temps de piégeage des ions dans le deuxième double entonnoir. Les pulses électriques appliqués sur les différentes électrodes de l'appareil sont synchronisés de la même manière qu'en mode tandem IMS-

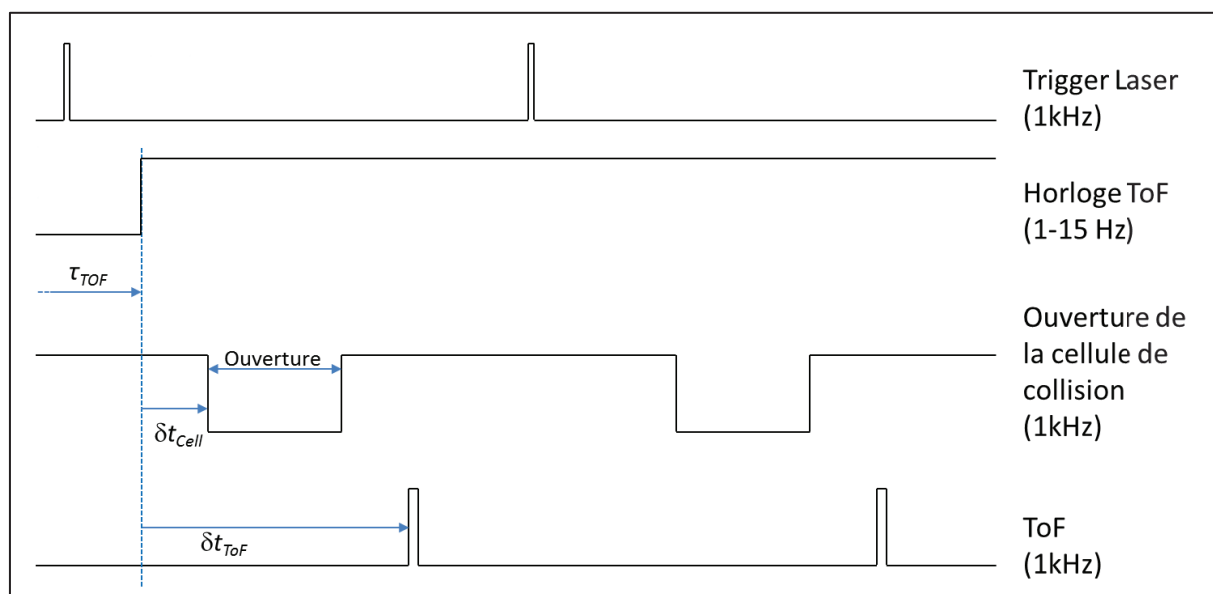
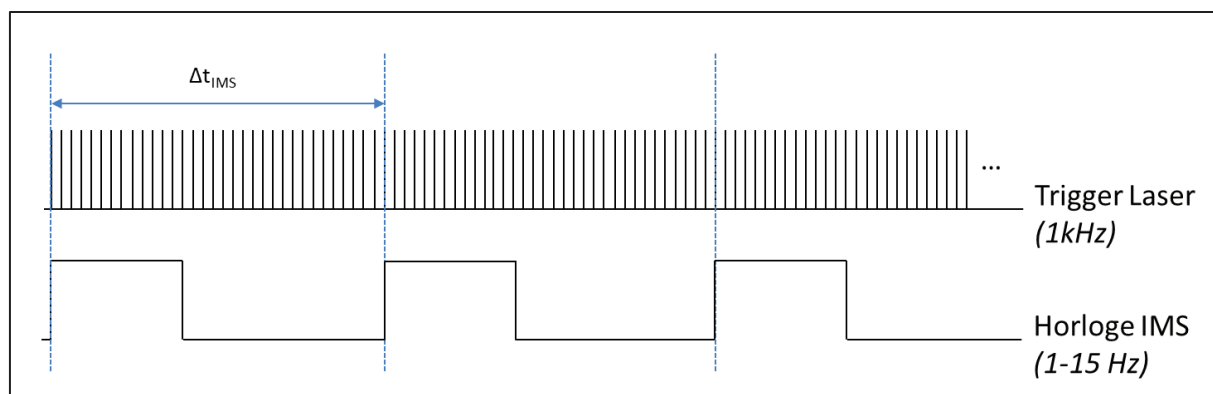
MS (voir figure 12. Schéma des synchronisations pour le mode tandem IMS-MS). La seule synchronisation supplémentaire consiste à placer un obturateur sur le trajet optique du laser, de manière à envoyer le laser dans le montage au moment où les ions sont piégés entre les deux tubes de mobilité. Dans cette configuration, on peut irradier les ions soit avec un laser continu (cw), soit avec un laser pulsé (OPO picoseconde) pendant une durée supérieure ou égale à 10 ms.

Mode IMS-Laser-MS : irradiation dans la cellule de collision.

Dans le mode IMS -Laser-MS, le laser est injecté par l'arrière de l'appareil, de manière à irradier les ions dans la cellule de collision. Les ions sont analysés par mobilité ionique en mode IMS-MS ou tandem IMS comme décrit précédemment, puis ils sont transmis dans le spectromètre de masse, puis sont piégés dans la cellule de collision. Dans ce mode d'opération, il est possible de sélectionner les ions à la fois selon leur temps de dérive (sélection IMS) et selon leur masse (sélection avec le quadrupôle). L'irradiation se fait lors du piégeage des ions, avant leur transmission vers le ToF. Dans ce mode d'opération, il est nécessaire d'utiliser un laser pulsé, synchronisé avec le ToF (un pulse laser par cycle MS). Or le laser utilisé est pulsé à 1 kHz, et ne peut recevoir de trigger externe. Le couplage s'effectue donc en synchronisant le montage de mobilité ionique et spectrométrie de masse sur le trigger du laser, utilisé comme trigger maître (voir figure 13. Schéma de la synchronisation de l'appareil sur le trigger du laser).

Le trigger du laser, de fréquence 1 kHz, est utilisé comme trigger externe sur l'appareil, et donne le t_0 de l'horloge IMS, dont la fréquence peut être réglée entre 1 et 15 Hz. Après le déclenchement de l'horloge IMS, le cycle IMS se poursuit sur une durée choisie. A la fin du cycle, l'horloge attend le prochain trig du laser (nouveau t_0) pour relancer un cycle d'acquisition. La durée totale d'un cycle d'acquisition est notée Δt_{IMS} . Les pulses appliqués sur les différentes électrodes du montage de mobilité sont synchronisés sur l'horloge IMS comme décrit précédemment : on définit un délai avant l'injection des ions dans le premier et dans le deuxième tube (respectivement τ_{GateA} et τ_{GateB}) ainsi qu'un délai entre l'injection des ions dans le deuxième tube de mobilité et le trigger de l'horloge TOF, qui définit le moment de début des n cycles TOF. Un obturateur est placé sur le trajet optique du laser, de manière à n'irradier les ions que lors de l'enregistrement des cycles TOF, c'est-à-dire au moment du cycle IMS où le paquet d'ion entre dans le spectromètre de masse.

La cellule de collision et le ToF sont contrôlés par des triggers externes synchronisés sur l'horloge TOF, contrôlée par le logiciel IMS (voir figure 14. Schéma de la synchronisation de la cellule de collision et du temps de vol avec le laser). Ces triggers externes ont une fréquence de 1 kHz, de manière à être en phase avec le laser. La cellule de collision et le ToF sont synchronisés l'un par rapport à l'autre en définissant des délais δt_{cell} et δt_{TOF} entre l'horloge IMS et respectivement l'ouverture de la cellule de collision et le pulse du ToF. Il est également possible de régler le moment d'irradiation des ions, soit avant l'ouverture de la cellule de collision, au moment où les ions sont piégés, soit juste après l'ouverture de la cellule de collision, au moment où les ions sont transmis vers le ToF. Ce réglage s'effectue en définissant finement le délai τ_{TOF} , qui décale simultanément la cellule de collision et le pulse du ToF par rapport au pulse du laser.



IV. Caractéristiques techniques de l'appareil en fonctionnement

A. Réglage des flux de gaz

A.1. Tests de vide

Une fois le tube de mobilité relié au Q-ToF, les valeurs de vide limites sont relevées, pour la source fermée et pour la source ouverte.

Sonde	Positionnement	Pression (Torr) Source fermée	Pression (Torr) Source ouverte
Capacitance (100Torr)	Tube	0.05	2.55
Capacitance (1000Torr)	Tube	0.1	0.1
Capacitance (100Torr)	Source	0.13	2.87
Pirani	Refoulement zone intermédiaire	0.078	0.182
Pirani	Refoulement source	0.140	2.603
Pirani	Refoulement transfert	0.088	0.170
Pirani	Zone intermédiaire	0.080	0.206
Pirani	Transfert	0.086	0.190

Tableau 1. Valeurs de vide limites.

A.2. Calibration des vannes de pompage

La première étape dans le montage du tube de mobilité, avant de régler les flux de gaz, est de calibrer les flux de pompage, et de déterminer le flux d'air entrant par la source, via le capillaire de transfert.

Pour cela, on opère avec le capillaire de transfert de la source bouché. On fait varier l'ouverture de la vanne source, puis on ajuste le débit de gaz de manière à maintenir une pression constante dans la chambre, d'une valeur de 15.1 Torr. L'expérience est réalisée une fois en utilisant de l'hélium, et une fois en utilisant de l'azote. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 15 exprimant l'ouverture de la vanne (unité arbitraire) en fonction du débit de gaz. On obtient deux courbes logarithmiques de calibration des vannes.

On ouvre ensuite l'arrivée d'air par le capillaire de transfert, avec un débit d'azote et d'hélium nul, et règle l'ouverture de la vanne source de manière à compenser l'arrivée d'air. Il est possible d'extrapoler la valeur du débit d'air par la source à partir des courbes tracées précédemment.

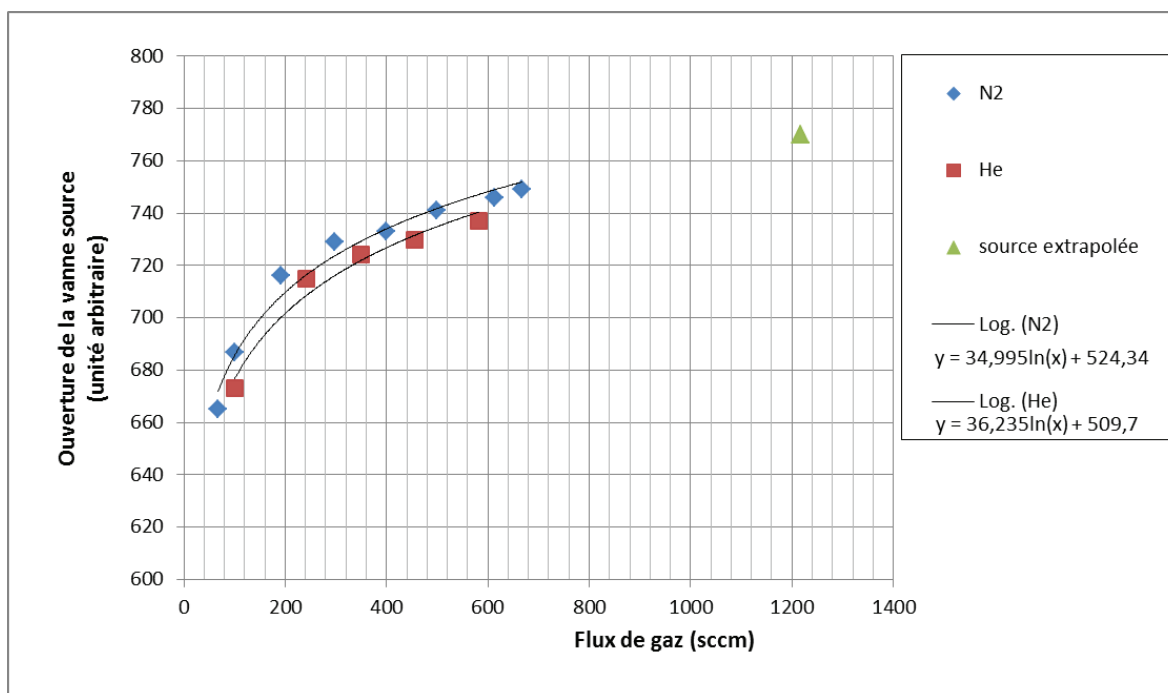


Figure 15. Courbes de calibration des vannes et détermination du flux d'air entrant par la source. Les barres d'erreur sont inférieures à la taille des symboles utilisés.

La valeur extrapolée du flux d'air entrant par le capillaire de transfert de la source est donc de 1218 sccm.

Lors des mesures de mobilité ionique, il est primordial que le tube ne contienne que de l'hélium. Le réglage du flux d'hélium doit donc être fait de manière à compenser le flux d'air par la source : le flux d'air qui arrive dans la zone intermédiaire entre la source et le premier entonnoir à ions doit être directement évacué par le système de pompage. Le contre-flux d'hélium au niveau de l'entonnoir doit être suffisant pour compenser la diffusion de l'air dans l'hélium.

A.3. Réglage du flux d'hélium

Les sections efficaces de collision étant plus grandes dans l'azote que dans l'hélium, il est possible de vérifier que le tube de mobilité ionique contient uniquement de l'hélium en mesurant les CCS. En effet, si le débit d'hélium est trop faible pour compenser la diffusion de l'air vers le tube de mobilité au niveau du premier double entonnoir à ions, de l'azote va entrer dans la chambre. Les CCS seront alors mesurées dans un mélange d'azote et d'hélium, et seront dépendantes de la pression d'hélium dans le tube, car en augmentant la pression d'hélium, on chasse l'azote du tube : $CCS_{HE} \leq CCS_{mesurée} \leq CCS_{N2}$.

Pour une ouverture de la vanne source donnée, on mesure la section efficace de collision d'un même système (éosine) à différentes pressions dans le tube de mobilité. La pression est modifiée en faisant varier le débit d'hélium injecté dans le tube. En augmentant le débit d'hélium, on augmente la pression du tube ainsi que le contre-flux au niveau du premier entonnoir. Les résultats sont reportés dans la figure 16.

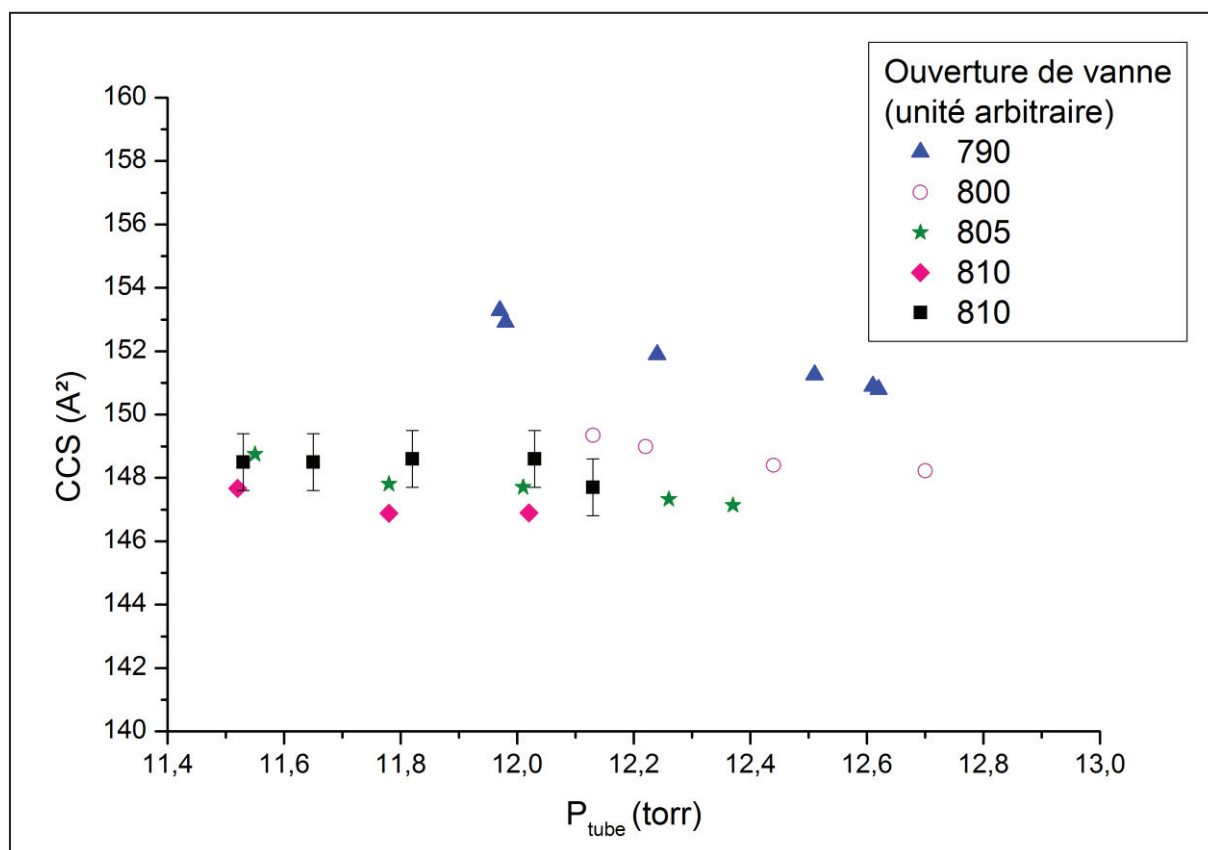


Figure 16. Mesures de CCS de l'éosine en fonction de la pression du tube, pour différentes ouvertures de vanne source.

On observe que, dans ces conditions, pour des ouvertures de vanne source inférieures à 805, les CCS diminuent lorsque la pression d'hélium augmente dans le tube entre 11,5 et 12,5 Torr, ce qui indique un changement de composition des gaz en équilibre dans le tube. Pour des ouvertures de vanne source supérieures à 805, la valeur des CCS reste constante. Les CCS mesurées sont indépendantes de la pression d'hélium, ce qui signifie que la chambre ne contient que de l'hélium. Ces valeurs d'ouverture de vanne correspondent à un différentiel de pression minimum de 0,4 Torr entre le tube et la zone intermédiaire entre la source et le premier entonnoir à ions. Ce différentiel de pression devra être systématiquement maintenu lors des mesures de mobilité afin de garantir que le tube de mobilité est équilibré dans l'hélium, quelle que soit la pression à laquelle on opère.

B. Caractéristiques du Q-ToF

La résolution maximale du Q-ToF est de 50 000, notamment grâce au piégeage des ions dans la cellule de collision, ce qui permet d'envoyer un paquet d'ions plus compact vers le ToF. Cependant, pour mesurer des profils de mobilité ionique, les paramètres de la cellule de collision sont réglés de manière à ne pas piéger les ions. En effet, tout piégeage entre la séparation par mobilité ionique et la détection tend à réduire la résolution des pics de mobilité. Les réglages de l'ensemble des paramètres de l'appareil sont faits de manière à avoir la plus grande résolution en mobilité possible,

ce qui diminue la résolution du ToF. La valeur typique de la résolution du ToF dans les conditions d'utilisation de l'appareil en couplage avec la mobilité ionique est alors de 20 000.

C. Caractéristiques de la mobilité

Fréquence de fonctionnement.

La fréquence de fonctionnement de l'appareil de mobilité ionique est ajustée selon le temps de dérive des systèmes étudiés. Plus un système a un temps de dérive court, plus il est possible d'augmenter la fréquence du cycle IMS. Cependant, le temps de transfert des données enregistrées doit être compris dans la durée d'un cycle IMS. La taille des données est donc une limite de la fréquence IMS. Typiquement, les fréquences sont comprises entre 5 et 10 Hz.

Résolution.

Lorsqu'un paquet d'ions dérive à travers le tube de mobilité, la diffusion des ions dans le gaz élargit ce paquet d'ions, et donc, diminue la résolution. Cet élargissement est la limite théorique de la résolution. D'autre part, les ions sont susceptibles d'être piégés par les radiofréquences de différents éléments du montage, situés après la séparation en mobilité (entonnoirs, hexapôles, quadropôles et cellule de collision). Le piégeage des ions après la séparation tend à élargir le pic de mobilité vers les temps de dérive longs. Pour éviter cela, les amplitudes des radiofréquences des différents éléments du transfert et du spectromètre de masse sont gardées aussi faibles que possible. La résolution maximale obtenue lors des expériences menées sur l'appareil pour des ions de 583 Da et mono-chargés est de 48. Il est nécessaire de vérifier que cette résolution correspond à la limite théorique de largeur des pics, définie par la loi de Fick sur la diffusion.

D. Largeur théorique des pics de mobilité, limitée par la diffusion

Dans le chapitre précédent (Mobilité Ionique), nous avons établi la formule donnant la distribution temporelle des ions à la fin du tube de mobilité, lorsque l'élargissement du paquet d'ions n'est dû qu'à la diffusion donnée par la loi de Fick. Cette distribution des ions selon une gaussienne est vraie si tous les ions sont envoyés dans le tube au même instant $t=0$. Or, dans l'appareil de mobilité, l'injection des ions se fait selon une fenêtre rectangulaire de durée τ . Les ions sont donc envoyés dans le tube à un temps θ , avec $0 \leq \theta \leq \tau$.

Le signal au temps t , à la fin du tube est donc :

$$S(t) = \int_0^{\tau} d\theta. I_0 N(t - \theta) \quad \text{Eq. IV 1}$$

$$S(t) = \frac{I_0}{\sqrt{4\pi Dt}} \int_0^\tau e^{-\frac{(z_0(t-\theta)-L)^2}{4Dt}} d\theta \quad \text{Eq. IV 2}$$

En faisant l'hypothèse que la largeur de la distribution ne varie pas au cours de la détection, l'équation devient :

$$S(t) = \frac{I_0}{\sqrt{4\pi Dt_d}} \int_0^\tau e^{-\frac{[v_d(t-\theta)-v_d t_d]^2}{4Dt_d}} d\theta \quad \text{Eq. IV 3}$$

On fait alors un changement de variable suivant $y = \frac{v_d(t-\theta-t_d)}{2\sqrt{Dt_d}}$, d'où $dy = -\frac{v_d}{2\sqrt{Dt_d}} \cdot d\theta$, on a

$$\text{Si } \theta = 0 \text{ alors } y_0 = \frac{v_d(t-t_d)}{2\sqrt{Dt_d}} \quad \text{Eq. IV 4}$$

$$\text{Si } \theta = \tau \text{ alors } y_\tau = \frac{v_d(t-\tau-t_d)}{2\sqrt{Dt_d}}$$

L'équation de distribution du paquet d'ions devient alors :

$$S(t) = -\frac{I_0}{\sqrt{4\pi Dt_d}} \frac{2\sqrt{Dt_d}}{v_d} \int_{y_0}^{y_\tau} e^{-y^2} dy = -\frac{I_0}{\sqrt{4\pi Dt_d}} \frac{2\sqrt{Dt_d}}{v_d} \left[\int_0^{y_\tau} e^{-y^2} dy - \int_0^{y_0} e^{-y^2} dy \right] \quad \text{Eq. IV 5}$$

On utilise la fonction d'erreur :

$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-y^2} dy \quad \text{Eq. IV 6}$$

L'équation de la distribution des ions devient alors :

$$S(t) = \frac{I_0}{2v_d} \left[\operatorname{erf} \left(\frac{v_d(t - t_d)}{2\sqrt{Dt_d}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{v_d(t - \tau - t_d)}{2\sqrt{Dt_d}} \right) \right] \quad \text{Eq. IV 7}$$

Soit $\delta = \frac{2\sqrt{Dt_d}}{v_d}$ le paramètre de diffusion. D'après la relation de Nernst-Einstein, on trouve :

$$\delta = 2t_d \sqrt{\frac{k_B T}{qV}} \quad \text{Eq. IV 8}$$

Avec : k_B constante de Boltzmann
 T température du tube de mobilité
 V tension appliquée sur le tube de mobilité
 q charge de l'ion

Lorsque la fenêtre d'injection des ions dans le tube est inférieure à la largeur de la gaussienne, le pic de mobilité mesuré a alors la forme d'une gaussienne. Pour une injection ponctuelle ($\tau=0$), la résolution maximale de l'appareil est donnée par l'équation suivante, démontrée dans le chapitre précédent :

$$R_{max} = \frac{1}{4\sqrt{\ln(2)}} \sqrt{\frac{qV}{k_B T}} \quad \text{Eq. IV 9}$$

Afin de vérifier que les conditions d'utilisation de l'appareil permettent bien d'obtenir des profils de mobilité ionique dont l'élargissement est limité par la diffusion, nous comparons les résultats expérimentaux obtenus pour une solution d'éosine Y avec une courbe théorique, simulée à partir des équations détaillées ci-dessus. Pour cela, une solution de 100 μM d'éosine Y (Sigma-Aldrich, référence E6003-25G) est préparée par dilution dans du méthanol, et injectée dans la source électro-spray, en mode négatif. L'appareil est utilisé dans le mode IMS-MS, et la séparation ne se fait que dans le deuxième tube de mobilité. Les résultats obtenus à une pression de 11.62 Torr, pour une tension appliquée sur le tube de 500 V et à une température de 300 K sont présentés dans la figure 17.

Dans le spectre de masse (figure 17. a), l'espèce majoritaire est l'éosine Y doublement chargée, notée $[M-2H]^{2-}$, observée à $m/z=321$. L'espèce mono-chargée, notée $[M-H]^-$, est observée à $m/z=643$. Le profil de mobilité de l'ion mono-chargé est montré dans la figure 17. b. La courbe rouge correspond au profil théorique attendu pour un simple isomère. Elle a été calculée à partir de l'équation IV 7, pour une injection des ions rectangulaire, de durée 75 μs . Le facteur de diffusion δ calculé est alors de 0.65 ms, ce qui est largement supérieur à la durée du pulse d'injection des ions dans le tube de mobilité. Par conséquent, la forme du pic obtenu correspond à une gaussienne. La résolution est définie par l'équation IV 9. La résolution calculée pour une largeur limitée par la diffusion à 500 V est de 41.9, et la résolution expérimentale est de 40 pour l'espèce mono-chargée.

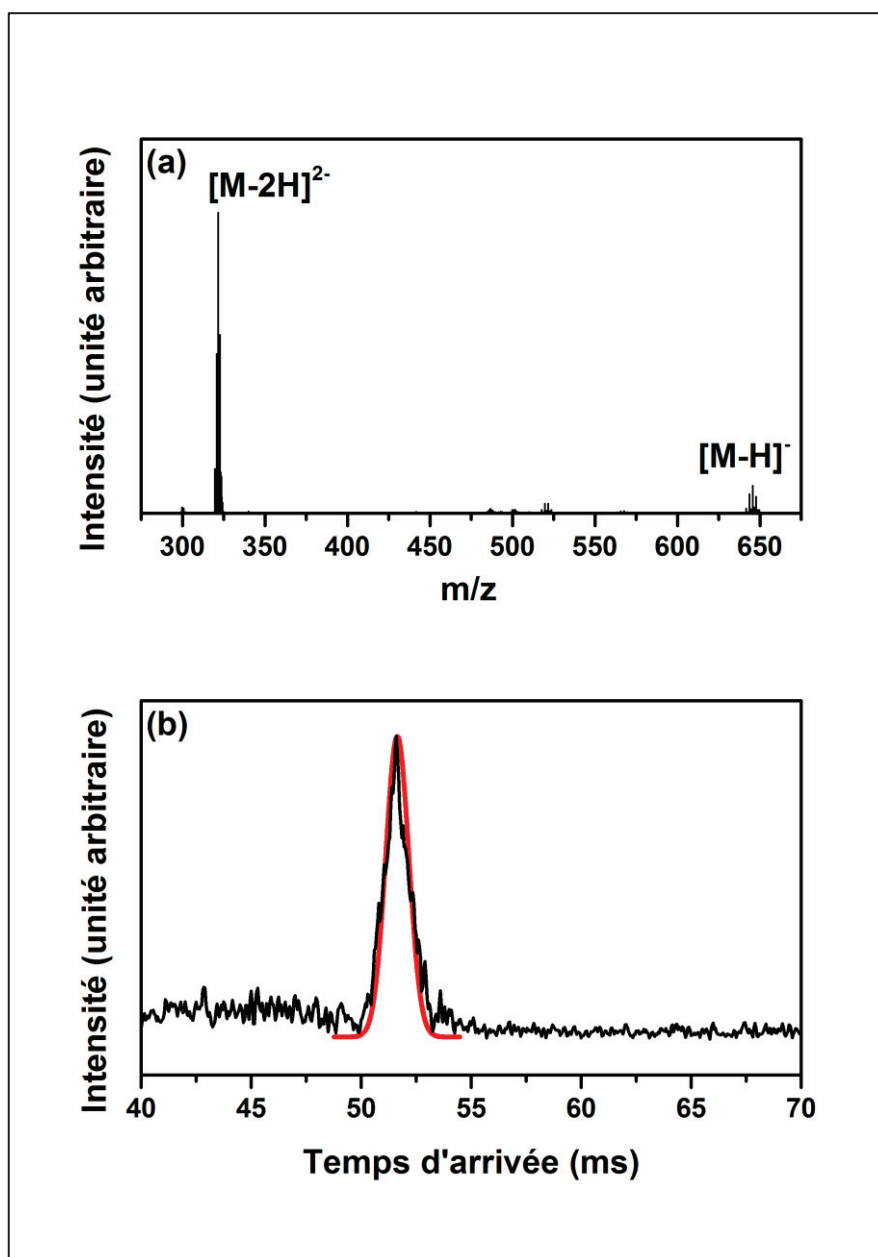


Figure 17. Etude de l'éosine Y. (a) Spectre MS. (b) Profil de mobilité comparé avec loi de Fick (courbe rouge).

Ces résultats expérimentaux sont obtenus pour des portes d'injections de très courte durée (75 μ s). Dans une seconde expérience, on s'intéresse à l'état de charge $[M-2H]^{2-}$ de l'éosine, à haute pression (11.5 Torr), et on fait varier la durée de la porte d'injection de l'éosine dans le tube de mobilité entre 0.1 et 5 ms au niveau de l'entonnoir à ions B. Dans les résultats présentés sur la figure 18 a, on constate alors un élargissement des pics de mobilité qui correspond à l'équation IV. 7. Ces profils de mobilité sont obtenus dans des conditions où les ions ne sont pas piégés dans l'entonnoir à ions B avant d'être injectés dans le deuxième tube de mobilité. Toutefois, dans les conditions d'utilisation habituelles de l'appareil, les ions sont piégés dans les entonnoirs à ions entre deux cycles IMS, de manière à augmenter le signal. Si l'on fait varier la durée d'ouverture du piège dans ces conditions-là, les profils obtenus ne correspondent plus à l'équation IV. 7 (voir figure 18.b). En effet, il n'y a plus un profil gaussien élargi, mais une queue ajoutée à la gaussienne, vers les temps longs. Ceci s'explique par le fait qu'au moment de l'ouverture du piège, tous les ions accumulés lors du cycle précédant sont éjectés vers le tube de mobilité, ce qui génère un signal intense, puis, une fois le piège vidé, les ions détectés sont ceux injectés en continu dans l'appareil au moment de l'ouverture de la porte d'injection.

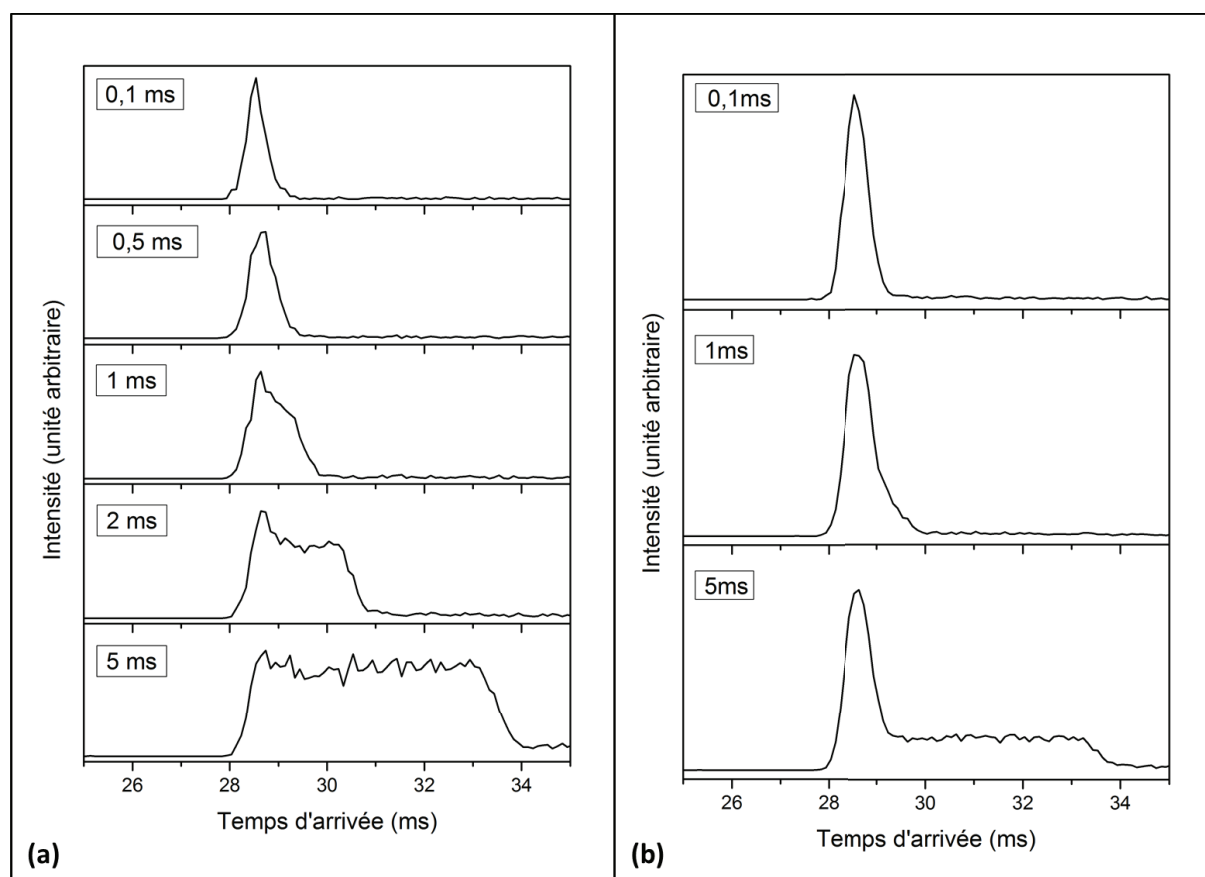


Figure 18. Profils de mobilité de l'éosine dichargée pour différentes durées de la porte d'injection des ions dans le tube de dérive dans des conditions a) où les ions ne sont pas piégés avant leur injections et b) où les ions sont piégés avant d'être injectés dans le tube..

E. Mesure de CCS absolue.

Comme démontré dans le chapitre 1 (Mobilité Ionique), la vitesse de dérive des ions est proportionnelle au champ électrique appliqué le long du tube de mobilité, dans le cas où le champ électrique est suffisamment faible. Lorsque cette hypothèse est vérifiée, la courbe des temps d'arrivée des ions en fonction de l'inverse du champ électrique est une droite de coefficient directeur $\frac{L}{K}$:

$$AT = t_0 + \frac{L}{K} * \frac{1}{E}. \quad \text{Eq. IV 10}$$

Afin de vérifier expérimentalement la validité de ce modèle dans les conditions d'utilisation de l'appareil, une solution d'éosine Y 100 μM dans du méthanol est injectée dans la source électro-spray, et une calibration est effectuée dans les mêmes conditions de température et de pression que celles décrites dans le paragraphe précédent. Les courbes des temps d'arrivée des ions mono et di-chargés en fonction de l'inverse du champ électrique sont tracées dans la figure 19. Les valeurs des coefficients de détermination (R^2) des régressions linéaires des deux courbes sont respectivement 0.99998 et 1 pour les ions mono et di-chargés. Cela signifie que l'incertitude sur la mesure de la CCS absolue ne vient pas d'une instabilité de l'appareil : la pression, la température et la tension appliquée sur les électrodes du tube de mobilité sont stables durant la mesure. La principale source d'erreur vient donc de la précision de la mesure des paramètres influençant la mobilité.

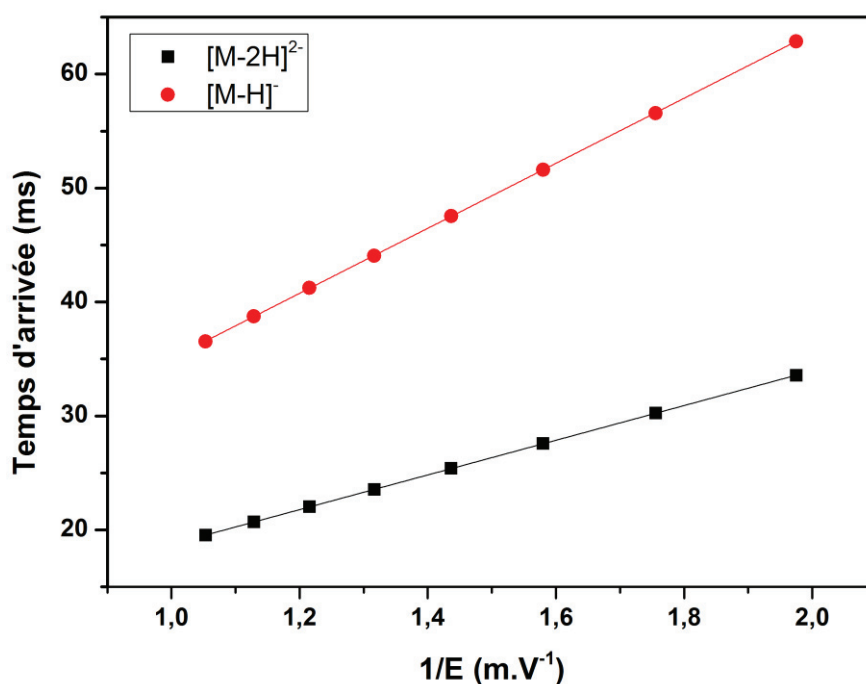


Figure 19. Courbes de calibration des ions mono et di-chargés de l'éosine Y.

La mesure du temps d'arrivée des ions en fonction de l'inverse du champ électrique appliqué sur le tube de mobilité nous permet de déterminer le rapport $\frac{L}{K}$, qui correspond à la pente de la droite tracée. En remplaçant ce rapport dans l'équation de Mason-Schamp, et en tenant compte du fait que $N = \frac{p}{k_B T}$, on l'expression de la CCS (Ω_D) suivante :

$$\Omega_D = \frac{3\sqrt{2\pi}q}{16p} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{1/2} (k_B T)^{1/2} * \frac{Pente}{L} \quad \text{Eq. IV 11}$$

D'après l'équation IV 11, l'erreur sur la mesure de la CCS vient de l'imprécision sur la mesure de la température, de la pression, de la longueur du tube de mobilité et de l'incertitude sur la pente. L'erreur relative de la mesure de CCS absolue est donc donnée par l'équation suivante :

$$\frac{\Delta\Omega_D}{\Omega_D} = \frac{\Delta p}{p} + \frac{1}{2} \frac{\Delta T}{T} + 2 \frac{\Delta L}{L} + \frac{\Delta Pente}{Pente} \quad \text{Eq. IV 12}$$

L'incertitude sur la pente dépend de la mesure du temps d'arrivée des ions ainsi que de la mesure de la tension appliquée sur le tube et de la bonne adéquation avec le modèle de régression linéaire. Les alimentations Haute Tension fournissent une tension stable lors des mesures de mobilité, et l'erreur est très faible (1 %). De plus, les coefficients de détermination des régressions linéaires des courbes tracées sont très proches de 1. L'incertitude sur la pente est donc très faible. L'incertitude sur la température est de quelques degrés sur les 300 K, et cette erreur est pondérée d'un facteur $\frac{1}{2}$ dans le calcul de l'erreur relative de la CCS (équation IV 12). L'incertitude sur la longueur du tube, venant d'une possible dilatation des matériaux et du jeu au niveau des contacts à ressort entre les sections de tube, est d'environ 2 mm pour une longueur de tube de 79 cm. Donc le terme dominant est l'incertitude sur la pression absolue. En effet, la pression est le paramètre le moins stable au cours des expériences, et les calculs de CCS sont effectués sur une valeur moyenne de la pression sur la durée de l'acquisition.

F. Tests de sélection d'un isomère

Afin de tester l'efficacité de la sélection d'un isomère en fonction de son temps de dérive dans le tube de mobilité, une solution d'ubiquitine (Sigma Aldrich, référence U6253-25MG) à 12 μ M dans un mélange eau : méthanol (1 : 1) et 1% d'acide acétique est injectée dans la source électro-spray. L'appareil est utilisé dans le mode tandem IMS à une pression de 5.5 Torr, et une tension de 580 V est appliquée entre l'entrée et la sortie de chacun des deux tubes de mobilité. Le profil de mobilité de l'état de charge 7+ est donné en figure 20.a. Pour cet état de charge, on distingue trois principales

familles conformationnelles nommées U7A, U7B et U7C selon l'ordre croissant des temps de dérive. Les valeurs moyennes des sections efficaces de collision de chacune de ces trois familles ont été déterminées à $1192 \pm 33 \text{ \AA}^2$, $1441 \pm 51 \text{ \AA}^2$ et $1552 \pm 23 \text{ \AA}^2$ pour U7A, U7B et U7C, respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude du même système par Bowers [12] et Clemmer [13].

A la sortie du premier tube de dérive, une fenêtre de sélection rectangulaire, de 2 ms de large est appliquée avec différents délais (voir figure 20. b,c,d), et un délai de 10 ms entre la sélection et l'injection dans le deuxième tube de mobilité est gardé constant pour l'ensemble des mesures. Ces trois différentes fenêtres de sélection permettent d'isoler les familles conformationnelles U7A, U7B et U7C les unes des autres, montrant ainsi l'efficacité de la sélection. Les pics observés sont plus larges que la fenêtre de sélection, en raison à la fois de l'élargissement par diffusion dans le tube de mobilité et de l'interconversion entre les différents conformères qui composent chaque famille conformationnelle.

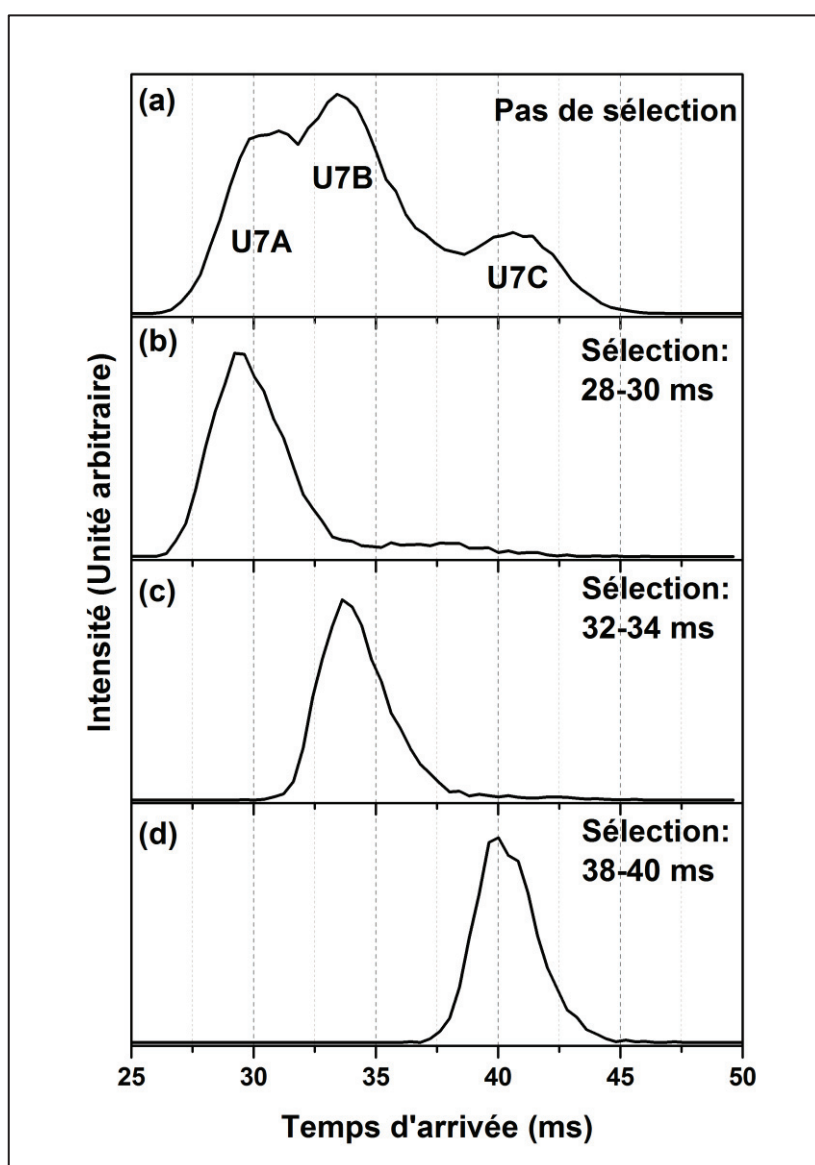


Figure 20. Sélection de trois conformères de l'ubiquitine 7+.

G. Activation par collisions

Principe

Le principe de l'activation par collisions est d'accélérer les ions par une forte différence de potentiel entre deux électrodes pour leur fournir une importante énergie cinétique. Lors des collisions entre les ions et le gaz tampon (hélium), une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne. Il en résulte une activation de l'ion, qui se traduit par un changement de conformation, et peut aller jusqu'à la rupture d'une liaison covalente dans certains cas, produisant des ions fragments.

Lors des expériences de mobilité l'appareil est utilisé dans le mode tandem IMS, décrit dans la partie III.B (Mode tandem IMS). Suite à une séparation des ions dans le premier tube de mobilité, une conformation spécifique d'un état de charge donné est sélectionnée. L'activation par collisions avec l'hélium de l'ion sélectionné se fait entre les deux tubes de mobilité, dans le deuxième double entonnoir de l'appareil. Les produits d'activation sont ensuite séparés dans le deuxième tube de mobilité, et analysés par spectrométrie de masse. L'accélération des ions se fait lors du passage du premier au deuxième entonnoir. La différence de potentiel entre l'électrode Fun1Out (dernière électrode du premier entonnoir) et Base (électrode intermédiaire entre les deux entonnoirs, portée à un potentiel électrique indépendant des électrodes adjacentes) est augmentée progressivement. La différence de potentiel entre ces deux électrodes est typiquement de l'ordre de 5 V lorsque l'activation par collisions n'est pas souhaitée, et entre 40 et 150 V dans le cas contraire. Le risque de décharge électrique entre les deux électrodes est la principale limite à l'augmentation de la différence de potentiel. En effet, ces deux électrodes, espacées d'1 mm, sont placées dans une enceinte ne contenant que de l'hélium gazeux, à une pression comprise entre 4 et 12 Torr (la pression variant selon les expériences menées). Ces conditions sont proches du minimum de la courbe de Paschen pour l'hélium.

Activation d'un conformère du Cytochrome C

Les premiers tests d'activation d'un isomère sélectionné sont faits avec une solution de cytochrome C (10 μ M dans un mélange eau : méthanol 1 : 1). Les conditions d'opération du tube sont identiques à celles décrites ci-dessus. On s'intéresse à l'état de charge 9+ du cytochrome C, qui comporte deux familles conformationnelles notées A et B (voir figure 21.a). Le premier pic est sélectionné à la fin du premier tube de mobilité (voir figure 21.b), entre 32.7 et 33.4 ms. Lors des mesures sans activation par collision, les électrodes Fun1Out et Base sont maintenues au même potentiel (potentiel d'activation=0V). Pour l'activation, une différence de potentiel est appliquée entre ces deux électrodes. Celle-ci varie entre 100 et 160 V (figure 21.c à f). Pour un potentiel d'activation de nul, un seul pic est détecté, et correspond à la famille conformationnelle A. Lorsqu'une différence de potentiel de 100 V est appliquée, le pic de la faille A diminue, et une deuxième faille conformationnelle apparaît (notée C sur la figure 21 c). Cette dernière est détectée à

un temps d'arrivée intermédiaire entre les familles A et B. Lorsque le potentiel d'activation est augmenté entre 140 et 160 V, le signal des deux pics détectés précédemment diminue, et un troisième pic, correspondant au temps d'arrivée de la famille B, apparaît. Ces résultats sont attendus dans le cas où le cytochrome C se déplie sous l'effet de l'activation, pour donner la famille intermédiaire C puis la famille B, de manière similaire à ce qui a été observé par Clemmer [14] lors d'une expérience d'activation de l'ubiquitine.

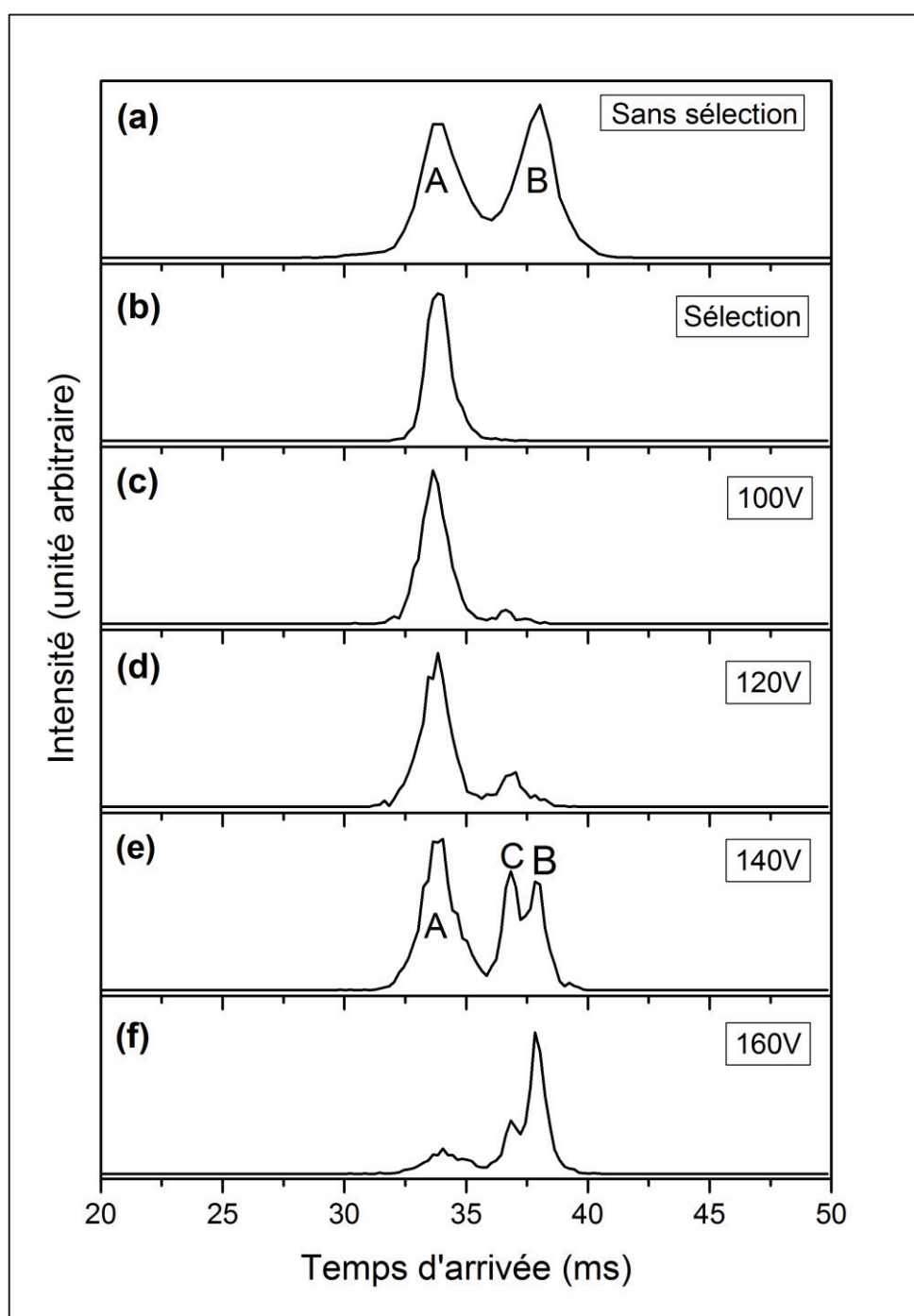


Figure 21. Activation par collisions d'un conformère du Cytochrome C 9+.

Sur la figure 22.a, les aires des pics respectifs A, B et C (unité arbitraire) sont représentées en fonction de la tension d'action appliquée sur l'entonnoir à ions. Ceci permet de visualiser la diminution du pic de la famille A et l'augmentation des pics des familles B et C. La même expérience a été menée sur l'ubiquitine. La famille U7A (représentée sur la figure 22.b) est sélectionnée à la fin du premier tube de mobilité. Lors des mesures sans activation par collision, la différence de potentiel entre les électrodes Fun1Out et Base (potentiel d'activation) est de 4 V. Pour l'activation, cette différence de potentiel est augmentée jusqu'à 145 V (figure 22.b). Pour un potentiel d'activation de 4 V, un seul pic est détecté, et correspond à la famille conformationnelle U7A. Lorsque la différence de potentiel est augmentée à 94 V, une part importante des ions est détectée au temps de dérive correspondant à la famille U7B : le signal correspondant à la famille U7A diminue tandis que celui correspondant à la famille U7B augmente. Lorsque le potentiel d'activation est augmenté jusqu'à 134 V, tous les ions sont détectés au temps de dérive de la famille U7C. Ce type d'expérience nous permet de suivre les transitions entre les différents isomères, et d'identifier les intermédiaires.

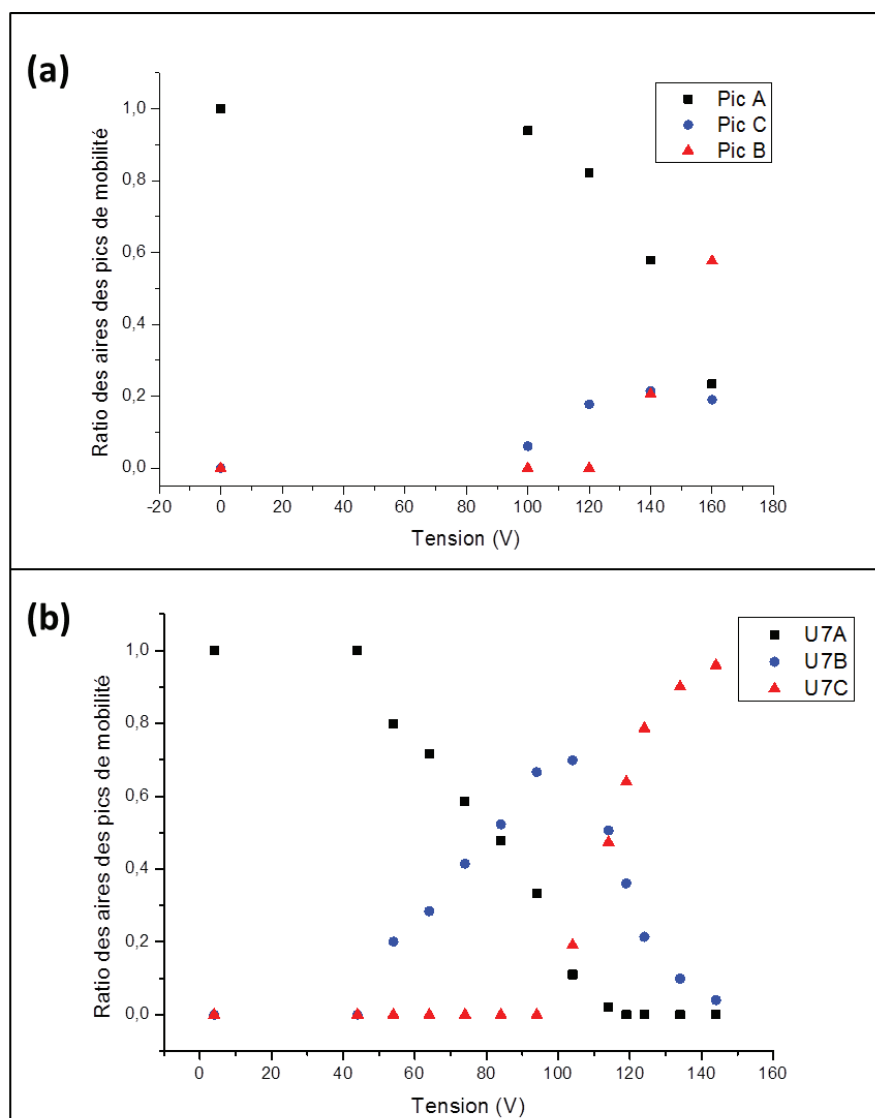


Figure 22. Ratios des aires des pics de mobilité en fonction de la tension d'activation appliquée a) pour le cytochrome C 9+ et b) pour l'ubiquitine 7+.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons donné une description détaillée de l'appareil couplant spectrométrie de masse, spectrométrie de mobilité ionique et spectroscopie laser, développé dans le laboratoire. Nous avons également détaillé les différents modes de fonctionnement de l'appareil, à savoir un simple couplage IMS-MS, ou un couplage tandem IMS-MS, ou enfin un couplage des trois techniques analytiques : laser IMS-MS. Ces différents modes d'opération ouvrent un large champ d'analyses : mesure de sections efficaces de collisions, activation des ions par collisions, spectroscopie laser d'action sur un conformère sélectionné. Les principaux réglages, effectués lors du montage de l'appareil, ont été présentés. A travers les premiers résultats expérimentaux, nous avons donné les principales caractéristiques de l'appareil (fréquences de fonctionnement, résolution...), et vérifié que les conditions expérimentales correspondent aux hypothèses faites pour les calculs de traitement des données. La suite du manuscrit sera consacrée à l'étude de différents systèmes, permettant d'explorer diverses possibilités d'analyse offertes par le montage.

1. Simon, A.-L., et al., *Tandem ion mobility spectrometry coupled to laser excitation*. Rev. Sci. Instrum., 2015. **86**(9): p. 094101.
2. Bahr, R., D. Gerlich, and E. Teloy, *Ring Electrode Ion Guide*. E. Verh. Dtsch. Phys. Ges.(IV), 1969. **4**: p. 343.
3. Shaffer, S.A., et al., *A novel ion funnel for focusing ions at elevated pressure using electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1997. **11**(16): p. 1813-1817.
4. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*. J. Phys. Chem., 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
5. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Negative ion production with the electrospray ion source*. J. Phys. Chem., 1984. **88**(20): p. 4671-4675.
6. Taylor, G., *Disintegration of Water Drops in an Electric Field*. Proc. R. Soc. Lond. A, 1964. **280**(1382): p. 383-397.
7. Taylor, G., *Electrically Driven Jets*. Proc. R. Soc. Lond. A, 1969. **313**(1515): p. 453-475.
8. Rayleigh, L., *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*. Philos. Mag., 1882. **14**(87): p. 184-186.
9. Iribarne, J.V. and B.A. Thomson, *on the evaporation of small ions from charged droplets*. J. Chem. Phys., 1976. **64**(6): p. 2287-2294.
10. Dole, M., L.L. Mack, and R.L. Hines, *Molecular beams of macroions*. J. Chem. Phys., 1968. **49**(5): p. 2240-&.
11. BrukerDaltonics, *MaXis Impact User Manual*. 2011.
12. Wyttenbach, T. and M.T. Bowers, *Structural Stability from Solution to the Gas Phase: Native Solution Structure of Ubiquitin Survives Analysis in a Solvent-Free Ion Mobility-Mass Spectrometry Environment*. J. Phys. Chem. B, 2011. **115**(42): p. 12266-12275.
13. Myung, S., et al., *Structural transitions of electrosprayed ubiquitin ions stored in an ion trap over similar to 10 ms to 30 s*. J. Phys. Chem. A, 2002. **106**(42): p. 9976-9982.
14. Shi, H.L., et al., *Solution Dependence of the Collisional Activation of Ubiquitin M+7H (7+) Ions*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2014. **25**(12): p. 2000-2008.

Chapitre 3 :

Spectroscopie de Photo- isomérisation

I.	Introduction.....	84
II.	Les systèmes étudiés.....	85
A.	MPVP et éthers couronne	85
B.	Préparation des échantillons et mode opératoire	86
III.	Résultats	86
A.	Etude des profils de mobilité ionique	86
B.	Photo-isomérisation laser	88
C.	Spectres optiques : spectres PISA	90
IV.	Discussions	94
A.	Allure globale des spectres.....	94
B.	Influence de la présence de benzènes sur l'éther couronne	94
C.	Influence de la taille de la cavité de l'éther couronne	95
V.	Conclusion	97

I. Introduction

L'expérience de couplage laser et mobilité ionique en tandem (IMS-IMS) permet de réaliser des expériences de spectroscopie d'action. En effet, comme il a été développé dans le chapitre 1 (Mobilité ionique), la spectroscopie optique en phase gazeuse est limitée par la faible densité des ions, ce qui rend difficile les mesures d'absorption. Une façon possible de surmonter cette difficulté est de coupler la spectroscopie laser avec la spectrométrie de masse. On ne mesure alors plus l'absorption des ions, mais le produit d'une réaction photo-induite, détecté par spectrométrie de masse [1]. Cela est possible dans le cas où les divers produits de la réaction ont des rapports masse sur charge différents les uns des autres et différents de l'ion parent : ils seront alors distincts sur le spectre de masse. Dans le cas où les ions parents et les ions produits par la réaction photo-induite ont des rapports masse sur charge identiques, ils ne sont pas distincts en spectrométrie de masse et ce type de spectroscopie d'action atteint sa limite. C'est le cas en particulier des réactions de photo-isomérisation. En permettant de mettre en évidence des changements de conformation photo-induits, la spectrométrie de mobilité ionique permet de repousser les limites de la spectroscopie d'action en l'ouvrant à ces réactions de photo-isomérisation.

Le premier exemple de spectroscopie de photo-isomérisation (PISA) basé sur le couplage de la spectroscopie laser, de la spectrométrie de masse et de la mobilité ionique a été présenté en 2013 par le groupe de Bieske [2] qui a étudié différents systèmes tels que des carbocyanines [2, 3], et le rétinol [4-6].

Au niveau biologique, des réactions de photo-isomérisation sont impliquées dans de nombreux processus, tels que la vision, ou dans des voies de régulation de réactions biochimiques. Leur étude représente donc un enjeu pour la compréhension des mécanismes biologiques. Dans ce chapitre, nous présenterons les premiers résultats de spectroscopie de photo-isomérisation obtenus à l'aide de notre dispositif expérimental. Nous nous intéresserons à l'isomérisation trans-cis de la molécule 1-méthyl-4-[2-(1-pyrenyl)vinyl]pyridinium (MPVP), qui peut être induite par l'absorption d'un photon visible. Nous étudierons en particulier l'influence de la complexation de cette molécule avec différents éthers-couronne afin d'évaluer l'effet des interactions non-covalentes liées à la complexation sur les propriétés optiques du MPVP et sur son isomérisation.

II. Les systèmes étudiés

A. MPVP et éthers couronne

Dans ce chapitre, nous étudierons l'isomérisation photo-induite du 1-méthyl-4-[2-(1-pyrényl)vinyl]pyridinium (MPVP) de formule brute $C_{24}H_{18}N$. Sa formule développée est la suivante :

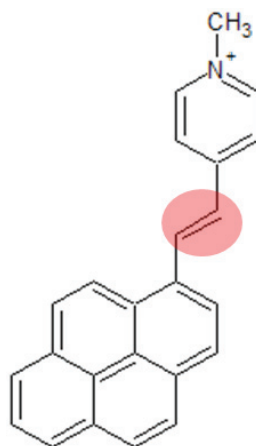


Figure 1. Formule développée du MPVP.

L'isomérisation cis-trans de la fonction alcène située entre le pyrène et la pyridine (encerclée sur la figure 1) peut être photo-induite. En effet, lorsqu'une solution de MPVP trans est exposée à la lumière du soleil, on observe une isomérisation trans $\rightarrow$ cis. A l'inverse aucune isomérisation cis $\rightarrow$ trans n'est observée lorsqu'une solution de MPVP cis est exposée à la lumière du soleil. Le but de l'expérience décrite ci-après est de reproduire cette isomérisation dans le tube de mobilité ionique, avec le laser OPO pico seconde, et de caractériser cette isomérisation par IMS en mesurant le spectre de photo-isomérisation.

On étudiera également dans ce chapitre l'influence sur l'isomérisation de la complexation de la molécule de MPVP avec différents ligands. On s'attend à un effet des ligands sur les propriétés optiques du système lié à l'interaction avec les électrons pi, en particulier des effets électrostatiques et éventuellement des effets de confinement. Les ligands utilisés sont des éthers couronnes variant les uns des autres par le nombre de benzène et la taille de la cavité. En faisant varier le nombre de benzène, on s'attend à jouer sur les interactions non covalentes en ajoutant des possibilités d'empilement des cycles aromatiques. En revanche, en faisant varier la taille de la cavité de l'éther couronne, on s'attend à jouer sur le confinement du MPVP dans l'éther-couronne. Les différents systèmes étudiés sont regroupés ci-dessous, dans le tableau 1.

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le groupe d'Edwin de Pauw de l'université de Liège, lors d'un séjour d'Izabella Czerwinska à Lyon.

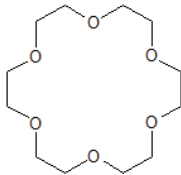
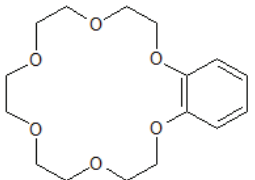
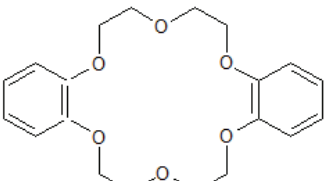
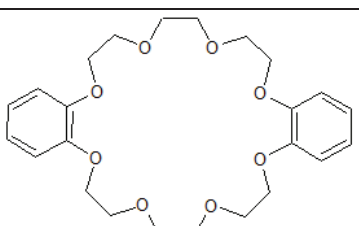
Nom du complexe étudié	Formule de l'éther couronne	Masse molaire du complexe
MPVP non complexé	-	320 u
MPVP @18C6		584 u
MPVP @B18C6		632 u
MPVP @DB18C6		680 u
MPVP @DB24C8		768 u

Tableau 1. Formules et masses moléculaires des différents systèmes.

B. Préparation des échantillons et mode opératoire

Les échantillons étant photosensibles, toute la préparation doit impérativement s'effectuer à l'abri de la lumière. Les solutions de complexes sont obtenues en diluant des solutions mères de MPVP et d'éther couronne dans un mélange eau : méthanol (1 : 1) afin d'obtenir des concentrations de 5 μM de MPVP et 50 μM d'éther couronne.

III. Résultats

A. Etude des profils de mobilité ionique

Dans un premier temps on s'intéressera uniquement aux profils de mobilité ionique du système. Pour cela, l'appareil est utilisé en mode simple IMS.

Les isomères cis et trans peuvent être séparés par mobilité ionique. Afin de comparer les taux d'isomérisation des différents complexes, il est possible de préparer des solutions d'isomère trans de chaque complexe, puis de les exposer à la lumière du soleil pendant un temps déterminé. Les

solutions irradiées sont alors analysées par spectrométrie de mobilité ionique. Les profils de mobilité ionique du MPVP ainsi que des différents complexes irradiés ainsi obtenus sont donnés en figure 2. Les sections efficaces de collision de chacun des systèmes sont également mesurées, et répertoriées dans le tableau 2.

Ces résultats montrent que lorsque le MPVP est complexé avec un éther-couronne, son temps de dérive augmente. De même lorsque la taille de l'éther couronne augmente (figure 2 b à f) le temps de dérive continue d'augmenter. Cela est en accord avec les résultats attendus, car les sections efficaces de collision augmentent dans le cas du complexe (tableau 2).

Par ailleurs, les isomères cis et trans du MPVP non complexé ne sont pas bien résolus en mobilité (figure 2.a). Lorsque le MPVP est lié à un éther-couronne, la différence de CCS entre les isomères cis et trans augmente, et il est possible d'obtenir des pics de mobilité parfaitement résolus. Comme les pics sont bien résolus, on en déduit que la solution ne contient bien que deux isomères (cis et trans), et non d'autres conformations supplémentaires. Plus le temps d'exposition au soleil augmente, plus le pic de gauche (temps de dérive faible) augmente. On peut ainsi identifier chacun des deux isomères cis et trans sur les profils de mobilité : l'isomère cis, plus compact a un temps de dérive inférieur à celui de l'isomère trans.

En mesurant le rapport des aires des pics cis et trans, on peut en déduire le taux d'isomérisation.

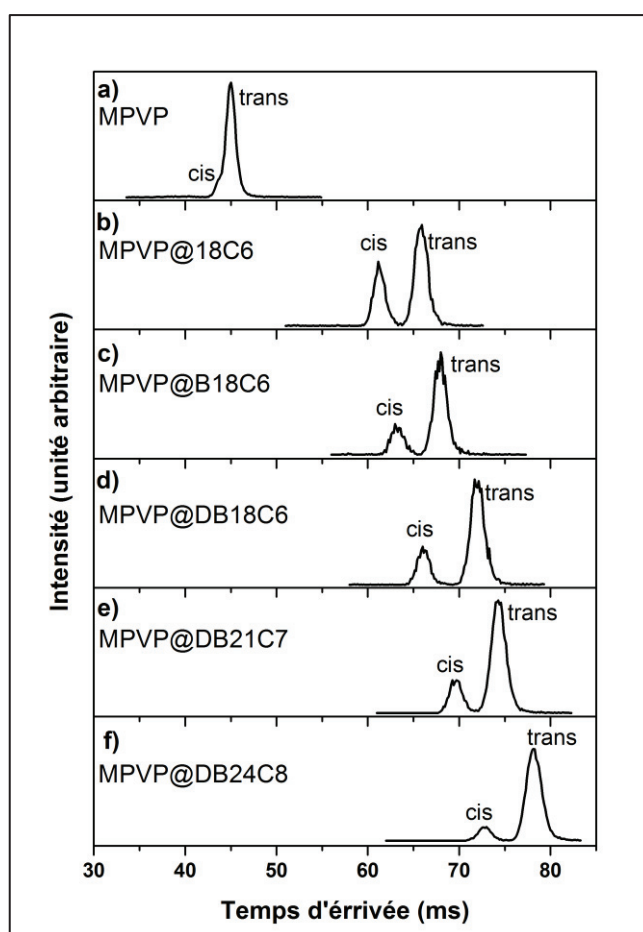


Figure 2. Profils de mobilité ionique de la solution de MPVP trans seul ou complexé, exposé au soleil.

	MPVP	+18C6	+B18C6	+DB18C6	+DB24C8
CCS (trans)	118 Å ²	177 Å ²	182 Å ²	193 Å ²	211 Å ²
CCS (cis)	116 Å ²	165 Å ²	169 Å ²	177 Å ²	196 Å ²
Δ CCS	2 Å ²	12 Å ²	13 Å ²	16 Å ²	15 Å ²

Tableau 2. Valeurs des sections efficaces de collision des différents systèmes et écart entre les CCS des isomères cis et trans pour chaque système.

Toutefois, cette méthode présente deux inconvénients majeurs. Tout d’abord, il est difficile de connaître avec précision le temps d’irradiation. En effet, même si les échantillons sont préparés dans l’obscurité, et couverts d’aluminium le reste du temps, le facteur humain induit une incertitude importante dans le temps d’irradiation. Ensuite, en solution, il y a un équilibre entre la formation et la dissociation des complexes. Il est alors difficile d’attribuer l’isomérisation observée à l’isomérisation du complexe MPVP + éther couronne ou à l’isomérisation du MPVP seul, qui se complexera ensuite avec l’éther couronne. Le fait de déclencher l’isomérisation des complexes en phase gazeuse à l’intérieur du tube de mobilité permet donc de surmonter ces difficultés.

B. Photo-isomérisation laser

Dans un premier temps, on va tenter de reproduire dans l’appareil laser-IMS les résultats obtenus lorsque les échantillons étaient exposés au soleil. Pour cela, des solutions de MPVP trans (complexé ou non) sont préparées à l’abri de la lumière, et injectées dans l’appareil laser-IMS, utilisé en mode tandem-IMS. Les ions au temps de dérive de l’isomère trans sont sélectionnés en mobilité (courbe noire sur la figure 3b), puis irradiés à 410 nm avec le laser OPO pico-seconde. On obtient alors le profil de mobilité représenté par la courbe rouge sur la figure 3b : on y observe une déplétion du pic de l’isomère trans et un épaulement au temps de dérive de l’isomère cis, correspondant à un système plus compact. Afin d’identifier avec certitude cet épaulement comme l’isomère cis, et non comme le produit de toute autre activation laser, on compare le profil de mobilité ainsi obtenu à celui de la solution exposée au soleil (figure 3.a), mesuré avec les mêmes paramètres expérimentaux appliqués sur le tube de mobilité. Les profils étant similaires, on met ainsi en évidence une photo-isomérisation trans → cis induite par laser et faite en phase gazeuse dans l’appareil tandem-IMS sur un isomère sélectionné.

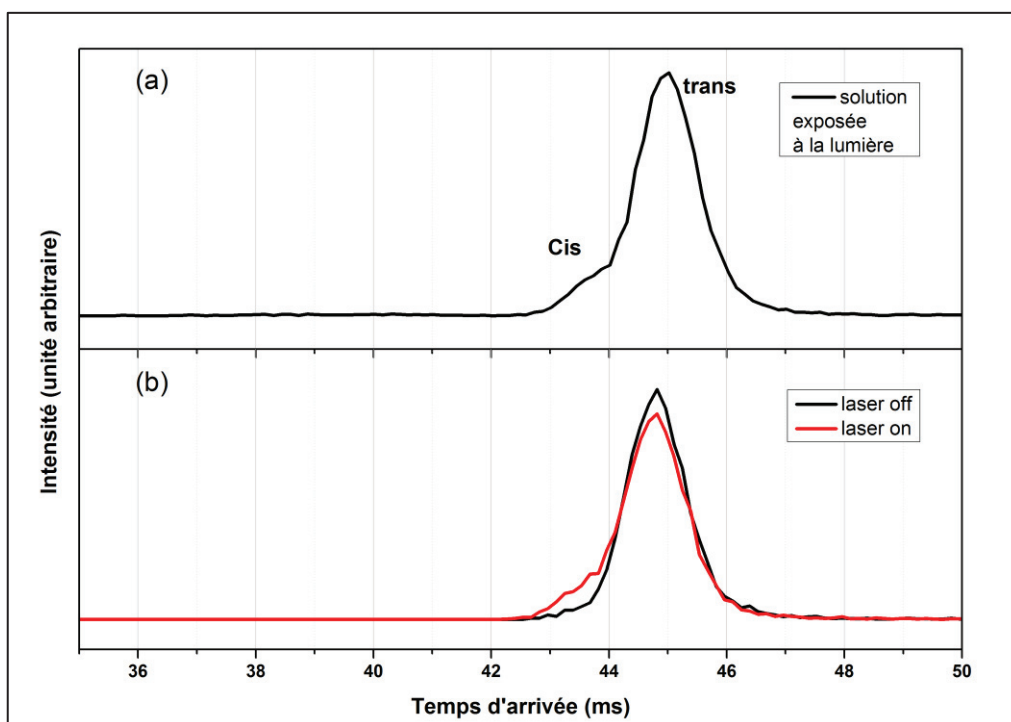


Figure 3. Profils de mobilité ionique des solutions de MPVP trans (a) exposée au soleil et (b) irradiée par le laser OPO à 410 nm.

La même expérience est répétée pour chacun des complexes MPVP + éther couronne, mettant en évidence la photo-isomérisation d'un isomère spécifique. Les résultats de l'isomérisation $\text{trans} \rightarrow \text{cis}$ induite par laser du MPVP et de chacun des complexes MPVP avec un éther couronne sont présentés dans la figure 4.

L'allure des profils de mobilité ionique est similaire à celle des profils obtenus lors des mesures de mobilité ionique des solutions exposées à la lumière : la séparation des isomères est meilleure dans le cas du MPVP complexé et les temps de dérive augmentent avec la taille de l'éther couronne. Cependant les expériences menées avec une irradiation laser des complexes dans l'appareil laser-IMS présentent l'avantage d'être menées en phase gazeuse, donc il n'y a pas d'équilibre de dissociation et formation des complexes. On irradie ainsi sélectivement l'isomère trans complexé. De plus, on connaît avec précision la durée d'irradiation. L'aire des pics de mobilité ionique mesurée est donc pertinente pour la mesure du taux d'isomérisation à une longueur d'onde donnée.

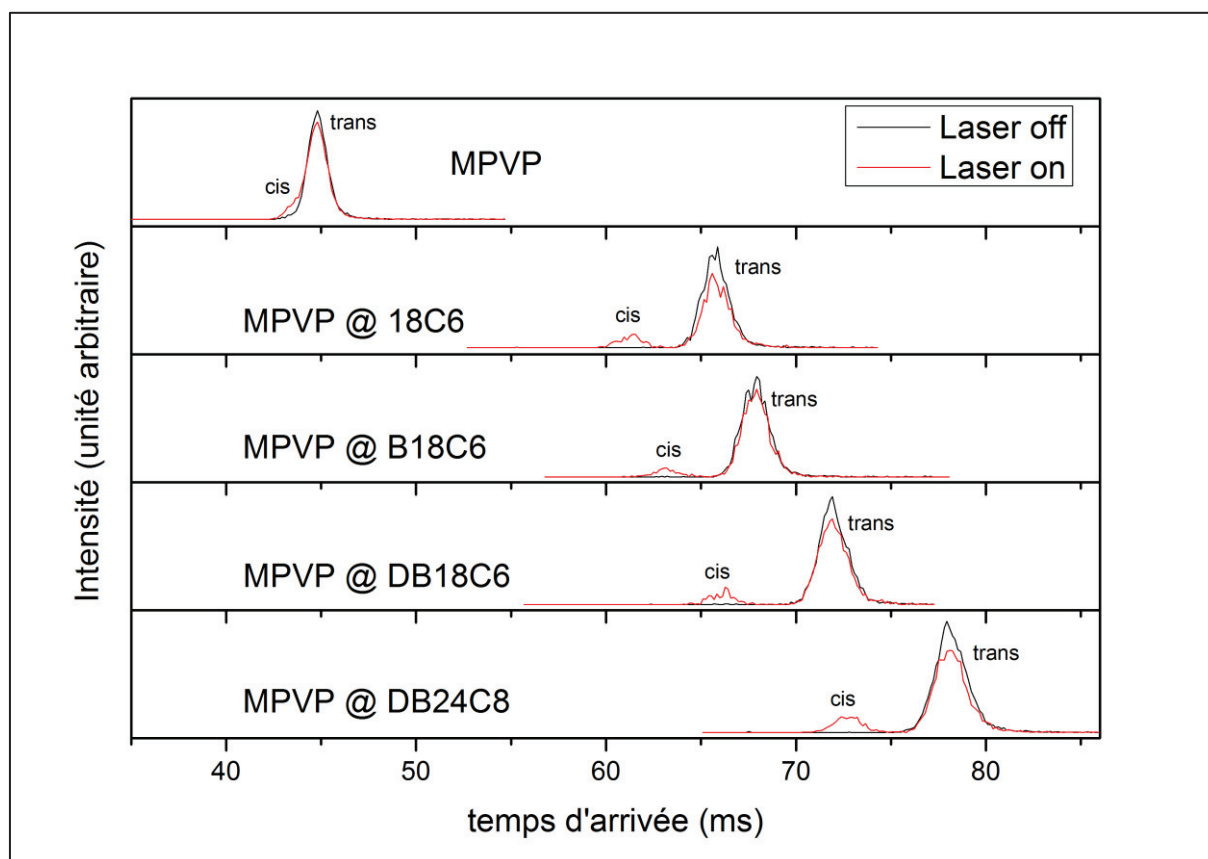


Figure 4. Profils de mobilité ionique des isomères trans du MPVP et des complexes avec les éthers couronne, avec et sans irradiation laser à 410 nm.

C. Spectres optiques : spectres PISA

Les profils de mobilité mettent en évidence la photo-isomérisation induite par laser dans le tube de mobilité d'un isomère sélectionné en fonction de son temps de dérive. Cependant, ces profils ont été obtenus pour une longueur d'onde unique du laser OPO (410 nm), et le maximum d'absorption peut différer d'un complexe à l'autre. Il n'est donc pas possible de comparer les taux de photo-isomérisation des différents complexes dans ces conditions expérimentales. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir les spectres optiques de photo-isomérisation (spectres PISA).

L'appareil de mobilité ionique est utilisé dans le mode IMS-laser-IMS, décrit dans le chapitre 2 (Développement instrumental). Les solutions de complexes, placées dans une seringue recouverte de papier d'aluminium, sont injectées dans la source électro-spray. Après une séparation dans le premier tube de mobilité, l'isomère trans est sélectionné et piégé dans le deuxième double entonnoir à ions, situé entre les deux tubes de mobilité. Pendant le temps de piégeage, le complexe est irradié avec le laser OPO pico-seconde (EKSPLA) pendant 60 ms, à des longueurs d'onde comprises entre 410 et 630 nm. Ces longueurs d'onde correspondent à la zone d'absorption du groupement pyrène de la molécule complexée, en phase gazeuse. Les produits de l'irradiation sont ensuite séparés dans le deuxième tube de mobilité et analysés par spectrométrie de masse. Ce mode

opérateur permet de connaître avec précision le temps d'irradiation des complexes, et d'être sûr de n'irradier que le complexe MPVP + éther couronne, et non le MPVP dissocié. En effet, en phase gazeuse, le complexe n'a pas le temps de se dissocier et se reformer durant le temps de piégeage dans le double entonnoir à ions. Par ailleurs, les pics de mobilité ionique du MPVP non complexé cis et trans n'étant pas bien résolus lorsque la séparation se fait dans un tube de mobilité, l'appareil fonctionne à haute pression, afin d'augmenter les temps de dérive et d'obtenir une résolution plus élevée. Ainsi les tubes de mobilité sont maintenus à une pression de 11.65 Torr.

Le taux de photo-isomérisation (%) peut alors être calculé à partir des aires des pics de mobilité des isomères cis et trans, selon la formule suivante :

$$\text{Taux de photo - isomérisation} = \frac{I_{on}^{cis} - I_{off}^{cis}}{I_{off}^{trans} * \varphi} * 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Avec : φ la fluence du laser

I l'aire du pic de mobilité de chacun des isomères des différents complexes, laser on ou laser off.

De même, le taux de photo-déplétion, correspondant à la diminution du signal de l'isomère trans, peut être calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de photo - déplétion} = \frac{I_{off}^{trans} - I_{on}^{trans}}{I_{off}^{trans} * \varphi} * 100 \quad \text{Eq. 2}$$

En calculant les taux de photo-isomérisation et de photo-déplétion des différents systèmes pour un grand nombre de longueurs d'onde, comprises entre 410 et 630 nm, on obtient les spectres PISA (PI) et les spectres de photo-déplétion (PD) de ces complexes (voir figure 5 et figure 6).

Sur les spectres du MPVP seul, le taux de photo-isomérisation est supérieur au taux de photo-déplétion. Une hypothèse pour expliquer cela est une différence d'efficacité de transmission entre les isomères cis et trans, en particulier au moment de l'injection dans le deuxième tube de dérive. L'isomère cis ayant un temps de dérive inférieur, on peut supposer qu'il est également plus rapidement éjecté du piège, et donc plus efficacement transmis vers le détecteur. Le taux de photo-déplétion, mesuré uniquement à partir de l'isomère trans, serait donc sous-évalué par rapport au taux de photo-isomérisation.

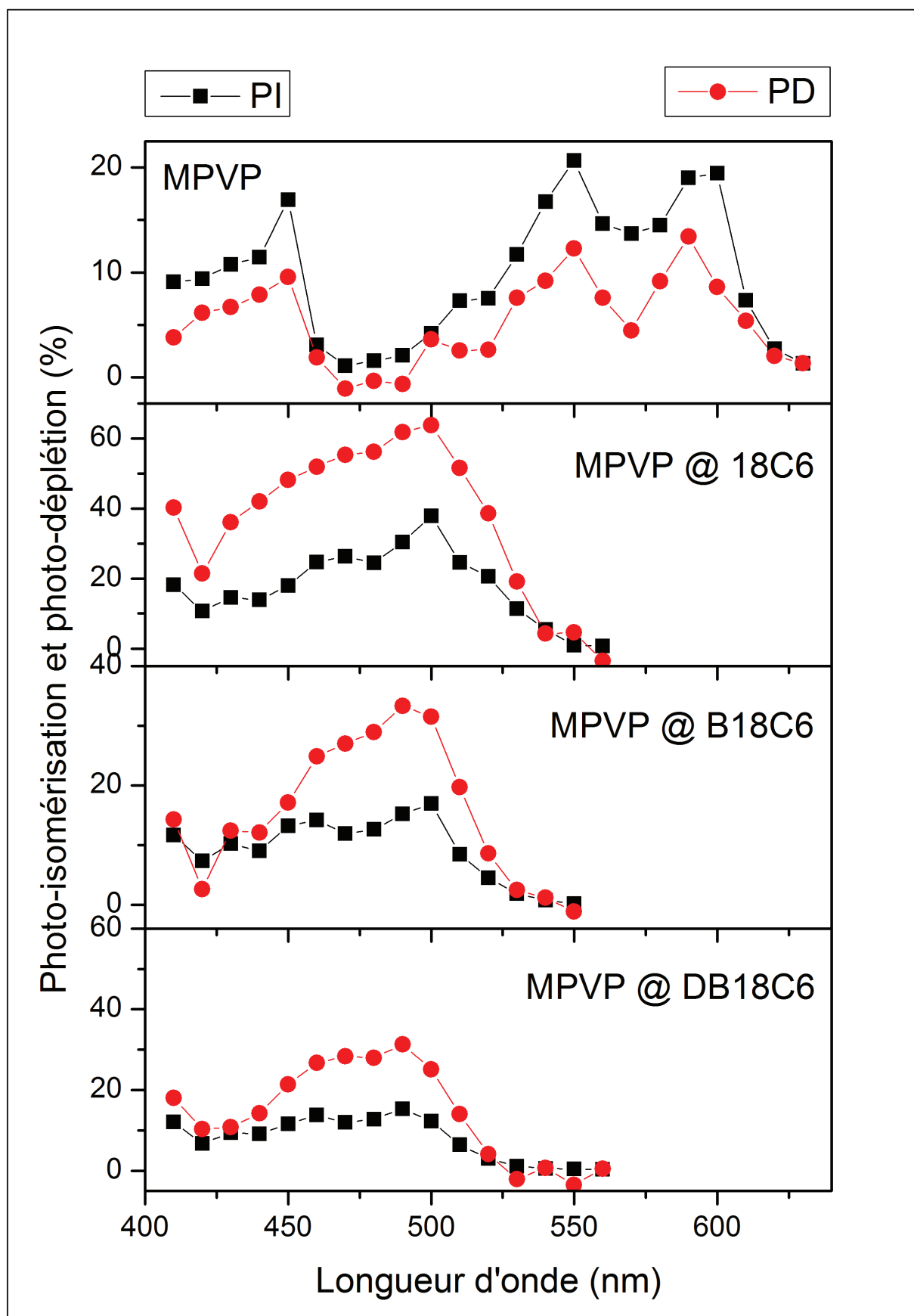


Figure 5. Spectres PISA pour les complexes avec des éthers couronnes 18C6 ayant un nombre croissant de benzènes.

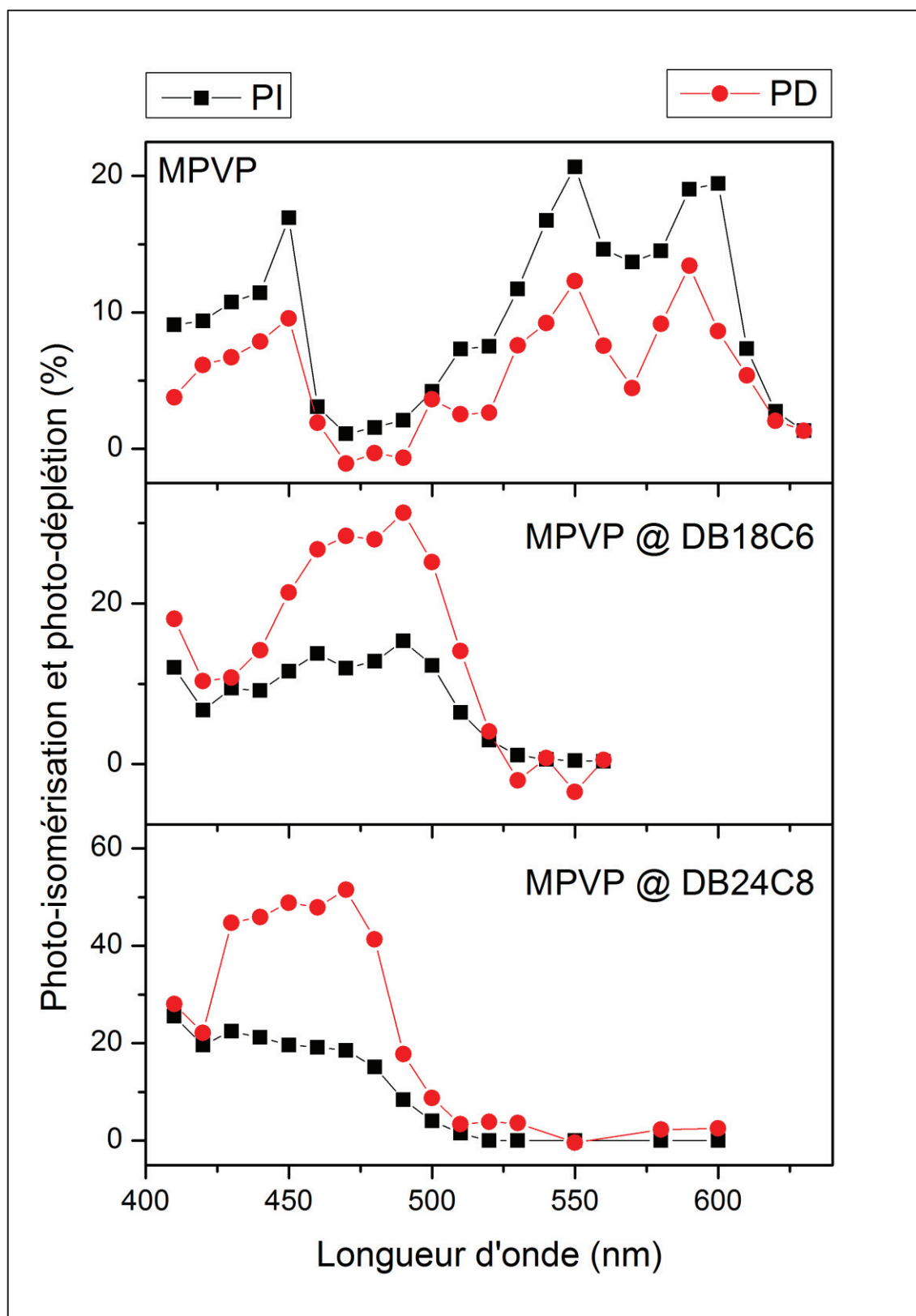


Figure 6. Spectres PISA pour des complexes avec des éthers couronnes de tailles croissantes.

IV. Discussions

A. Allure globale des spectres

Les spectres optiques représentés sur les figures 4 et 5 nous permettent de comparer les taux de photo-isomérisation (en noir) et de photo-déplétion (en rouge) de chaque système, individuellement. L'allure globale de ces spectres optiques, dans cette gamme de longueurs d'onde, est la même pour chacun des systèmes, que le MPVP soit libre ou complexé à un éther couronne, à l'exception du système MPVP +DB24C8. Cela signifie que la photo-isomérisation est la principale voie de relaxation après l'absorption des photons.

L'allure des spectres de photo-isomérisation et des spectres de photo-déplétion est identique. Cependant, le taux de déplétion des complexes est plus important que le taux de photo-isomérisation de ces derniers. La différence entre les deux correspond à un autre mode de relaxation que la photo-isomérisation. Il s'agit dans le cas présent de la dissociation du complexe MPVP +éther couronne.

D'après les spectres en solution, le pyrène absorbe dans les 320 nm [7]. D'après les spectres en phase gazeuse que nous avons mesurés, le groupement pyrène inclus dans la molécule de MPVP non complexée possède des pics d'absorption vers 540 et 590 nm. Il y a donc un décalage considérable vers le rouge. Ce décalage s'explique à la fois par la conjugaison du pyrène avec le pyridinium via l'alcène dans le MPVP et par la présence de la charge positive sur l'azote.

Lorsque le MPVP est complexé avec un éther-couronne, les maxima d'absorption du pyrène se situent vers 460 et 500 nm. La complexation du MPVP avec les éthers-couronne induit donc un décalage vers le bleu. Cela peut s'expliquer par le fait que l'éther-couronne solvate la charge positive portée par l'azote. En comparant avec l'absorption du pyrène seul, le décalage vers le rouge induit par la charge positive est donc grandement diminué et on retrouve les maxima d'absorption pour des longueurs d'onde plus faibles que dans la molécule de MPVP non complexée. Cependant l'effet de la conjugaison du pyrène avec le reste de la molécule est toujours présent, c'est pourquoi on ne retrouve pas pour autant les maxima d'absorption au même niveau que ceux mesurés pour le pyrène seul.

B. Influence de la présence de benzènes sur l'éther couronne

Sur la figure 5, il est possible de comparer les spectres optiques du MPVP et les spectres optiques des complexes avec des éthers couronnes dont la taille de la cavité est identique (18C6), mais comportant un, deux ou aucun benzène. Ceci nous permet de discuter l'effet de la présence des benzènes sur les maxima d'absorption ainsi que sur le taux de photo-isomérisation.

Effet sur les maxima d'absorption

Les spectres de tous les systèmes présentés sur la figure 4 ont la même allure. La bande d'absorption et les deux maxima se situent aux mêmes longueurs d'onde sur tous les complexes 18C6, indifféremment de la présence et du nombre de benzène sur l'éther couronne. La présence de benzènes sur les éthers couronnes n'influence donc pas l'allure des spectres optiques des différents complexes.

Effet sur le taux de photo-isomérisation

Sur le spectre du MPVP non complexé, le taux de photo-isomérisation au niveau des maxima d'absorption atteint 20%, pendant les 60 ms d'irradiation laser. Lorsque le MPVP est complexé à un éther couronne, le taux de photo-isomérisation au niveau des nouveaux maxima d'absorption double alors, pour atteindre les 40%, dans le cas de l'éther couronne 18C6. La présence d'un benzène sur l'éther couronne diminue ce taux, pour revenir dans les 20%. Si le nombre de benzène augmente, le taux de photo-isomérisation n'est pas changé. La complexation avec un éther couronne favorise donc l'isomérisation trans $\rightarrow$ cis. L'observation d'une diminution du taux d'isomérisation en présence du benzène sur l'éther-couronne pourrait être due à la stabilisation de l'isomère trans par ce benzène, ce qui ramène le taux de photo-isomérisation à celui de la molécule de MPVP seule. Lorsque plusieurs benzènes sont situés sur l'éther couronne, le système n'est pas plus stable.

On en déduit donc que la présence de l'éther couronne favorise la conformation cis du MPVP, augmentant donc le taux de photo-isomérisation. En revanche, lorsqu'il y a des benzènes sur l'éther-couronne, la conformation trans est stabilisée, probablement par recouvrement entre le pyrène et le cycle du benzène. Des calculs sont en cours pour confirmer ou infirmer cette explication.

C. Influence de la taille de la cavité de l'éther couronne

Sur la figure 6, on compare les spectres optiques du MPVP avec ceux des complexes avec des éthers couronnes ayant des cavités de tailles croissantes : DB18C6 et DB24C8.

Comme expliqué ci-dessus, pour les spectres optiques de tous les complexes de MPVP avec des éthers-couronne, le taux de déplétion est plus important que le taux de photo-isomérisation, la différence entre les deux s'expliquant par la dissociation du complexe. Pour les complexes dont la cavité est petite (18C6) la différence entre les deux taux représente environ 15% du signal du complexe trans (mesuré laser off), et la présence de benzène n'influe pas sur cet écart. En revanche, dans le cas de l'éther-couronne DB24C8, cet écart augmente, et la dissociation du complexe représente environ 25% du signal du complexe trans, laser éteint. Cela signifie que lorsque la taille de la cavité de l'éther-couronne augmente, les liaisons maintenant le MPVP dans la cavité sont plus faibles et le taux de dissociation augmente.

Effet sur les maxima d'absorption

Comme décrit précédemment, la complexation du MPVP avec un éther couronne induit un décalage du spectre optique vers le bleu. Ainsi, le spectre du complexe DB18C6 comporte une bande entre 420 et 530 nm avec des maxima à 460-470 nm et 490-500 nm. Le MPVP est ensuite complexé avec un éther couronne dont la cavité est plus large (DB24C8). Le spectre optique du nouveau système présente une bande entre 420 et 200 nm avec des maxima à 410 et 470 nm. L'augmentation de la cavité de l'éther couronne augmente donc le décalage vers le bleu.

Une hypothèse pour expliquer cela est que l'éther couronne solvate la charge positive en se pliant autour de l'azote [8]. En effet, le groupement méthyl est de trop grande taille pour que l'éther-couronne puisse encercler l'azote. De ce fait, lorsque la taille de la cavité augmente, le nombre d'atomes d'oxygène augmente également et la solvation de la charge pourrait être plus importante, ce qui augmenterait le décalage vers le bleu du spectre optique. Des calculs sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

Effet sur le taux de photo-isomérisation

Pour le MPVP libre ou complexé avec l'éther couronne DB18C6, les taux de photo-isomérisation au niveau des maxima d'absorption sont équivalents (20%). Lorsque le MPVP est complexé avec un éther ayant une cavité plus large, les interactions entre le MPVP et les atomes d'oxygène de la cavité sont plus faibles. Cependant, le taux de photo-isomérisation n'est pas changé. L'isomère trans est donc stabilisé par l'interaction avec le benzène, et la taille de la cavité n'a alors que peu d'influence sur l'isomérisation.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré la possibilité de faire de la photo-isomérisation sur des isomères spécifiquement sélectionnés, sur l'appareil de mobilité ionique que nous avons développé. Des spectres d'action de photo-isomérisation (spectres PISA) ont été mesurés pour différents systèmes. L'appareil laser-IMS a ainsi permis d'avoir accès au taux d'isomérisation de complexes non covalents. Cette information ne peut être obtenue en solution, du fait de l'équilibre entre la formation et la dissociation des complexes. En phase gazeuse, il est possible d'isoler les molécules complexées des molécules non complexées. De plus, nous pouvons grâce à l'appareil laser-IMS mesurer directement la photo-isomérisation du système, faisant ainsi la différence entre l'absorption conduisant à une fragmentation ou une dissociation du complexe de l'absorption conduisant à l'isomérisation du système.

De cette manière nous avons pu étudier l'influence sur la photo-isomérisation de la complexation de la molécule de 1-méthyl-4-[2-(1-pyrenyl)vinyl]pyridinium avec différents éthers couronne. Les deux paramètres étudiés étaient la taille de la cavité et la présence de benzène sur l'éther couronne. D'après les résultats obtenus, la complexation de la molécule dans la cavité de l'éther couronne semble favoriser la réaction de photo-isomérisation. La taille de la cavité ne semble pas avoir beaucoup d'influence sur le taux de photo-isomérisation. A l'inverse, la présence de benzènes sur l'éther couronne tend à diminuer le taux de photo-isomérisation du système.

Afin de comprendre les mécanismes d'interaction du 1-méthyl-4-[2-(1-pyrenyl)vinyl]pyridinium avec les éthers couronne et avec les benzènes, des calculs et des simulations des structures par modélisation moléculaire sont en cours.

1. Baer, T. and R.C. Dunbar, *Ion Spectroscopy: Where Did It Come From; Where Is It Now; and Where Is It Going?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(5): p. 681-693.
2. Adamson, B.D., et al., *Changing the shape of molecular ions: photoisomerization action spectroscopy in the gas phase*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2013. **15**(24): p. 9540-9548.
3. Adamson, B.D., et al., *Photoisomerization Action Spectroscopy of the Carbocyanine Dye DTC⁺ in the Gas Phase*. J. Phys. Chem. A, 2013. **117**(50): p. 13319-13325.
4. Coughlan, N.J.A., et al., *Photoisomerization action spectrum of retinal protonated Schiff base in the gas phase*. J. Chem. Phys., 2014. **140**(16): p. -.
5. Coughlan, N.J.A., et al., *Ion Mobility Unlocks the Photofragmentation Mechanism of Retinal Protonated Schiff Base*. J. Phys. Chem. Lett., 2014. **5**(18): p. 3195-3199.
6. Coughlan, N.J.A., et al., *Retinal shows its true colours: photoisomerization action spectra of mobility-selected isomers of the retinal protonated Schiff base*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2015. **17**(35): p. 22623-22631.
7. Thöny, A. and M.J. Rossi, *Gas-phase UV spectroscopy of anthracene, xanthone, pyrene, 1-bromopyrene and 1,2,4-trichlorobenzene at elevated temperatures*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1997. **104**(1-3): p. 25-33.
8. Choi, C.M., et al., *Ultraviolet Photodepletion Spectroscopy of Dibenzo-18-Crown-6-Ether Complexes with Alkali Metal Cations*. The Journal of Physical Chemistry A, 2009. **113**(29): p. 8343-8350.

Chapitre 4 :

Photo-détachement d'électron sur un peptide marqué : spectroscopie optique sur des isomères sélectionnés

I.	Introduction.....	100
II.	Etude de l'éosine Y	101
A.	Spectroscopie en solution	101
B.	Spectroscopie d'action en phase gazeuse.....	102
III.	Etude du peptide marqué	106
A.	Etude des états de charge 5- et 3-.....	108
A.1.	L'état de charge 5- : $[\text{Eo-P}]^{5-}$	108
A.2.	L'état de charge 3- : $[\text{Eo-P}]^{3-}$	109
B.	Etude de l'état de charge 4-	110
B.1.	Activation par collisions.....	111
B.2.	Spectres optiques des différents conformères	113
B.3.	Irradiation du conformère C activé par collisions	115
IV.	Comparaison des résultats expérimentaux aux calculs théoriques	116
A.	Structures théoriques de l'état de charge 4-	116
B.	Relation entre CCS et sites de protonation	117
C.	Interconversion entre les isomères.....	119
V.	Conclusion	120

I. Introduction

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'étude de réactions photo-induites. Ceci présente un intérêt au niveau biologique car de nombreuses réactions biochimiques sont induites par la lumière. Ces réactions interviennent dans des processus tels que la vision ou la photosynthèse. La réaction photo-induite a souvent lieu sur un cofacteur organique lié à une protéine. Ce cofacteur absorbe l'énergie lumineuse, et peut induire une réaction d'isomérisation de la protéine, ou une réaction de transfert d'électron ou de proton intra ou inter-protéines. L'étude des transferts de charge photo-induits présente donc un important intérêt biologique [1-3].

Dans ce chapitre, nous utiliserons le couplage IMS-laser-IMS, présenté dans le chapitre 2 (Développement instrumental) pour sonder la relation entre la conformation et les propriétés optiques d'un système moléculaire. Nous nous appuierons pour cela sur la possibilité offerte par cet appareil de réaliser des mesures de spectroscopie d'action sur des isomères sélectionnés en mobilité, et d'obtenir ainsi les spectres optiques caractéristiques de chaque isomère.

Le système modèle choisi pour cette étude est composé d'un peptide chargé négativement lié de manière covalente à un chromophore absorbant dans le visible. Une étude préliminaire des propriétés optiques du chromophore seul a montré que son mécanisme de désexcitation principal après absorption d'un photon est le détachement d'un électron, qu'il est aisé de suivre par spectroscopie d'action. L'efficacité de ce processus s'avère fortement dépendant de l'état de charge du chromophore [4]. Le système complet peptide-chromophore a ensuite été étudié par des expériences de mobilité ionique en tandem et des mesures de spectroscopie d'action sur des ions sélectionnés en mobilité. Les résultats ont été interprétés à l'aide de simulations moléculaires. Nous avons pu mettre en évidence l'influence du schéma de protonation du système sur ses propriétés optiques ainsi que la possibilité de modifier ces propriétés en induisant un transfert de proton intramoléculaire.

Cette étude montre l'intérêt de combiner mobilité ionique en tandem et spectroscopie pour l'étude de réactions de transfert de charge photo induites. Elle a fait l'objet d'une publication donnée en référence [5].

II. Etude de l'éosine Y

A. Spectroscopie en solution

L'éosine Y est un dérivé de la fluorescéine qui a pour formule brute $C_{20}H_8Br_4O_5$. Il s'agit d'un chromophore acide qui co-existe en solution sous trois formes différentes représentées sur la figure 1 et qui correspondent aux différents états de protonation des sites OH et COOH. Les propriétés optiques de l'éosine Y en solution ont été assez bien caractérisées [6-9]. La figure 2 reproduit les spectres mesurés en solution par Batistela *et al.* pour différents pH [7]. Ils montrent trois maxima d'absorption dans le domaine visible à 470, 519 et 515 nm, attribués respectivement aux trois formes, notées [Eo], [Eo-H]⁻ et [Eo-2H]²⁻ sur la figure 1.

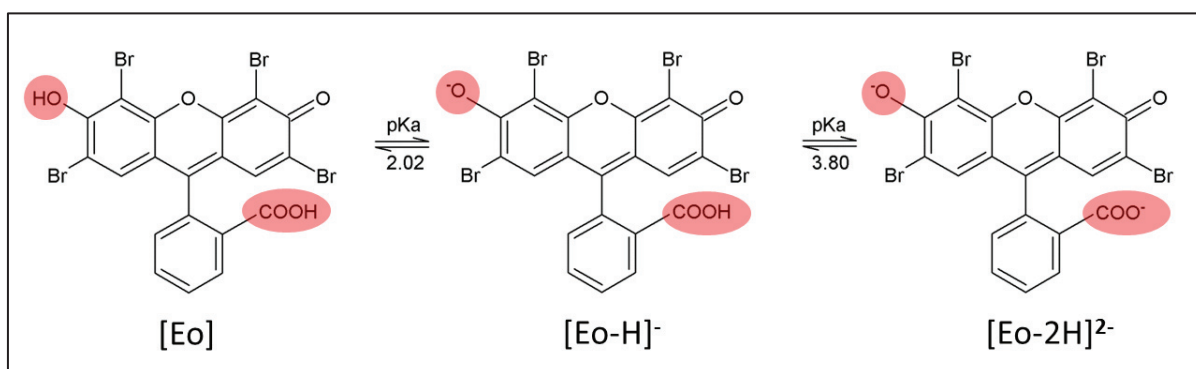


Figure 1. Equilibre protolytique de l'éosine Y.

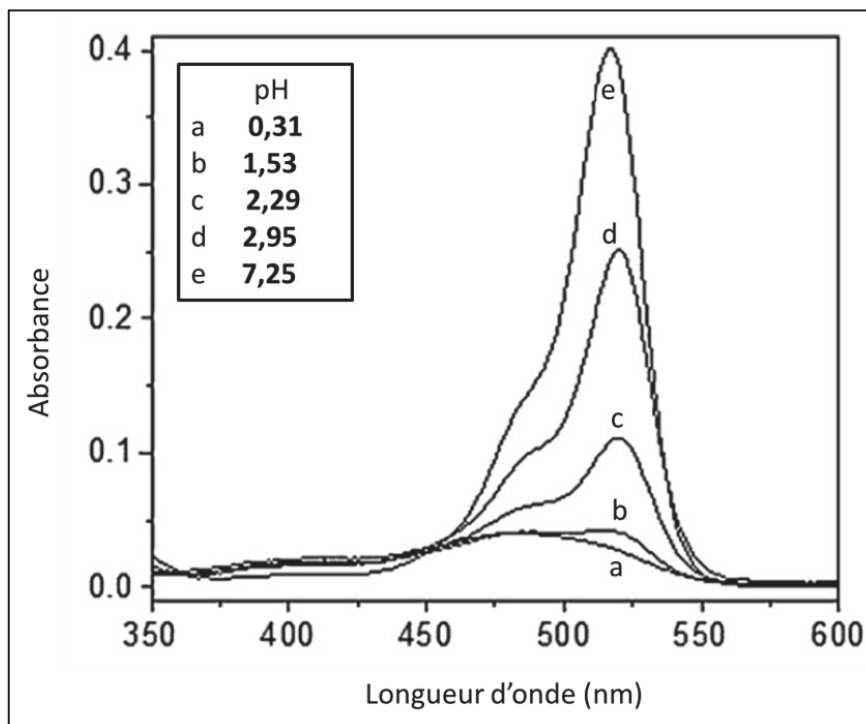


Figure 2. Spectres en solution de l'éosine, mesurés à différents pH, d'après Batistela *et al* [7].

B. Spectroscopie d'action en phase gazeuse

Préparation d'échantillon

Une solution à 100 μM d'éosine Y dans du méthanol a été préparée par dissolution du chromophore déshydraté commandé auprès de la société Sigma-Aldrich (référence E6003-25G). Cette solution a été directement injectée dans la source électro-spray de l'appareil utilisé en mode négatif.

Mesure des spectres d'action en piège

Des spectres de référence en phase gazeuse ont d'abord été mesurés dans un piège à ions linéaire (LTQ) modifié pour être couplé à un laser OPO nanoseconde. Le dispositif correspondant est décrit en détail dans la référence [10].

Sur les spectres de masse obtenus pour l'éosine Y, on distingue deux états de charge : l'éosine mono chargée, notée $[\text{Eo-H}]^-$ et détectée à m/z 646, et l'éosine dichargée, notée $[\text{Eo-2H}]^{2-}$ et détectée à m/z 321. Un spectre d'action a pu être obtenu pour chacune de ces espèces en isolant les ions de m/z correspondant puis en les irradiant à l'aide d'une impulsion laser avant d'analyser les produits de cette irradiation. Dans le cas de l'ion deux fois chargé, la seule voie de désexcitation observée est le détachement d'un électron. Dans le cas de l'ion monochargé, on observe une faible déplétion lors de l'irradiation qui peut également être attribuée au détachement d'un électron. La dépendance en longueur d'onde de ces effets a pu être évaluée en enregistrant des spectres de photo-fragmentation en fonction de la longueur d'onde du laser. Les spectres d'action obtenus sont tracés sur la figure 3. Ils représentent le taux de photo-détachement en fonction de la longueur d'onde, normalisés par la fluence du laser selon la formule suivante :

$$\text{Taux de déplétion} \propto \log \left(\frac{I_{\text{parent}}}{I_{\text{totale}}} \right) / \varphi \quad \text{Eq. 1}$$

Avec I les intensités des pics de l'ion parent et de l'ensemble des pics de l'ion parent et fragments lorsque les ions sont irradiés, et φ la fluence du laser à une longueur d'onde donnée.

Ces spectres, ont une allure similaire à celle des spectres en solution mesurés par Batistela *et al.* : l'absorption de l'éosine mono-chargée est très faible par rapport à celle de l'éosine di-chargée. De plus, la position des maxima d'absorption n'est pas significativement différente en phase gazeuse et en solution.

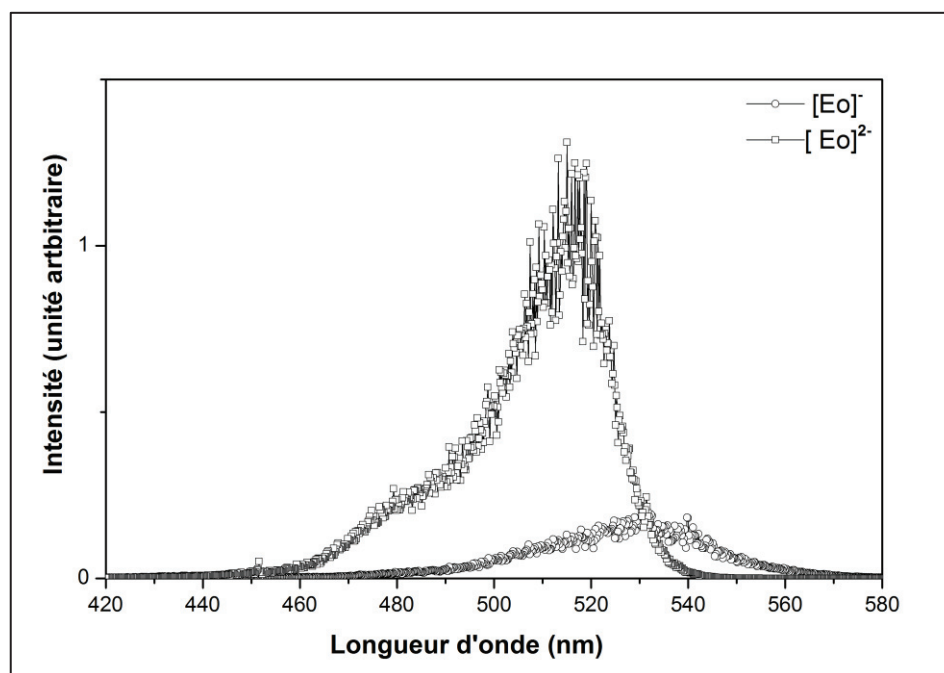


Figure 3. Spectres d'action de l'éosine Y, mono et dichargée.

Mesure des spectres d'action dans l'appareil tandem-IMS

Le même type d'étude peut être réalisé à l'aide de l'appareil décrit dans le chapitre 2 (développement instrumental). La procédure est cependant sensiblement différente car la sélection de l'ion parent se fait par mobilité ionique. Dans le cas de l'éosine Y la sélection est relativement aisée, car les deux espèces présentes ont des vitesses de diffusion très différentes (voir chapitre 2). En effet, les ions $[\text{Eo-2H}]^{2-}$ ont une CCS similaire à celle des ions $[\text{Eo-H}]^{1-}$ (148 et 139 Å², respectivement). La différence d'état de charge (du simple au double) se traduit donc par une force d'entraînement double et une vitesse de diffusion presque deux fois supérieure.

Les ions peuvent ainsi être sélectionnés après une première séparation par mobilité ionique, puis piégés et irradiés entre les deux tubes de dérive. Les produits d'irradiation sont ensuite séparés dans le deuxième tube de dérive, puis sont analysés par spectrométrie de masse. La figure 4 b représente une carte bidimensionnelle IMS/MS obtenue après sélection du temps de diffusion correspondant à l'ion $[\text{Eo-2H}]^{2-}$ après le premier tube de mobilité. Aucune trace d'ions $[\text{Eo-H}]^{1-}$ n'y est visible. Les ions sélectionnés sont irradiés à 488 nm avant injection dans le second tube avec le laser continu (Cobolt MLDTM, 06-01 Series). On obtient la carte de la Figure 4 a sur laquelle des ions sont visibles au voisinage de m/z 646. Une analyse du massif isotopique des ions observés (voir figure 5) montre que ceux-ci correspondent bien à l'espèce radicalaire. En effet, le massif isotopique de l'espèce photo-induite (figure 5 a) est comparé à celui de $[\text{Eo-H}]^{1-}$ (voir figure 5 b). Les deux massifs isotopiques sont similaires, bien que celui de l'espèce photo-induite soit décalé d'une unité m/z . L'allure particulière des massifs isotopiques est expliquée par la présence de quatre bromes sur la molécule d'éosine. Les deux espèces détectées à m/z 645 et 644, de même état de charge, possèdent

une différence de masse correspondant à un proton. La différence entre les deux espèces n'étant que d'un proton et d'un électron, sur un système de petite taille cela n'a que peu d'influence sur la section efficace de collision. C'est pourquoi les CCS de $[\text{Eo-H}]^-$ et $[\text{Eo-2H}]^{\bullet-}$ sont proches et se trouvent réciproquement dans la barre d'erreur l'une de l'autre. La même expérience est effectuée en sélectionnant et en irradiant l'éosine mono-chargée. Aucune diminution du signal n'est alors observée. Il n'y a pas de détachement d'électron photo-induit sur l'éosine mono-chargée, dans ces conditions expérimentales.

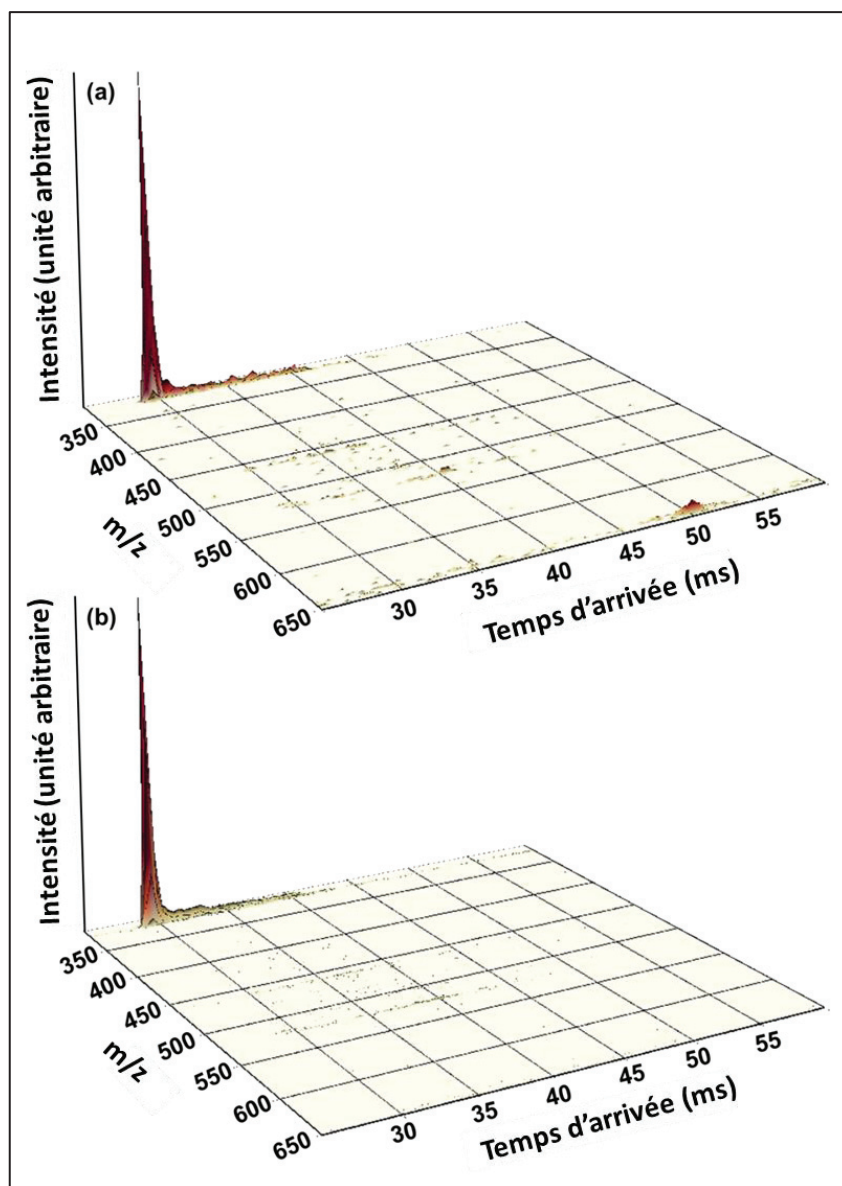


Figure 4. Carte IMS-MS de la sélection de $[\text{Eo-2H}]^{2-}$, (a) avec et (b) sans irradiation laser (570 V sur le tube de mobilité, $p=11.6$ Torr, 10 ms d'irradiation à 488 nm).

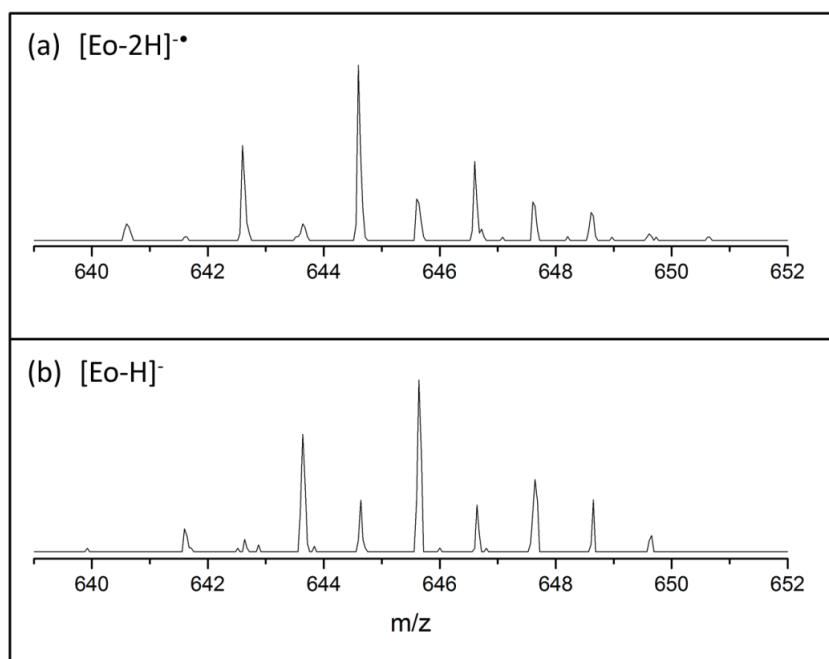


Figure 5. Massifs isotopiques (a) de l'espèce photo-induite et (b) de $[Eo-H]^-$.

Le spectre d'action obtenu sur l'appareil laser-IMS (voir figure 6) est mesuré grâce à un laser OPA/OPO picoseconde (PG400, EKSPLA), injecté dans le tube de mobilité via la fenêtre située à côté de la source électro-spray. Le tube de mobilité est équilibré dans l'hélium à 12 Torr, à une température de 300 K. Les ions sont irradiés pendant 35 ms entre les deux tubes de mobilité et les spectres sont mesurés en suivant l'évolution du taux de déplétion des ions en fonction de la longueur d'onde du laser. La longueur d'onde du laser varie de 420 à 570 nm. Le taux de déplétion pour chaque longueur d'onde est obtenu par la formule suivante :

$$\text{Taux de déplétion} \propto -\log\left(\frac{I_0}{I}\right)/\varphi \quad \text{Eq. 2}$$

Avec I_0 et I les intensités des pics obtenus respectivement sans et avec laser, et φ la fluence du laser pour une longueur d'onde donnée.

Le spectre optique de $[Eo]^{2-}$ est donné en figure 6. Ce spectre optique est similaire à celui obtenu sur l'appareil LTQ avec le laser nano-seconde (voir figure 3).

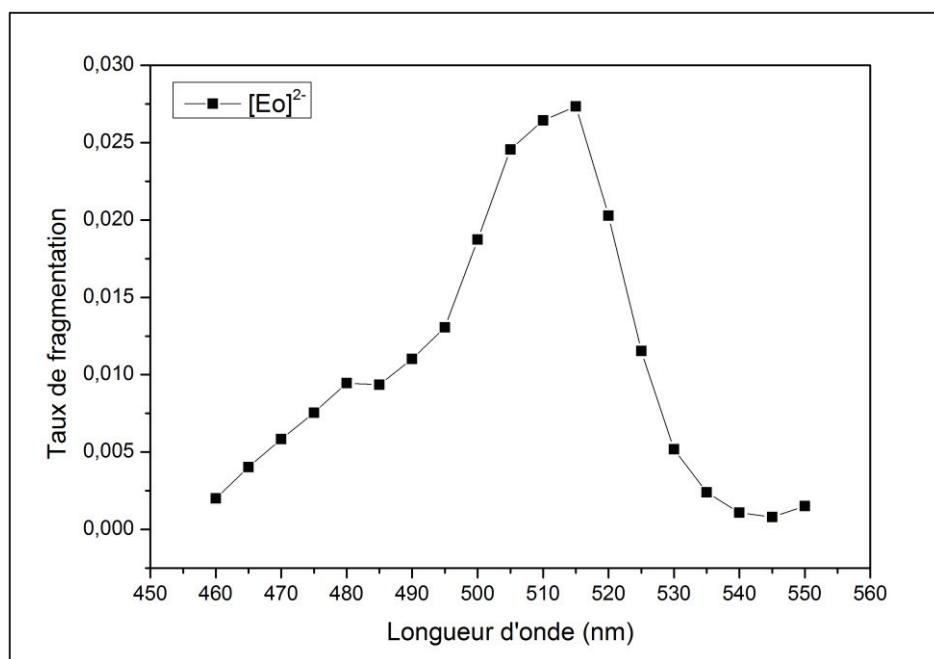


Figure 6. Spectre optique de l'éosine 2- mesuré sur l'appareil laser-IMS.

III. Etude du peptide marqué

Le système modèle utilisé pour cette étude est composé d'un peptide de séquence **CAAEAADAA**, sur lequel un chromophore, l'éosine Y, a été lié de manière covalente. La séquence du peptide sur lequel a été liée l'éosine a été choisie car elle comporte plusieurs groupements acides (sur les résidus Glutamate, Acide Aspartique, et en C-terminal). Ainsi le système peptide-chromophore, que nous noterons [Eo-P], présente un nombre relativement élevé de sites acides de pKa comparables (voir tableau 1 et figure 7). On peut donc s'attendre à la coexistence de différents schémas de protonation, et donc à de possibles transferts de proton entre les différents sites. D'autre part, la cystéine N-terminale sert de site de marquage par le chromophore. Nous avons utilisé pour cela un dérivé d'éosine Y comportant une fonction maléimide qui réagit spécifiquement sur les fonctions thiol.

	Eosine	Acide Aspartique	Acide Glutamique	Alanine C-terminale
pKa	2.02 3.80	3.65	4.25	2.33

Tableau 1. Valeurs des pKa de l'éosine [7] et des groupements acides des acides aminés du peptide[11].

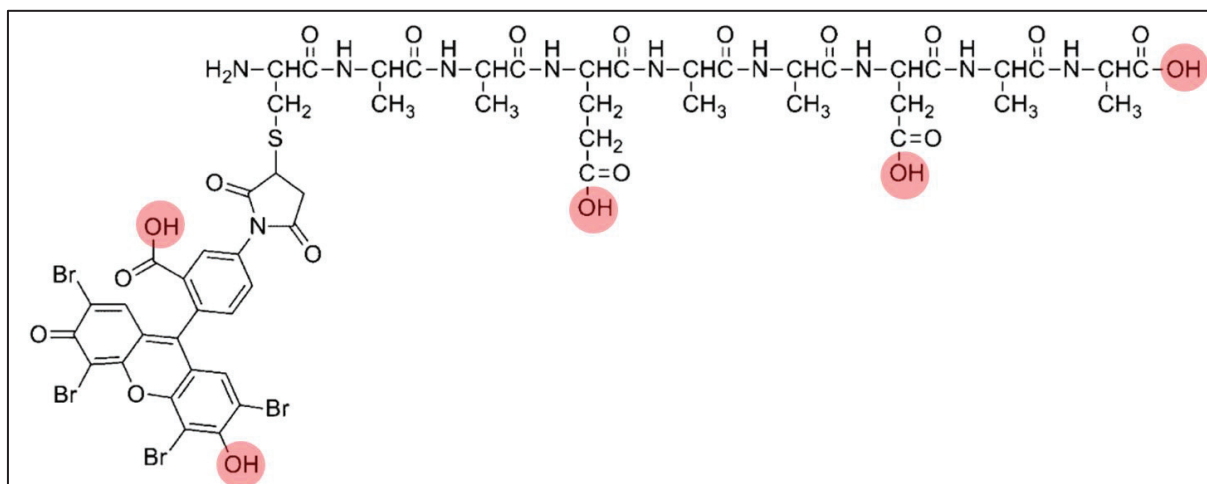


Figure 7. Structure chimique du peptide marqué. Les sites acides sont marqués en rouge.

La solution de peptide marqué [Eo-P] à une concentration de 10 μM est injectée dans la source électro-spray. Le spectre de masse obtenu est présenté en figure 8. Sur ce dernier, on détecte trois états de charge : $[\text{Eo-P}]^{5-}$, $[\text{Eo-P}]^{4-}$ et $[\text{Eo-P}]^{3-}$, étiquetés sur le spectre. Les autres pics présents sur le spectre de masse correspondent à des adduits de sodium et de potassium sur le système.

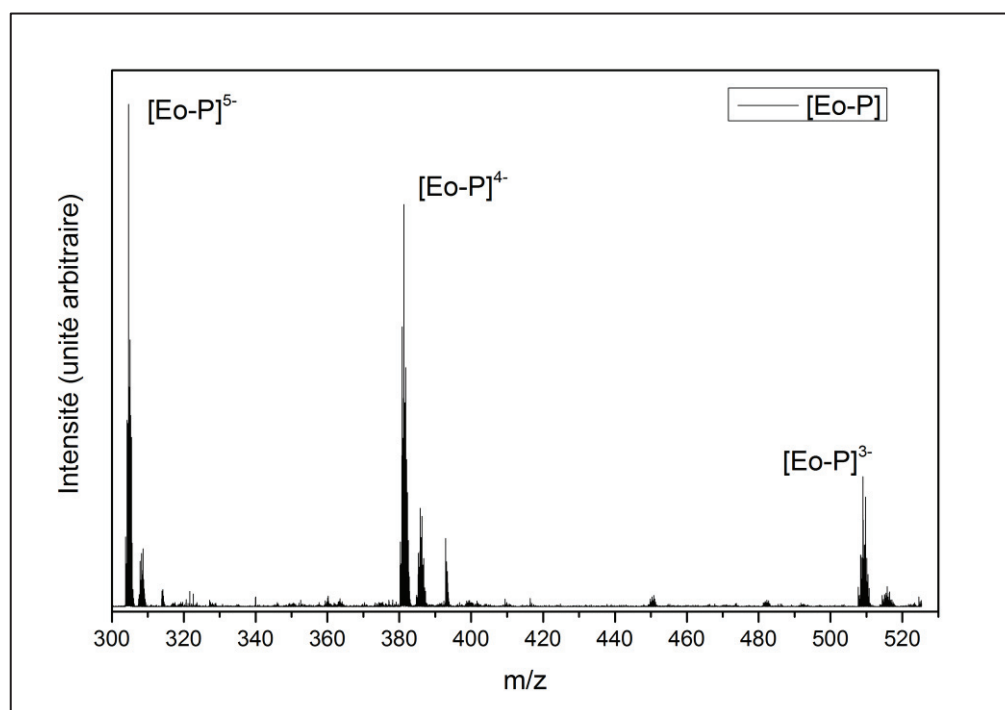


Figure 8. Spectre de masse du système [Eo-P].

A. Etude des états de charge 5- et 3-

A.1. L'état de charge 5- : $[\text{Eo-P}]^{5-}$

Dans un premier temps, on s'intéresse au peptide marqué chargé 5 fois. Tous les sites acides du système sont donc a priori déprotonnés : trois charges négatives sont portées par le peptide et deux charges négatives par l'éosine (voir figure 7). Sur le profil de mobilité ionique (voir figure 9.a) on distingue deux populations d'isomères, notées A et B. Lorsque chacune de ces familles d'isomères est sélectionnée en mobilité (voir figure 9.b) et irradiée entre les deux tubes de mobilité, on observe une diminution du signal du système $[\text{Eo-P}]^{5-}$ et l'apparition de l'espèce radicalaire $[\text{Eo-P}]^{4\bullet-}$, ce qui montre un détachement d'électron photo-induit au niveau de l'éosine.

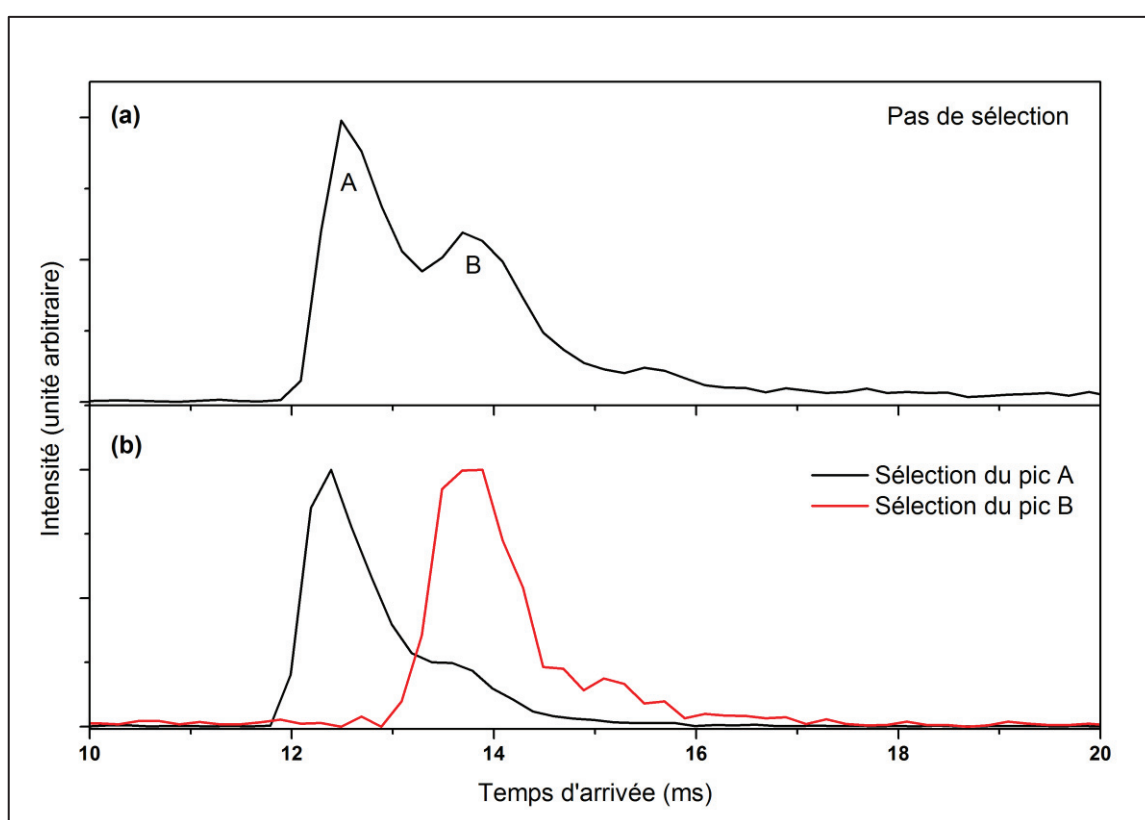


Figure 9. Profils de mobilité de $[\text{Eo-P}]^{5-}$ (a) sans sélection IMS et (b) sélection des conformères A et B.

En mesurant le taux de photo-déplétion de l'espèce $[\text{Eo-P}]^{5-}$, on peut tracer les spectres optiques associés, donnés en figure 10.a. Les spectres optiques du conformère A et du conformère B ont la même allure. Il y a cependant un décalage d'une dizaine de nanomètres entre les maxima de ces spectres. Ceci peut s'expliquer par le fait que les familles A et B représentent deux conformations différentes du système, et les interactions entre le chromophore et les charges environnantes, portées par le peptide, sont différentes. Cela génère un champ électrostatique autour du chromophore qui diffère entre les deux conformations A et B. Ces spectres optiques, spécifiques de chaque population, sont comparés au spectre optique global de l'espèce, obtenu sur un appareil LTQ

couplé à un laser nano-seconde [10], donné en figure 10.b. La somme des spectres d'action reproduit bien le spectre d'absorption mesuré sur LTQ. Il est donc possible de reproduire ces résultats sur l'appareil de mobilité ionique, et de séparer les spectres optiques de chacune des familles d'isomères. De plus, ces spectres optiques sont similaires à celui de l'éosine dichargée seule. Cela confirme l'hypothèse que, sur le système $[\text{Eo-P}]^{5-}$, l'éosine est deux fois chargée.

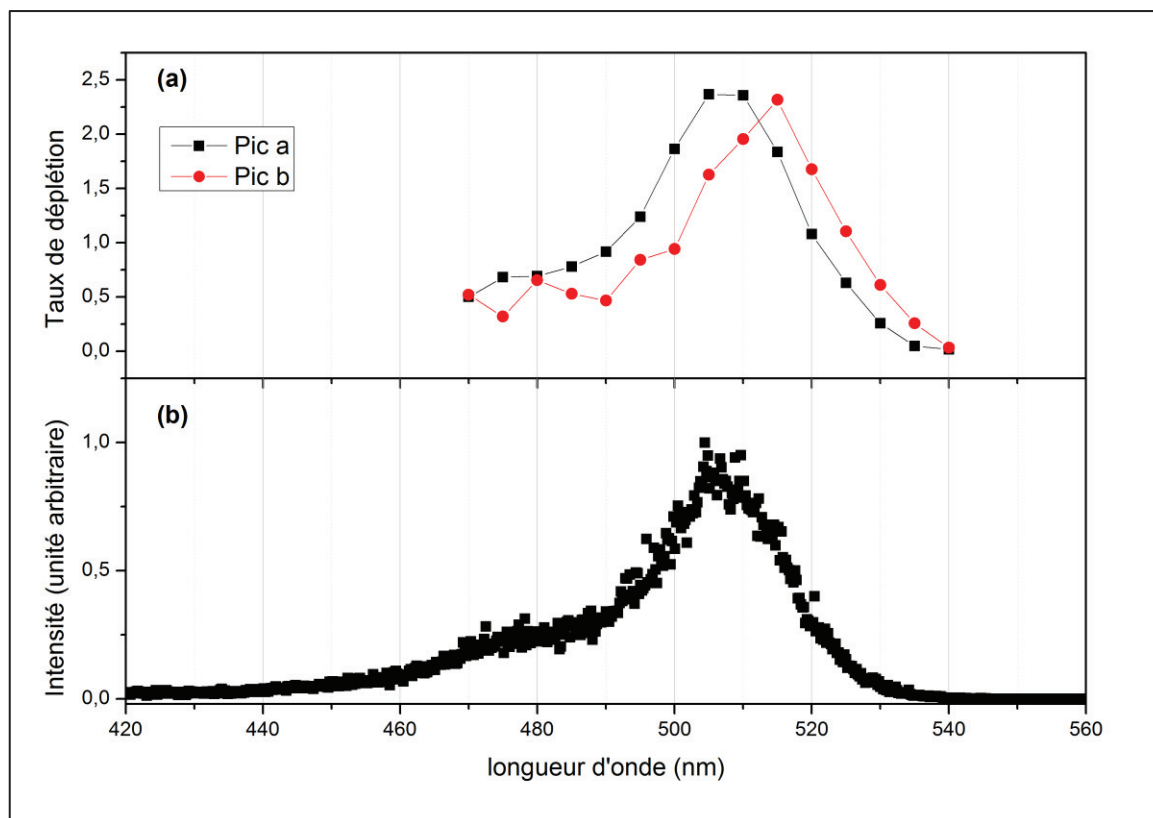


Figure 10. Spectres optiques de $[\text{Eo-P}]^{5-}$ (a) spectre d'action de la déplétion des différents conformères et (b) spectre optique sur LTQ.

A.2. L'état de charge 3- : $[\text{Eo-P}]^{3-}$

Dans l'espèce $[\text{Eo-P}]^{3-}$, les sites acides ne sont pas tous négativement chargés. D'après les valeurs des pK_a , on attend une charge sur l'éosine ($\text{pK}_a=2.02$) et une charge sur le groupement acide C-terminal ($\text{pK}_a=2.33$). La troisième charge peut être portée soit sur l'éosine, soit sur l'acide aspartique, dont les valeurs de pK_a sont proches (respectivement 3.80 et 3.65).

Le profil de mobilité du système $[\text{Eo-P}]^{3-}$ est mesuré et donné en figure 11. Sur celui-ci, on ne distingue qu'un seul pic en mobilité, ce qui montre qu'il n'y a pas de cohabitation de plusieurs isomères : on peut donc s'attendre à un seul schéma de protonation du système en phase gazeuse. Le système $[\text{Eo-P}]^{3-}$ est dans un deuxième temps isolé en mobilité et irradié entre les deux tubes de mobilité. Aucune déplétion du signal de $[\text{Eo-P}]^{3-}$ n'est mesurée, et aucune espèce radicalaire $[\text{Eo-P}]^{2\bullet}$ n'est détectée, pour différentes longueurs d'onde comprises entre 470 et 515 nm. Il n'y a donc pas

de détachement d'électron photo-induit sur l'éosine. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour l'éosine mono-chargée seule, pour laquelle aucun détachement d'électron n'a été observé dans l'appareil laser-IMS, et dont l'absorption mesurée sur l'appareil LTQ (figure 3) est très faible. On en conclut que sur le système $[\text{Eo-P}]^{3-}$, l'éosine est a priori mono-chargée. Par conséquent, la répartition des charges la plus probable est une charge négative sur l'éosine, et deux charges négatives sur le peptide, portées par l'acide aspartique et le groupement C-terminal de l'alanine. Les deux autres sites acides sont protonés.

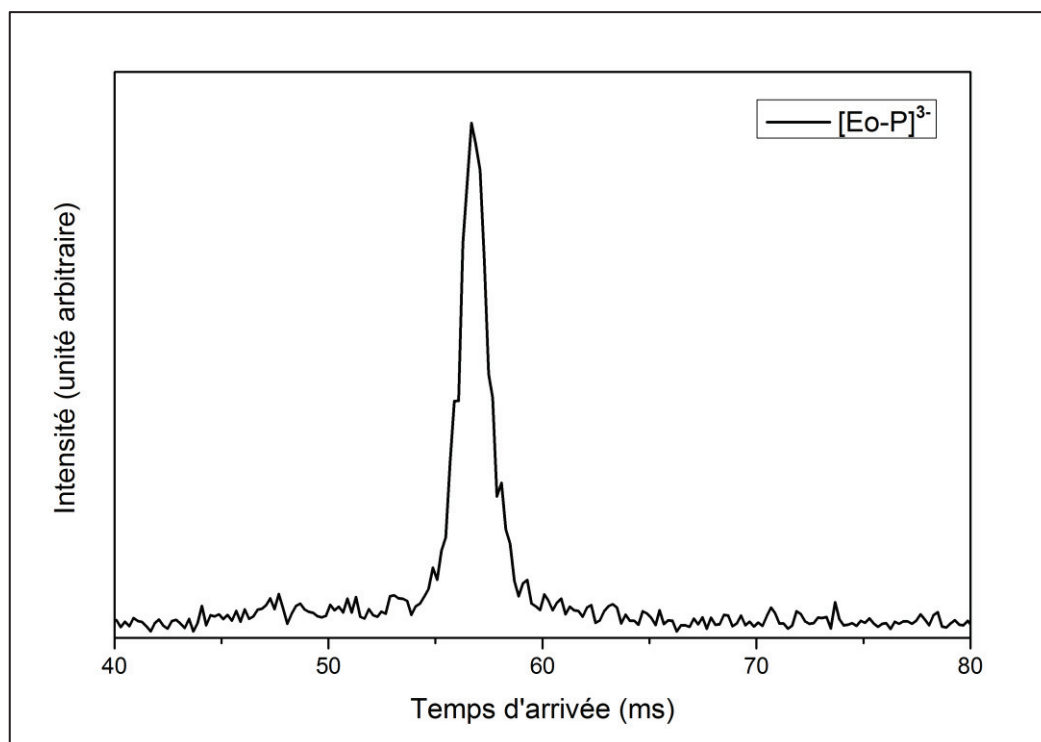


Figure 11. Profil de mobilité ionique de $[\text{Eo-P}]^{3-}$.

En comparant les résultats obtenus pour le système $[\text{Eo-P}]^{5-}$ et $[\text{Eo-P}]^{3-}$, on remarque qu'il existe entre ces systèmes la même différence qu'entre l'éosine Y mono et dichargée. On en déduit que c'est l'état de charge de l'éosine qui détermine les propriétés optiques du système.

B. Etude de l'état de charge 4-

Nous nous intéressons à présent à l'espèce quatre fois chargée $[\text{Eo-P}]^{4-}$. D'après les résultats précédents, l'espèce 5- comporte exclusivement une éosine deux fois chargée et l'espèce 3- une éosine mono-chargée. En revanche, pour l'espèce $[\text{Eo-P}]^{4-}$, on peut s'attendre à la coexistence de différents schémas de protonation, étant donné que seulement quatre de cinq sites acides sont chargés. Le profil de mobilité ionique de l'espèce $[\text{Eo-P}]^{4-}$ est montré sur la figure 12.a. Sur celui-ci, on peut distinguer trois pics, notés A, B et C dans l'ordre des temps d'arrivée croissants, dont la position

est marquée par des gaussiennes (en pointillé). On estime qu'il s'agit bien uniquement de 3 pics à partir de la largeur attendue pour un seul pic.

B.1. Activation par collisions

Avant de mesurer les spectres optiques de ces conformères, leur potentielle interconversion est étudiée par activation par collisions. Grâce à la configuration IMS en tandem, il est en effet possible d'isoler les différentes familles conformationnelles d'un même état de charge et d'étudier la possibilité d'interconversion entre elles par activation par collisions [12, 13].

Dans un premier temps, chacune des familles de conformère (A, B et C) de l'espèce $[\text{Eo-P}]^{4-}$ est isolée, et son profil de mobilité est mesuré (voir les courbes noires sur la figure 12 b, c, d). Pour cela, les ions sont séparés dans le premier tube de mobilité, puis l'ouverture de la porte de sélection à la fin du tube est réglée de manière à ne laisser passer que les ions dont le temps de dérive correspond à l'isomère que l'on souhaite sélectionner. Dans un deuxième temps, chaque famille d'isomère sélectionnée est activée par collision dans l'entonnoir à ion situé entre les deux tubes de dérive, et le profil de mobilité de l'espèce activée est mesuré (voir les courbes rouges sur la figure 12 b, c, d). Pour cela, une différence de potentiel de 74 V est appliquée entre deux électrodes de l'entonnoir à ion, de manière à accélérer les ions et les activer par les collisions avec le gaz tampon, comme expliqué dans le chapitre 2 (développement instrumental). Pour les profils de mobilité des espèces non activées, une différence de potentiel de 4 V avait été appliquée entre ces mêmes électrodes. Il n'était pas possible que cette différence de potentielle soit nulle (ce qui aurait assuré de ne pas activer les ions) car les ions n'étaient alors pas ou peu transmis. Les 4 V appliqués représentent donc le minimum d'énergie nécessaire à la transmission des ions, tout en limitant le plus possible leur activation. La comparaison des profils de mobilité avec et sans activation permet d'observer les potentielles interconversions entre les familles de conformères.

Ainsi, dans une première expérience, la fenêtre de sélection est réglée pour ne laisser passer que les ions correspondant au temps de dérive de la famille conformationnelle A (courbe noire de la figure 12 b). On observe alors que, même à faible potentiel d'activation (4 V), une partie significative des ions est détectée au temps d'arrivée du conformère B. Dans une deuxième expérience, la fenêtre de sélection est réglée pour ne laisser passer que les ions au temps d'arrivée du conformère B (courbe noire sur la figure 12 c). Des ions correspondant au temps d'arrivée de la famille conformationnelle A sont alors mesurés. Cette impossibilité d'isoler une seule de ces deux familles conformationnelles ne vient pas d'un problème sur la fenêtre de sélection. Il s'agit d'une conversion, soit des conformères A vers les conformères B (première expérience), soit des conformères B vers les conformères A (deuxième expérience) après la sélection, même sans potentiel d'activation. Ceci indique une isomérisation spontanée entre les deux familles dans les conditions expérimentales. Dans le cas de l'isomérisation A vers B, en augmentant le potentiel d'activation, on augmente le taux d'isomérisation. A l'inverse, dans le cas de l'isomérisation B vers A, le ratio des pics A et B ne varie pas lorsque le potentiel électrique est augmenté. Dans ces deux expériences, lorsqu'on active la

famille A ou la famille B, on obtient une distribution identique des deux familles. Ce ratio correspond donc à un équilibre d'interconversion entre les deux familles conformationnelles.

Enfin, dans une troisième expérience, la fenêtre de sélection est réglée pour ne laisser passer que la famille conformationnelle C (courbe noire sur la figure 12.d). On observe alors uniquement le conformère C à faible potentiel d'activation (courbe noire). Aucune isomérisation spontanée n'a donc lieu de C vers les autres familles conformationnelles. L'isomérisation n'est observée que pour un fort potentiel d'activation (courbe rouge), menant principalement au conformère B, et, dans une moindre mesure, au conformère A.

Ces données tendent à montrer que le conformère B est le plus stable, et qu'il y a une isomérisation spontanée entre A et B à température ambiante, tandis que plus d'énergie est nécessaire pour effectuer l'isomérisation de C vers A et B.

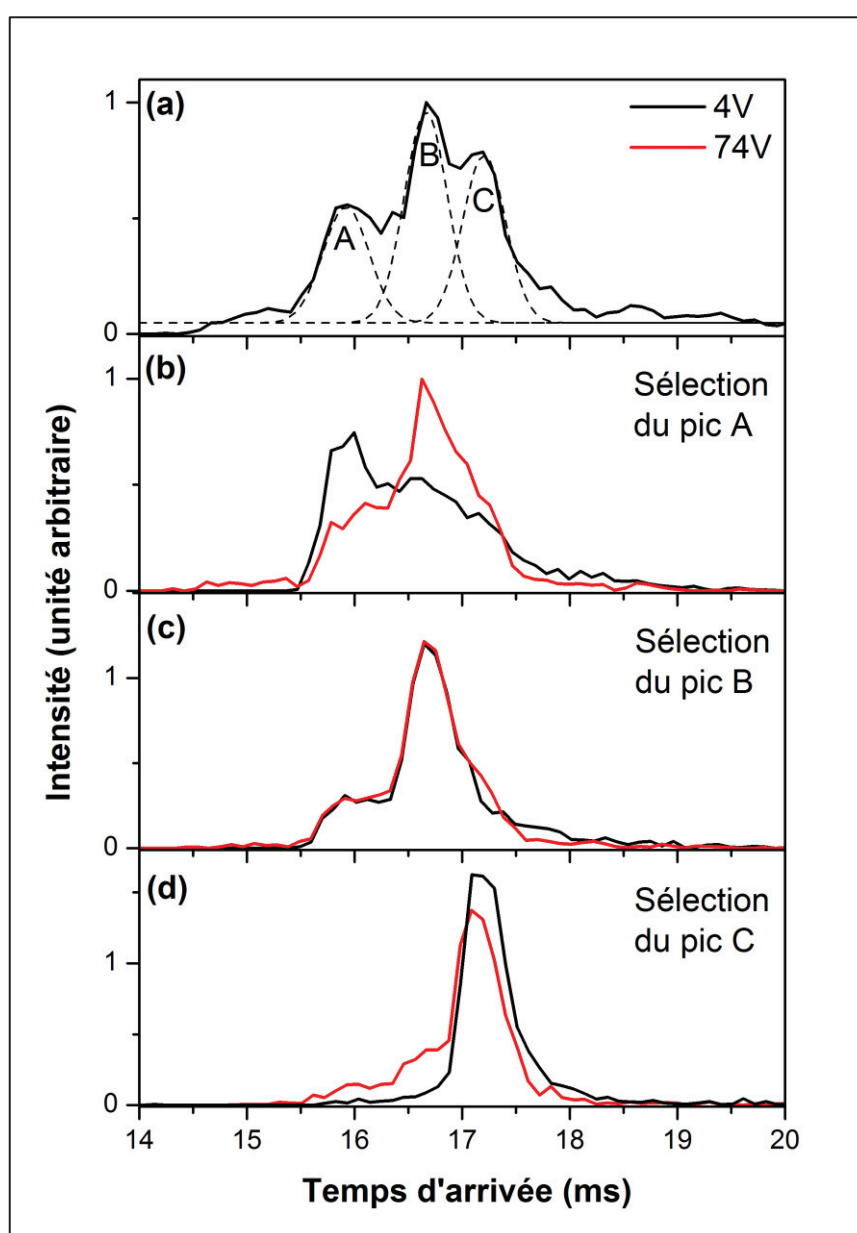


Figure 12. Profil de mobilité (a) de $[Eo-P]^{4-}$ sans sélection et (b), (c) et (d) sélection et activation respectivement des pics A, B et C.

B.2. Spectres optiques des différents conformères

Les spectres d'action spécifiques de chaque famille de conformères (figure 13 b et c) sont obtenus en irradiant les ions dans l'entonnoir intermédiaire, après la sélection de la population souhaitée à la fin du premier tube de mobilité. L'irradiation est faite à des longueurs d'onde comprises entre 420 et 570 nm pendant une durée de 15 ms. Pour mesurer les spectres d'action, il est possible soit de mesurer l'apparition de l'ion radicalaire, ce qui correspond uniquement au détachement d'électron photo-induit, soit de mesurer la déplétion de l'espèce irradiée, ce qui inclut le détachement d'électron, mais aussi d'éventuels autres mécanismes de désexcitation conduisant à la fragmentation de l'ion parent. Or, après irradiation, tous les conformères suivent le même mécanisme de relaxation : détachement d'un électron pour donner l'espèce radicalaire trois fois chargée $[\text{Eo-P}]^{3-\bullet}$. Ainsi, les spectres d'action, correspondant au détachement d'électron photo-induit sur chacune des populations peuvent être obtenus en calculant le taux de déplétion des conformères pour chaque longueur d'onde.

Comme les isomères A et B sont spontanément interconvertibles et qu'il n'est pas possible de les mesurer séparément, leurs spectres d'action sont mesurés en même temps. Le spectre ainsi obtenu (figure 13 b) présente une bande centrée à 510 nm, ainsi un épaulement à 475 nm. Le conformère C (figure 13 c), possède quant à lui un taux de déplétion très faible, qui se traduit sur le spectre optique par une bande large entre 460 et 540 nm. Les deux familles conformationnelles A et B, d'une part, et C, d'autre part, possèdent donc des spectres optiques très différents. Cela est en accord avec les résultats obtenus lors des expériences d'activation qui montraient une interconversion entre A et B mais pas avec C : on attend donc des propriétés différentes pour les deux groupes de familles conformationnelles.

Afin de comprendre la différence de ces spectres optiques, nous comparons ces spectres avec les spectres optiques des systèmes $[\text{Eo-P}]^{5-}$ (figure 13 a) et $[\text{Eo-P}]^{3-}$ (figure 13 d). Ces derniers ont été obtenus sur un appareil couplant un laser OPO nanoseconde sur un spectromètre de masse LTQ décrit dans la référence [10]. D'après les résultats présentés précédemment (section III.A. Etude des états de charge 3- et 5-), dans le cas de l'espèce $[\text{Eo-P}]^{5-}$, tous les sites potentiels du peptide et du chromophore sont déprotonés et le spectre obtenu correspond à l'absorption de l'éosine deux fois chargée. Dans le cas de l'espèce $[\text{Eo-P}]^{3-}$, le spectre obtenu correspond à l'éosine mono-chargée.

Le spectre optique des conformères A et B est similaire à celui de l'espèce $[\text{Eo-P}]^{5-}$, et le spectre du conformère C est similaire à celui de l'espèce $[\text{Eo-P}]^{3-}$. Les différences de comportement optique entre ces groupes de familles conformationnelles sont donc similaires à celle observées pour les différents états de charge de l'éosine, à savoir une forte absorption pour l'éosine dichargée et une absorption très faible pour l'éosine mono-chargée. Ces similarités tendent à montrer que la différence observée sur les spectres photo-électroniques des conformères A, B et C est due à différents états de charge de l'éosine. Les conformères A et B correspondraient à des espèces dans lesquelles le chromophore porterait deux charges négatives, alors que le conformère C correspondrait à une espèce comportant un chromophore mono-chargé.

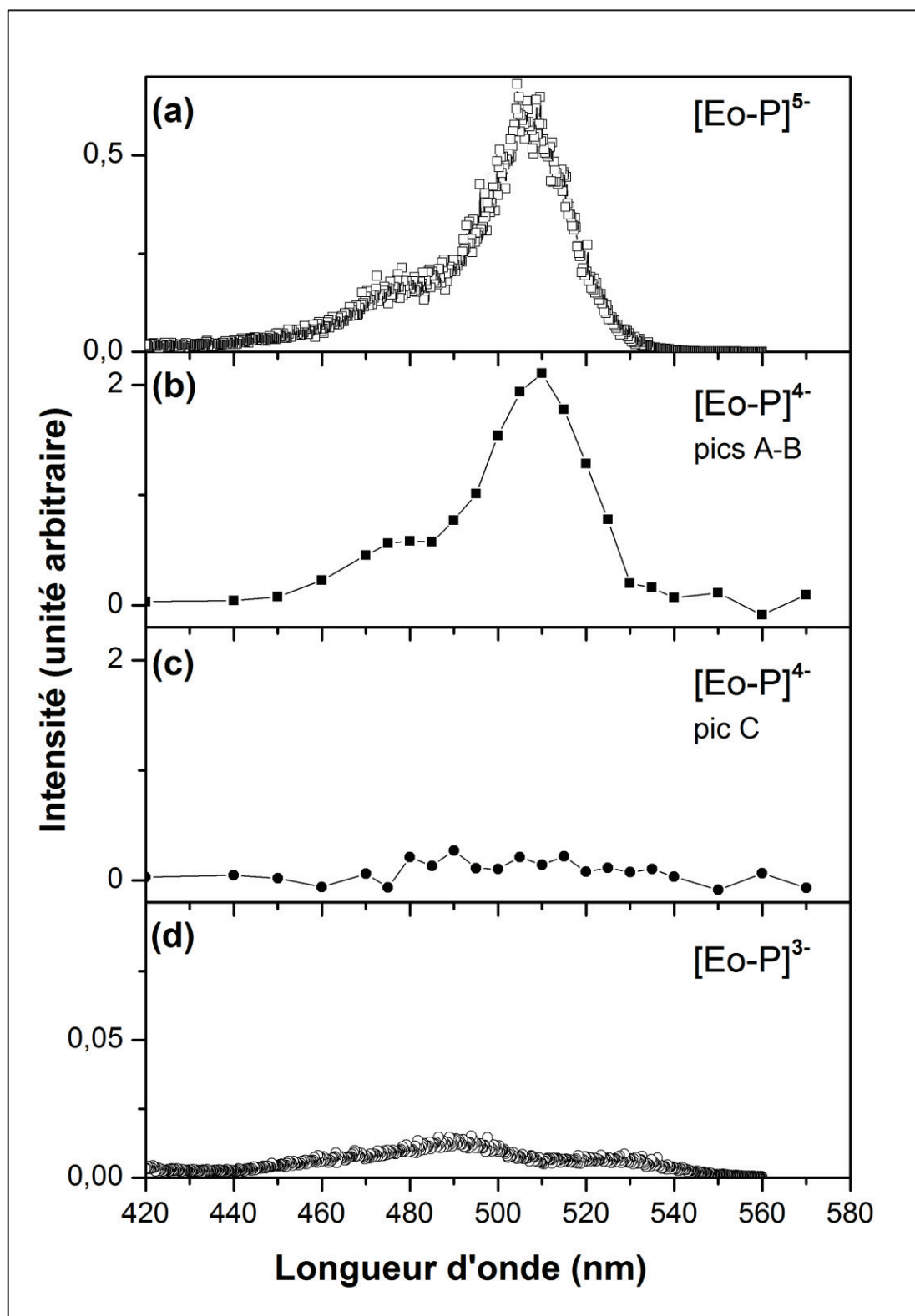


Figure 13. Spectres optiques des conformères spécifiques de $[Eo-P]^{4-}$ (b) A et B et (c) C, comparés aux spectres optiques toute conformation mélangée du système (a) cinq fois chargé et (d) trois fois chargé.

B.3. Irradiation du conformère C activé par collisions

Dans les expériences précédentes, nous avons observé que le conformère C possédait un taux de photo-détachement d'électrons très faible, mais pouvait en revanche être activé par collisions, pour produire vraisemblablement les conformères A et B. Un moyen de vérifier cette hypothèse est de mesurer l'effet de l'irradiation des différents pics activés. Pour cela, le conformère C est isolé après le premier tube de dérive. Le profil de mobilité du conformère C, non activé, est donné en figure 14 a. Dans un deuxième temps, le conformère C est activé par collisions entre les deux étapes de séparation par mobilité ionique, dans l'entonnoir à ions, comme décrit précédemment. Le profil de mobilité des espèces activées est donné en figure 14 b. La position des pics des différentes espèces est marquée par une gaussienne en pointillé, qui correspondent aux pics des conformères A et B. Enfin, dans un dernier temps, les espèces sont activées par collisions à l'entrée du double entonnoir à ions, puis sont irradiées pendant le temps de piégeage avant l'injection dans le deuxième tube de dérive. Le profil de mobilité obtenu est donné en figure 14 c. Les gaussiennes des pics activés par collisions mais non irradiés sont superposées au nouveau profil obtenu, de sorte que la déplétion des pics A et B est mise en évidence, de même que l'absence de déplétion du pic C. Cette expérience confirme donc l'hypothèse faite, en montrant que l'activation par collisions induit une conversion du conformère C vers les conformères A et B, puis l'irradiation laser induit un détachement d'électron sur les conformères A et B.

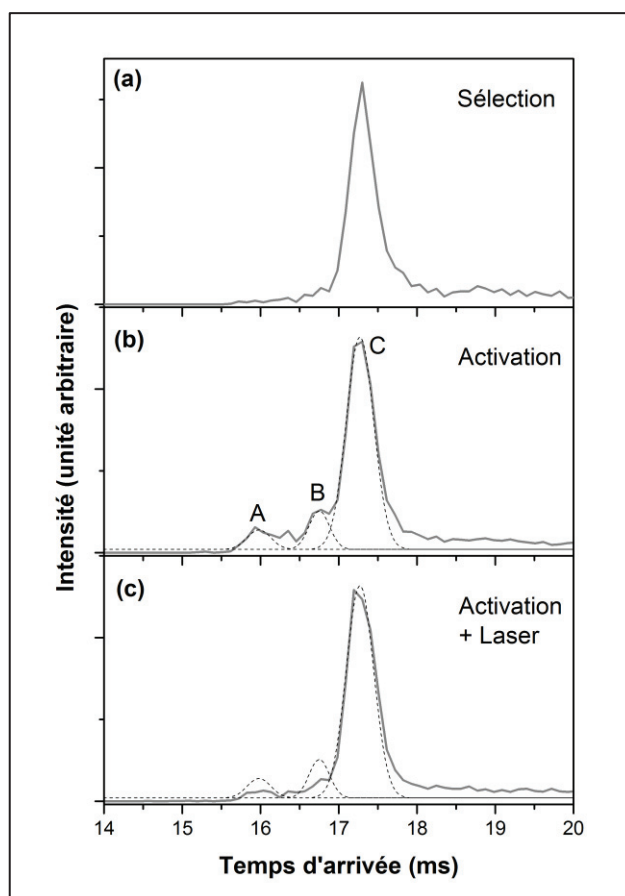


Figure 14. Profils de mobilité du conformère C (a) isolé, (b) activé par collisions et (c) irradié par laser.

IV. Comparaison des résultats expérimentaux aux calculs théoriques

A. Structures théoriques de l'état de charge 4-

Grâce aux résultats expérimentaux, des hypothèses ont été faites quant à la protonation des différentes espèces analysées. Nous allons donc à présent tenter de reproduire ces résultats par des simulations, pour appuyer les arguments avancés. En effet, les structures des peptides marqués [Eo-P] sont modélisées par Dynamique Moléculaire classique (MD), en utilisant le champ de force AMBER 99. Pour cela, différents états de charge et de protonation sont paramétrés sur l'éosine avec le champ de force Amber généralisé (GAFF). Une exploration conformationnelle en champs de force est réalisée par la méthode de l'échange de réplique (REMD) mise en œuvre via le logiciel GROMACS 5.0.2. Puis les structures de plus basse énergie sont optimisées par des calculs de théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), qui sont plus précis et plus exacts pour les calculs des énergies. Les calculs DFT ont été faits via le logiciel Gaussian09 Rev D.01 en utilisant la fonctionnelle CAM-B3LYP combinée avec une correction de dispersion par la méthode empirique développée par Grimme incluant l'amortissement de Becke-Johnson D3(BJ) [14, 15].

De cette manière, les structures théoriques de l'espèce $[Eo-P]^{4-}$ ont été déterminées. Afin de répartir les quatre charges négatives sur les 5 sites potentiels (voir figure 7), nous avons procédé comme suit : le site de déprotonation le plus favorable du système est le groupe hydroxyle de l'éosine [7]. Pour les calculs, nous avons donc estimé que ce site était déprotoné dans tous les cas. Ceci limite le nombre d'isomères possible à quatre molécules dont la structure devra être déterminée. En effet, les trois charges négatives restantes se répartissent sur les quatre autres sites possibles : les groupes carboxyles des chaînes latérales du glutamate (E) et de l'acide aspartique (D), le groupement acide C-terminal (C_t), et l'éosine (Eo). Pour chacun de ces quatre systèmes, on applique la procédure décrite ci-dessus, et les structures de plus basse énergie ainsi obtenues sont données en figure 15. Ces dernières sont dénommées d'après la position du groupe non déprotoné. Par exemple, on notera $[EoE^HDC_t]^{4-}$ le système dans lequel l'éosine est deux fois chargée, et les deux autres charges négatives sont situées sur l'acide aspartique et le groupement acide C-terminal, la chaîne latérale de l'acide glutamique étant donc protonée.

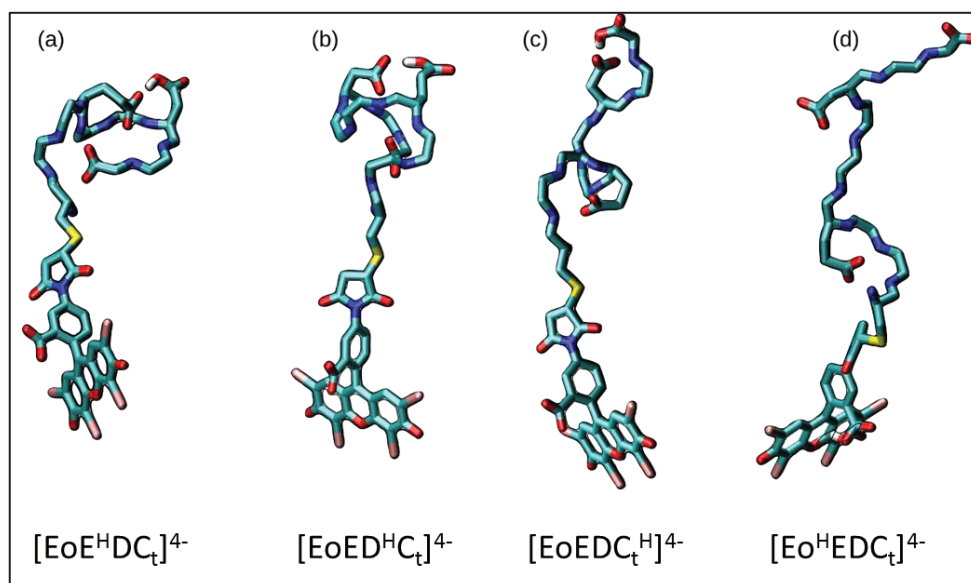


Figure 15. Structures des isomères de $[Eo-P]^{4-}$ avec les énergies les plus basses.

B. Relation entre CCS et sites de protonation

Pour attribuer chacune des structures calculées aux différentes familles conformationnelles mesurées expérimentalement, on compare les résultats expérimentaux avec les énergies et les CCS calculées par le modèle EHSS (décrit dans le chapitre 1. Mobilité Ionique). Les énergies des structures calculées précédemment, ainsi que les sections efficaces de collision théoriques calculées à partir de ces structures sont regroupées dans le tableau 2. Les énergies sont celles obtenues par DFT, elles sont données relativement à celle de la structure la plus stable $[EoE^HDC_t]^{4-}$. Or, d'après les expériences d'activation par collision, il existe une interconversion spontanée entre les espèces A et B, et, à l'équilibre d'interconversion, l'espèce B est majoritaire. Cela tend à désigner l'espèce B comme l'isomère le plus stable. La structure $[EoE^HDC_t]^{4-}$ serait donc attribuée au conformère B.

Toujours d'après les calculs REMD et DFT, toutes les structures comportant de l'éosine deux fois chargée sont plus compactes que celles avec de l'éosine mono-chargée. Cela s'explique par le fait que le groupe carboxyle protoné, situé sur le peptide, peut former des liaisons hydrogène avec les groupements carboxylates, induisant ainsi un repliement de la molécule. En revanche, lorsque le groupement protoné est situé sur l'éosine, trois charges négatives se répartissent le long du peptide. Les répulsions coulombiennes entre ces charges négatives provoque une elongation du peptide, empêchant la formation de liaisons hydrogène, et augmentant la valeur de la section efficace de collision. Sur la base des temps d'arrivée mesurés expérimentalement, la famille conformationnelle A est plus compacte que la famille B. Or, étant donné que la famille conformationnelle B est déjà attribuée à l'espèce $[EoE^HDC_t]^{4-}$ dont l'éosine est deux fois chargée, on en déduit que la famille conformationnelle A possède également un chromophore deux fois chargé. Elle correspond donc à l'une des deux espèces $[EoED^HC_t]^{4-}$ ou $[EoEDC_t^H]^{4-}$. La famille conformationnelle C correspond à un isomère dont la structure est plus étendue que celles des familles A et B. Cependant, comme

seulement trois familles conformationnelles sont mesurées expérimentalement alors qu'il y a quatre isomères calculés, il n'est pas possible de conclure quant à l'état de charge de l'éosine de la famille C uniquement sur la base des temps d'arrivées.

Par ailleurs, dans le cas où le peptide est replié, les liaisons hydrogène favorisent les transferts de protons, et donc l'interconversion entre les formes $[\text{EoE}^{\text{H}}\text{DC}_t]^{4-}$, $[\text{EoED}^{\text{H}}\text{C}_t]^{4-}$, et $[\text{EoEDC}_t^{\text{H}}]^{4-}$. Ceci correspond à l'interconversion observée expérimentalement entre les familles A et B. Pour le système avec l'éosine mono-chargée, l'élongation du peptide empêche le transfert de proton, et donc l'interconversion avec les autres formes. Dans ce sens, la structure $[\text{Eo}^{\text{H}}\text{EDC}_t]^{4-}$ peut être attribuée au conformère C, dont on n'observe pas d'interconversion spontanée avec les familles A et B, expérimentalement.

Cette première attribution des structures théoriques aux conformères observés expérimentalement correspond également aux observations faites lors de la mesure des spectres optiques. Les conformères A et B ont des spectres optiques correspondant à un chromophore deux fois chargé, et le conformère C à un chromophore dichargé. De plus, les valeurs des sections efficaces de collision expérimentales sont cohérentes avec les valeurs théoriques.

Sur les quatre structures théoriques, deux ont donc été attribuées aux familles conformationnelles mesurées expérimentalement. Il reste donc à attribuer la famille A à l'une des deux structures théoriques restantes. Pour cela, nous tenons compte des valeurs de pKa. En effet, d'après les valeurs des pKa données dans le tableau 1, l'alanine C-terminale possède un pKa beaucoup plus faible que les autres groupement acides, et l'on s'attend à ce qu'elle soit déprotonée en solution, générant ainsi une des structures $[\text{EoE}^{\text{H}}\text{DC}_t]^{4-}$, $[\text{EoED}^{\text{H}}\text{C}_t]^{4-}$ et $[\text{Eo}^{\text{H}}\text{EDC}_t]^{4-}$ pour le système $[\text{Eo-P}]^{4-}$ en solution. Par conséquent, la structure $[\text{EoEDC}_t^{\text{H}}]^{4-}$, bien que n'étant pas celle de plus haute énergie, n'est pas attribuée. La structure $[\text{Eo}^{\text{H}}\text{EDC}_t]^{4-}$ est celle de plus haute énergie en phase gazeuse. Elle est cependant observée expérimentalement, car elle est piégée cinétiquement par une haute barrière d'isomérisation, depuis sa structure en solution. L'attribution ainsi faite de chacune des familles observées expérimentalement aux structures calculées est reprise dans le tableau 2. L'état de charge théorique de chaque conformère, ainsi que l'état de charge mesuré expérimentalement à partir des spectres optiques sont également donnés dans le tableau 2.

	ΔE (kJ/mol) Structure DFT	CCS ($\text{\AA}^2$) Structure DFT	CCS ($\text{\AA}^2$) Structure REMD	CCS ($\text{\AA}^2$) Valeur expérimentale	Etat de charge de l'éosine	
					dans le calcul	Supposé d'après les mesures
$[\text{EoE}^{\text{H}}\text{DC}_t]^{4-}$	0	347	359	382 ± 12 (famille B)	2-	2-
$[\text{EoED}^{\text{H}}\text{C}_t]^{4-}$	+10	353	356	367 ± 12 (famille A)	2-	2-
$[\text{Eo}^{\text{H}}\text{EDC}_t]^{4-}$	+55	387	396	399 ± 10 (famille C)	1-	1-
$[\text{EoEDC}_t^{\text{H}}]^{4-}$	+30	374	391		2-	

Tableau 2. Energies calculées par DFT et CCS théoriques et expérimentales.

C. Interconversion entre les isomères

Le conformère C, de structure $[\text{Eo}^{\text{H}}\text{EDC}_t]^{4-}$, est l'espèce de plus haute énergie en phase gazeuse. Cependant, sa structure allongée et l'absence de liaisons hydrogène empêchent l'interconversion spontanée à température ambiante par transfert de proton vers les autres familles de conformères de plus basse énergie. D'après les résultats expérimentaux présentés dans le paragraphe III.B.3 (Irradiation du conformère C activé par collisions), il est possible de franchir cette haute barrière d'isomérisation par activation par collisions avec le gaz tampon. En effet, une petite portion du conformère C peut être convertie en conformère A ou B par un transfert de proton depuis l'éosine vers les chaînes latérales des résidus acides du peptide, sous l'effet des collisions. Par irradiation laser des conformères A et B ainsi formés et possédant un chromophore deux fois chargé, il est ensuite possible de générer du photo-détachement d'électron au niveau du chromophore, alors qu'aucune déplétion de l'isomère C n'est observée lorsque celui-ci est irradié. Ce chemin réactionnel est schématisé sur la figure 16. Il correspond à un changement de la réponse optique du système par un transfert de proton activé par collisions.

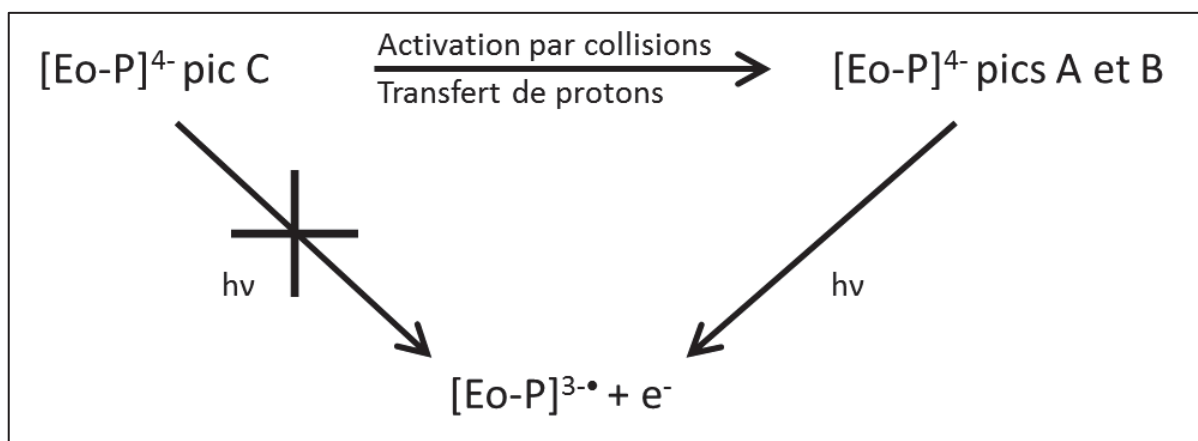


Figure 16. Schéma du changement de photo-réactivité provoqué par l'activation par collision.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons utilisé le couplage de la spectrométrie de masse, de la mobilité ionique et de la spectroscopie laser pour l'étude d'un peptide lié à un chromophore. Dans un premier temps nous avons étudié les propriétés optiques du chromophore, l'éosine Y, afin de mettre en évidence le mécanisme de relaxation par détachement d'électron de ce système. Puis nous avons observé le comportement d'un peptide marqué avec ce chromophore. Grâce à l'utilisation simultanée de l'activation par collisions avec le gaz tampon et l'activation laser dans l'appareil de mobilité ionique en tandem, nous avons été capables d'identifier les structures moléculaires des différentes conformations d'un même état de charge, existant en phase gazeuse. Puis nous avons mesuré les spectres d'action spécifiques de ces diverses conformations. Nous avons pu interpréter les propriétés optiques observées pour les différents conformères grâce à la combinaison de la spectroscopie et de l'activation sur des ions sélectionnés en conformation. L'interprétation des résultats expérimentaux, supportée par des simulations, nous ont permis de montrer que le transfert de proton entre le peptide et son chromophore peut changer radicalement les propriétés optiques du système, et que ce changement peut être déclenché par activation par collisions.

Ceci montre l'intérêt du couplage IMS-laser-IMS en analyse de biologie structurale en phase gazeuse. De futures expériences pourront être menées sur des systèmes analogues de plus grande taille et de plus grande importance biologique, tels que des complexes de protéines natives.

1. Hammes-Schiffer, S., *Proton-Coupled Electron Transfer: Moving Together and Charging Forward*. J. Am. Chem. Soc., 2015. **137**(28): p. 8860-8871.
2. Christie, J.M., et al., *Plant Flavoprotein Photoreceptors*. Plant Cell Physiol., 2014.
3. Harper, S.M., L.C. Neil, and K.H. Gardner, *Structural Basis of a Phototropin Light Switch*. Science, 2003. **301**(5639): p. 1541-1544.
4. Antoine, R. and P. Dugourd, *Visible and ultraviolet spectroscopy of gas phase protein ions*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2011. **13**(37): p. 16494-16509.
5. Choi, C.M., et al., *Charge, Color, and Conformation: Spectroscopy on Isomer-Selected Peptide Ions*. J. Phys. Chem. B, 2016. **120**(4): p. 709-714.
6. Jordanides, X.J., et al., *Solvation Dynamics in Protein Environments Studied by Photon Echo Spectroscopy*. J. Phys. Chem. B, 1999. **103**(37): p. 7995-8005.
7. Batistela, V.R., et al., *pKa determinations of xanthene derivatives in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data*. Spectrochim. Acta A, 2011. **79**(5): p. 889-897.
8. Birla, L., A.-M. Cristian, and M. Hillebrand, *Absorption and steady state fluorescence study of interaction between eosin and bovine serum albumin*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2004. **60**(3): p. 551-556.
9. Chakraborty, M. and A.K. Panda, *Spectral behaviour of eosin Y in different solvents and aqueous surfactant media*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011. **81**(1): p. 458-465.
10. Larraillet, V., et al., *Activated-Electron Photodetachment Dissociation for the Structural Characterization of Protein Polyanions*. Anal. Chem., 2009. **81**(20): p. 8410-8416.
11. *Handbook of Capillary Electrophoresis*. 2nd edition, 1997: p. 216.
12. Shi, H.L., et al., *Solution Dependence of the Collisional Activation of Ubiquitin M+7H (7+) Ions*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2014. **25**(12): p. 2000-2008.
13. Shelimov, K.B. and M.F. Jarrold, *Conformations, unfolding, and refolding of apomyoglobin in vacuum: An activation barrier for gas-phase protein folding*. J. Am. Chem. Soc., 1997. **119**(13): p. 2987-2994.
14. Grimme, S., S. Ehrlich, and L. Goerigk, *Effect of the Damping Function in Dispersion Corrected Density Functional Theory*. Journal of Computational Chemistry, 2011. **32**(7): p. 1456-1465.
15. Grimme, S., et al., *A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu*. The Journal of chemical physics, 2010. **132**(15): p. 154104.

Chapitre 5 :

FRET d'action sur un conformère spécifique

I.	Introduction.....	124
II.	Le Transfert d'Énergie par Résonance de Förster (FRET)	125
A.	Généralités	125
A.1.	Principe.....	125
A.2.	Efficacité de transfert	126
A.3.	Caractéristiques du couple de chromophores	126
B.	FRET d'action	128
B.1.	Du FRET d'ensemble au FRET sur particule unique.....	128
B.2.	Principe du FRET d'action	128
III.	Les systèmes étudiés	129
A.	Les chromophores	129
B.	Expériences préalables.....	130
C.	Préparation des échantillons.....	130
D.	Mode opératoire	132
IV.	Mesures de FRET d'action sur un conformère sélectionné.....	134
A.	Caractérisation des chromophores	134
B.	Etude de l'efficacité de FRET sur les différents états de charge du peptide greffé	137
C.	Etude de l'état de charge 2 ⁺ du peptide greffé	141
C.1.	Etude des différentes familles conformationnelles par activation par collisions	141
C.2.	FRET d'action sur un conformère spécifique.....	143
V.	Conclusion et perspectives.....	145

I. Introduction

Comme décrit dans les chapitres précédents, l'étude de la conformation des molécules d'intérêt biologique est un point crucial pour la compréhension des mécanismes cellulaires et du fonctionnement de certaines maladies. La mobilité ionique a alors été présentée comme un outil puissant pour ces études. Un autre outil pour l'étude conformationnelle de molécules est la mesure de Transfert d'Énergie par Résonance de Förster (FRET). Cette méthode permet de déterminer la distance entre deux molécules spécifiques. La théorie du FRET a été décrite en 1948 par Förster [1], et permet de mesurer l'efficacité de transfert d'énergie entre deux chromophores en fonction de leur distance réciproque. Cette théorie a ensuite été vérifiée expérimentalement par Stryer et Haugland en 1967 [2] sur des polymères de proline. Ces derniers ont démontré la possibilité d'utiliser le FRET comme moyen de mesure des distances sur des systèmes biologiques.

Depuis lors, le FRET a trouvé de multiples applications en biologie, notamment pour l'étude de la conformation de peptides ou la cinétique de repliement des protéines. La possibilité de mesurer de la fluorescence *in vivo* a permis l'utilisation du FRET pour la détection d'interactions protéine-protéine *in vivo*, ainsi que les interactions ADN-protéine [3] ou ARNt-ribosome [4]. Outre la détection d'interactions impliquées dans des mécanismes réactionnels, le FRET *in vivo* a permis de déterminer la distribution des lipides [5] et l'organisation des membranes cellulaires [6]. Ces mesures de FRET sont alors qualitatives : on mesure la présence ou l'absence de fluorescence induite par un transfert d'énergie de type FRET.

On s'intéressera dans ce chapitre à l'étude conformationnelle de systèmes par des mesures quantitatives de FRET sur des ions sélectionnés en conformation par spectrométrie de mobilité ionique. En effet, la mesure de section efficace de collision par mobilité ionique ne donne qu'une information globale sur la molécule : une augmentation de la CCS d'un système reflète une compacité globale de la molécule mais n'exclut pas, par exemple, un repliement local. La spectrométrie de mobilité ionique ne permet pas d'obtenir des informations directes sur les changements de conformation, bien que la comparaison avec des modèles théoriques permette d'en avoir une idée. En revanche les mesures de FRET donnent une information locale sur la distance entre deux chromophores localisés de manière spécifique dans le système étudié. Mais si le système étudié possède différentes conformations, les mesures de FRET sont moyennées sur l'ensemble de ces conformations. En effectuant les mesures de mobilité ionique et de FRET sur un même ion, on peut obtenir à la fois des informations globales et locales sur le système, et déterminer la distance entre deux sites spécifiques sur chaque conformère possible.

Dans ce chapitre, nous rappellerons d'abord la théorie du transfert d'énergie par résonance de Förster, et le principe du FRET d'action qui permet de réaliser des mesures de FRET dans un spectromètre de masse. Puis nous présenterons les premières mesures de FRET d'action résolues en mobilité sur différents conformères d'un peptide modèle.

II. Le Transfert d'Énergie par Résonance de Förster (FRET)

A. Généralités

A.1. Principe

Le Transfert d'Énergie par résonance de Förster (FRET) est un phénomène au cours duquel un groupement donneur va transférer de l'énergie, de manière non radiative, vers un groupement accepteur, dans la limite en champ proche de l'interaction dipôle (donneur excité)-dipôle induit (excitation de l'accepteur). Comme schématisé sur la figure 1.a, le chromophore donneur, fluorescent, est d'abord excité par absorption de photons. Si le chromophore accepteur est suffisamment proche, il peut y avoir désexcitation du donneur par transfert d'énergie vers l'accepteur (figure 1.b) plutôt que par fluorescence (figure 1.c).

Il est possible d'effectuer des mesures de FRET par détection de la fluorescence du chromophore accepteur après excitation du donneur, dans le cas où celui-ci est fluorescent, ou par détection de la fragmentation de ce dernier dans le cas du FRET d'action (voir paragraphe B : le FRET d'action), ou encore par mesure de la diminution de la fluorescence du chromophore donneur.

Le FRET représente donc l'un des moyens de relaxation possibles pour le groupement donneur. Ce phénomène est en compétition avec d'autres voies de désexcitation, soit radiative (émission de fluorescence), soit non radiatives (collisions, transfert DEXTER [7], conversion interne...).

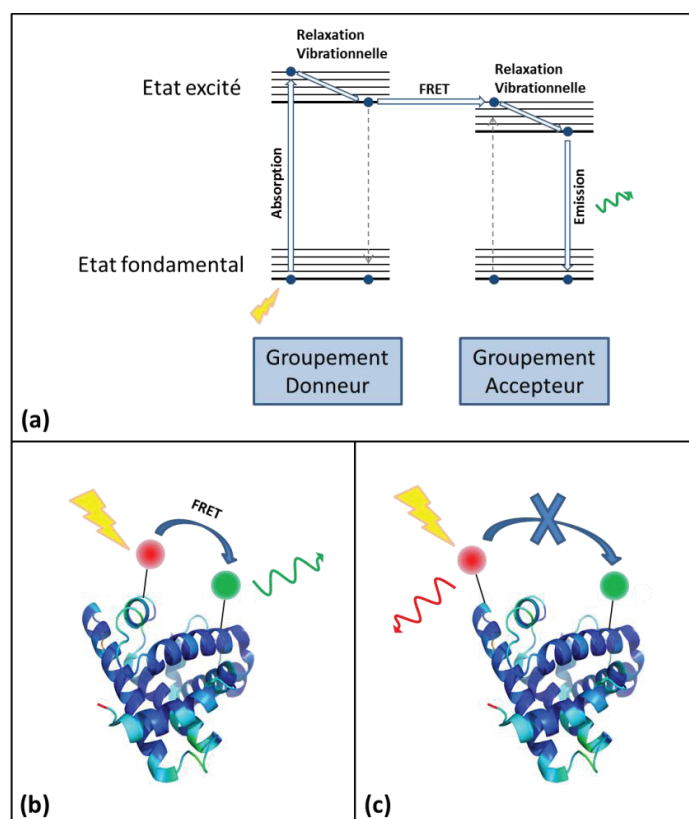


Figure 1. (a) Diagramme du transfert d'énergie par résonance de Förster. (b) Schéma du FRET lorsque les chromophores sont suffisamment proches l'un de l'autre, avec émission du groupement accepteur. (c) Émission du groupement donneur lorsque les chromophores sont trop éloignés pour que du FRET ait lieu.

A.2. Efficacité de transfert

L'efficacité du transfert d'énergie est dépendant de la distance entre les chromophores. En effet, plus les groupements donneur et accepteur sont proches l'un de l'autre, plus la probabilité que la désexcitation du donneur se fasse par FRET augmente. L'efficacité de transfert (E) est donnée par la relation suivante [1]:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad \text{Eq. II 1}$$

Avec r la distance entre les chromophores, et R_0 le rayon de Förster, défini comme la distance entre les chromophores pour laquelle l'efficacité de transfert est de 50%. Ce dernier dépend du couple de chromophores donneur et accepteur, et peut être défini comme suit :

$$R_0 = (J * 10^{-3} * \kappa^2 * n^{-4} * \Phi)^{1/6} \quad \text{Eq. II 2}$$

Où J est l'intégrale de recouvrement, qui sera définie dans la section suivante (A.3 Caractéristiques du couple de chromophores) ; n est l'indice de réfraction du milieu ; κ est le facteur d'orientation des chromophores l'un par rapport à l'autre ; et Φ est le rendement quantique de fluorescence du groupement donneur en absence de groupement accepteur.

Les valeurs typiques du rayon de Förster sont comprises entre 1 et 10 nm, ce qui permet de mesurer des efficacités de FRET pour des distances entre les chromophores du même ordre de grandeur. D'après les équations II 1 et II 2, l'efficacité de FRET dépend non seulement de la distance entre les chromophores, mais aussi de leur orientation. En effet, les chromophores sont assimilables à des dipôles, et leur orientation relative est donc déterminante si on considère les excitations dipolaires électriques. Il existe par conséquent des orientations favorables au transfert d'énergie par résonance de Förster. Ainsi, lorsque les chromophores sont orientés avec un angle de 90° l'un par rapport à l'autre, il n'y a pas de FRET. Si les chromophores possèdent un degré de liberté suffisant pour qu'ils soient orientés de manière aléatoire dans l'espace, le facteur κ^2 est assimilé à $2/3$. C'est le cas lorsque les groupements donneur et accepteur sont liés à un système de manière covalente (via des groupements amines ou thiols) et qu'une libre rotation autour de la liaison est possible. C'est cette dernière hypothèse qui est faite pour les mesures en solution, à température ambiante.

A.3. Caractéristiques du couple de chromophores

Pour pouvoir effectuer des mesures de FRET, il est nécessaire d'utiliser des chromophores donneurs et accepteurs énergétiquement compatibles. En effet, si, par exemple, l'écart d'énergie (ΔE) entre l'état fondamental et l'état excité du groupement accepteur est supérieur à celui du groupement donneur, l'énergie que peut transmettre le groupement donneur n'est pas suffisante pour faire passer dans un état excité l'accepteur : il n'y aura pas de transfert d'énergie. Cette

compatibilité des groupements s'exprime par l'intégrale de recouvrement, définie de la manière suivante :

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad \text{Eq. II 3}$$

Avec F_D la fluorescence du donneur à la longueur d'onde λ et ε_A le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur à la même longueur d'onde.

Cette intégrale de recouvrement correspond à la superposition du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'absorption de l'accepteur (zone hachurée sur la figure 2). Pour choisir un couple de chromophores destinés à faire de FRET, il est nécessaire que ces spectres se superposent au moins partiellement. Un autre critère pour le choix des chromophores est de prendre un donneur ayant un déplacement de Stokes élevé. La source lumineuse d'excitation étant dans la gamme de longueur d'onde d'absorption du donneur, et les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur étant superposés, afin d'éviter toute excitation directe de l'accepteur par la source lumineuse, on choisira un groupement donneur avec un déplacement de Stokes élevé, comme représenté sur la figure 2.

Les autres critères pour le choix du couple de chromophore sont des coefficients d'extinction molaire et des rendements quantiques les plus élevés possibles.

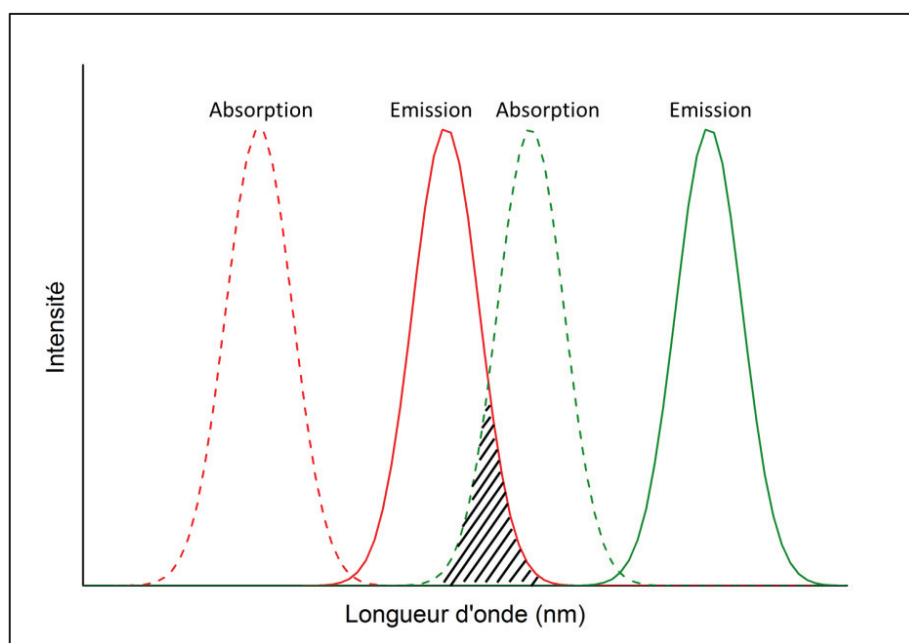


Figure 2. Spectres d'absorption et d'émission théoriques d'un couple de chromophores donneur (en rouge) et accepteur (en vert) compatibles pour du FRET.

B. FRET d'action

B.1. Du FRET d'ensemble au FRET sur particule unique

Les expériences de FRET *in vivo* ou en solution décrites précédemment sont faites sur un grand nombre de molécules, si bien que les mesures sont faites sur la moyenne des conformations présentes dans l'échantillon. Il n'est donc pas possible de mesurer de la sorte la dynamique des systèmes étudiés, si ces derniers ne sont pas synchronisés. C'est en cela que le FRET sur particule unique représente un enjeu.

Le FRET sur paire de chromophore unique (spFRET), ou FRET sur molécule unique (smFRET), a été rendu possible grâce au développement de techniques telles que la microscopie optique en champ proche (NSOM). Les premières mesures de smFRET par microscopie en champ proche ont été décrites par Weiss *et al.* en 1996 [8]. L'échantillon est alors fixé sur une surface en verre et séché. Grâce à des lavages de la surface de verre, il est possible de disperser l'échantillon et d'obtenir des concentrations de l'ordre de 10 molécules par micromètre carré, et ainsi de réaliser des mesures de fluorescence sur particule unique. Cette technique présente l'avantage de pouvoir mesurer plusieurs fois la fluorescence d'une même molécule, dans différentes conditions. Cependant, le fait de sécher l'échantillon peut induire un changement de conformation.

Une autre technique consiste à mesurer la fluorescence de l'échantillon par cytométrie en flux. Il est alors possible de faire des mesures sur l'échantillon en solution. La technique de mesure par cytométrie en flux a été améliorée par le groupe de Keller, de manière à réduire la limite de détection jusqu'à pouvoir mesurer une particule unique [9].

Lorsqu'il est mesuré en solution, le FRET subit l'influence de la température, du pH et de la nature du solvant organique. La détection de FRET en phase gazeuse, grâce au couplage de la spectroscopie avec la spectrométrie de masse décrit dans le chapitre 1, permet de s'affranchir de ces contraintes. De plus, avec cette technique il n'est plus nécessaire de purifier l'échantillon : on isole le système à étudier par spectrométrie de masse en tandem, et on élimine ainsi les impuretés. La première mesure de FRET par piégeage des ions dans un spectromètre de masse a été réalisée par Parks *et al.* [10], qui ont observé la dissociation d'oligonucléotides double-brin en simple brin. Puis la possibilité d'effectuer des mesures de FRET en phase gazeuse de façon non-ambiguë a été montrée par le groupe de Zenobi qui a étudié les variations des propriétés de plusieurs fluorophores entre la solution et la phase gazeuse [11]. Le groupe de Jockusch a également effectué des mesures de FRET en phase gazeuse sur des ions piégés, avec des polymères de proline [12]. Il est cependant difficile de détecter des photons en phase gazeuse, d'où l'intérêt de recourir à la spectroscopie d'action.

B.2. Principe du FRET d'action

Comme décrit dans le chapitre 1, le couplage de la spectroscopie avec la spectrométrie de masse permet de faire de la spectroscopie d'action, dans laquelle on ne mesure plus directement ni l'absorption ni l'émission des molécules mais leur fragmentation induite par laser. Ce type de spectroscopie est applicable aux mesures de FRET.

Le principe du FRET d'action est similaire à celui du FRET décrit précédemment : un chromophore donneur est excité par une source lumineuse et transfère l'énergie absorbée à un chromophore accepteur, qui passe dans un état excité. La différence réside dans le fait que, pour du FRET d'action, le moyen de désexcitation principal du chromophore accepteur est la fragmentation. Ainsi, au lieu de mesurer la fluorescence du chromophore accepteur ou le quenching du chromophore donneur, on va mesurer l'apparition d'ions spécifiques qu'on ne voit que suite à l'excitation électronique de l'accepteur.

Les mesures de transfert d'énergie ont été initiées dans l'équipe avec des complexes ADN-chromophores, puis systématiquement développées [13]. Les premières mesures de FRET d'action ont été effectuées dans l'équipe [14] sur des peptides marqués avec des chromophores organiques, avec un appareil LTQ couplé à un laser nanoseconde, décrit précédemment [15]. Les résultats des mesures d'efficacité de FRET de différents états de charge ont été comparés à des mesures de CCS par mobilité ionique, effectuées sur un autre appareil décrit auparavant [16], permettant ainsi de valider les calculs théoriques. Ceci a permis de montrer une corrélation entre la diminution d'efficacité de FRET et l'élongation de la structure du peptide. La publication correspondante est jointe en annexe 1.

Le but des expériences présentées dans ce chapitre est d'effectuer les mesures de FRET d'action de manière simultanée aux mesures de mobilité ionique, et de pouvoir ainsi mesurer une efficacité de FRET sur un conformère spécifique, sélectionné par mobilité ionique.

III. Les systèmes étudiés

A. Les chromophores

Les deux principaux critères dans le choix du couple de chromophores sont d'une part un large recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur, et d'autre part une fragmentation spécifique de photodissociation du chromophore accepteur. En effet, l'efficacité de FRET est mesurée par rapport à l'intensité du signal de fragments qui doivent être spécifiques de ce transfert d'énergie, et non d'une dissociation induite par collisions (CID) ou résultant d'une redistribution de l'énergie dans l'ensemble du système suite à la désexcitation par conversion interne du donneur.

Le chromophore donneur choisi est la carboxyrhodamine 575 C5-maléimide (Rh 575), commandée chez Setareh Biotech, et dont la formule est donnée en figure 3 dans l'encadré bleu. Les spectres en solution de la Rh 575 montrent un pic d'absorption à 525 nm et une émission à 546 nm. Des études préalables montrent que la rhodamine absorbe en phase gazeuse à 505 nm [14].

Le chromophore accepteur est le QSY7 C5-maléimide (QSY7), commandé chez Life Technologies. Sa formule est donnée en figure 3 dans l'encadré rouge. D'après les spectres en solution, ce chromophore absorbe à 560 nm. En phase gazeuse, des études préalables ont montré que le QSY7 fragmente à 545 nm [14]. Ce chromophore accepteur a été choisi car il n'est pas fluorescent, et on attend donc une fragmentation efficace.

B. Expériences préalables

Après que la faisabilité du FRET d'action en phase gazeuse a été montrée [14] (annexe 1), l'étude conformationnelle d'un peptide d'intérêt biologique, A-beta (12-28), par FRET d'action et mobilité ionique, a été menée. La publication de ces résultats est donnée en annexe 2. Pour cette étude, les mesures de FRET et de mobilité ionique de chacun des états de charge du peptide ont été faites sur deux appareils différents, et les résultats sont regroupés et comparés à des résultats théoriques basés sur des calculs de dynamique moléculaire. Cela permet d'associer à chaque état de charge une structure, sur la base de l'information globale donnée par la détermination de la CCS et l'information locale de la distance entre les deux chromophores par mesure de FRET. Ainsi il a été montré qu'il y a une corrélation entre le comportement d'agrégation des différents monomères et leurs différentes conformations.

Il s'agit donc d'expériences de mobilité ionique préliminaires sans couplage avec le FRET d'action. Les déterminations des CCS et de l'efficacité de FRET sont donc faites sur des moyennes pour chaque état de charge, ce qui induit une large barre d'erreur. L'étape suivante consiste à coupler les mesures de FRET aux mesures de mobilité ionique dans le même appareil. Le montage expérimental étant différent (géométrie de l'appareil différente, laser pico-seconde au lieu du nano-seconde), la faisabilité du FRET d'action sur l'appareil laser-IMS doit dans un premier temps être montrée. Nous avons pour cela utilisé un peptide modèle, dont la séquence est donnée dans le paragraphe suivant.

C. Préparation des échantillons

Le peptide choisi pour les expériences de FRET est un peptide modèle, ne présentant pas d'intérêt biologique particulier, et dont la séquence est **CAAKAAC**. Ce peptide est choisi car il est de petite taille, donc on s'attend à une forte efficacité de FRET. Il s'agit d'une chaîne de polyalanine avec deux cystéines situées aux extrémités N-terminale et C-terminale, qui sont les sites de greffage des chromophores. La lysine située au milieu de la séquence peptidique permet de solubiliser le peptide.

Afin de préparer la réaction de greffage des chromophores sur le peptide, le peptide est dissous dans l'eau à une concentration de 10 μM . Des solutions mères de chaque chromophore sont préparées en dissolvant 1 mg de chromophore dans 100 μL de DMSO, afin d'obtenir des concentrations d'environ 10 mM et 20 mM respectivement pour le QSY 7 et la rhodamine. Les chromophores et le peptide sont mélangés dans un ratio volumique 1 : 1 : 1 et la solution est gardée à température ambiante pendant une heure, le temps que la réaction de greffage ait lieu. Puis 0.1% d'acide acétique est ajouté au milieu réactionnel, de manière à favoriser la protonation des sites basiques. La formule du peptide marqué par les chromophores est donnée en figure 3. Sur cette figure, les sites acides sont marqués en rouges et les sites basiques sont marqués en bleu.

La réaction de greffage est une réaction d'addition thiol-ène, dont le mécanisme a été décrit dans le chapitre 4 (Photo-détachement d'électron sur un peptide marqué). Les chromophores sont ainsi liés de manière covalente sur les cystéines du peptide. Les deux chromophores étant mélangés

simultanément avec le peptide, il y a une compétition entre ces derniers pour la réaction avec les cystéines du peptide. C'est pourquoi on s'attend à trouver en solution quatre peptides greffés différents :

- **R-CAAKAAC-R**, qui correspond à deux rhodamines liées aux deux cystéines du même peptide.
- **Q-CAAKAAC-Q**, qui correspond à deux QSY 7 liés aux deux cystéines du même peptide.
- **Q-CAAKAAC-R** et **R-CAAKAAC-Q**, qui correspondent respectivement au QSY 7 lié à la cystéine N-terminale et la rhodamine liée à la cystéine C-terminale, et inversement. Ce sont ces deux formes qui sont susceptibles de faire du FRET.

Les chromophores étant mis en excès par rapport au peptide, on trouvera également des chromophores non liés en solution. En revanche, aucun peptide non greffé n'est détecté. Les masses de tous les composés (neutres) attendus en solution sont regroupées dans le tableau 1 :

	R-CAAKAAC-R	Q-CAAKAAC-Q	R-CAAKAAC-Q ou Q-CAAKAAC-R	Rh 575	QSY 7
Masse moléculaire (u)	1880	2278	2079	623	822

Tableau 1. **Masses molaires des composés attendus en solution.**

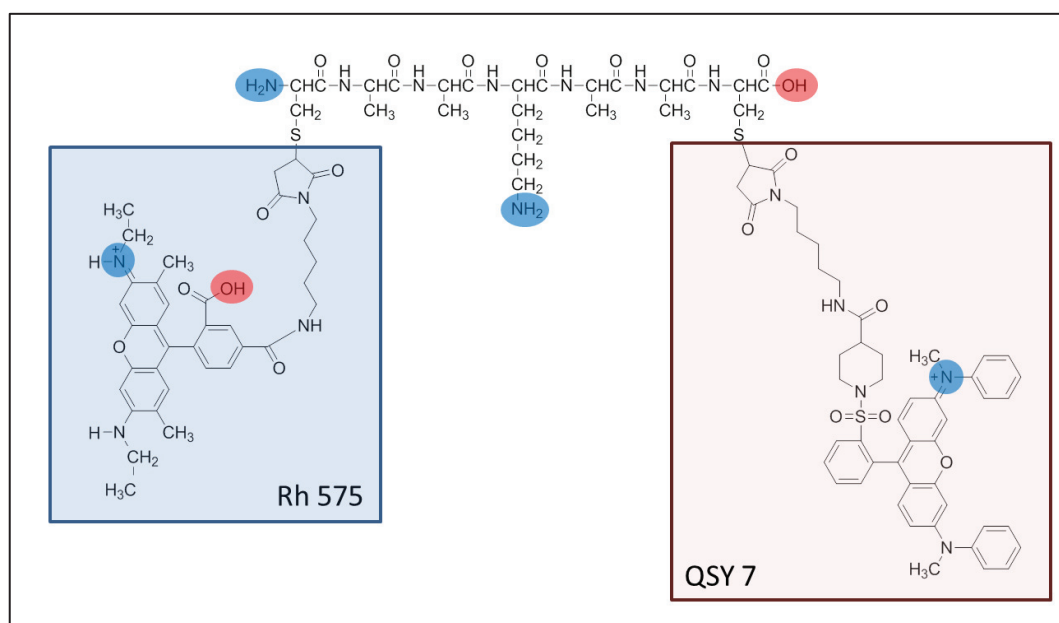


Figure 3. Formule du peptide greffé avec la rhodamine 575 N-terminale (en bleu) et le QSY 7 C-terminal (en rouge).

Afin de connaître les différents états de charge des systèmes en solution, on se réfère aux valeurs des pKa de chaque groupement acide ou basique du peptide greffé. Ces valeurs sont données dans le tableau 2. Les valeurs de pKa des acides aminés libres ou intégrés dans un peptide pouvant varier, deux valeurs de pKa sont données pour chaque peptide : la valeur pour l'acide aminé libre et une valeur ajustée pour les acides aminés inclus dans des peptides [17]. En ce qui concerne les chromophores, le QSY 7 possède toujours une charge positive (voir figure 3) et la rhodamine existe sous trois formes : protonée, zwitterion et lactone, comme représenté dans la figure 4. Le pKa donné dans le tableau 2 représente le pKa d'équilibre entre les formes protonée et zwitterion. La valeur donnée est celle de la Rhodamine B, proche de celle attendue pour la rhodamine 575.

	Cystéine N-terminale	Cystéine C-terminale	Lysine	-COOH Rhodamine
pKa	1 : 10.40 2 : 7.30	1 : 1.93 2 : 2.75	1 : 10.66 2 : 10.30	3.2

Tableau 2. Valeurs de pKa des groupements acides et basiques de la rhodamine [18] et des acides aminés 1) isolés et 2) inclus dans un peptide [17].

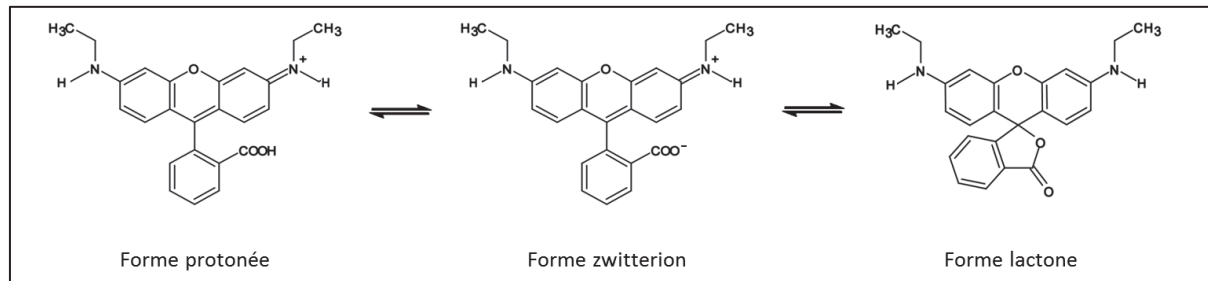


Figure 4. Equilibre des formes protonée, zwitterion et lactone de la rhodamine.

D. Mode opératoire

La solution ainsi préparée est injectée dans la source électro-spray. Pour obtenir les profils de mobilité ionique, l'appareil est utilisé en mode simple IMS. Les espèces sont alors séparées dans le deuxième tube de mobilité. Pour obtenir les spectres optiques, l'appareil est utilisé en mode tandem-IMS : les différentes espèces sont séparées dans le premier tube de mobilité, puis sélectionnées en fonction de leur temps de dérive. Dans le spectromètre de masse il est ensuite possible de sélectionner les ions en fonction de leur rapport masse sur charge grâce au quadrupôle, afin d'éliminer les espèces ayant un temps de dérive similaire à celui de l'espèce d'intérêt. Enfin, l'irradiation laser est faite dans la cellule de collision du spectromètre de masse. Les ions sont alors piégés dans la cellule de collision entre deux cycles ToF, et irradiés pendant le temps de piégeage. Au

cours de ces expériences, deux lasers ont été testés : le laser OPO/OPA pico-seconde (EKSPLA), sur lequel le spectromètre de masse est synchronisé (voir chapitre 2. Développement instrumental) et le laser continu à 488 nm (Cobolt MLD™).

Dans ces expériences de FRET d’action, les ions sont irradiés dans la cellule de collision et non dans la zone de mobilité ionique. Pour les mesures de FRET il y a seulement besoin d’une sélection des ions en mobilité avant de les irradier. Il est donc plus simple d’effectuer l’irradiation dans la cellule de collision, où il est plus facile d’aligner le laser.

En effet, il est possible de focaliser le laser dans la cellule de collision, située à quelques dizaines de centimètres de la fenêtre d’injection du laser. En revanche, cela s’avère plus compliqué au niveau de l’entonnoir à ion du fait de la configuration de l’appareil et de la divergence du faisceau laser. Pour irradier les ions dans le piège entre les tubes de mobilité, le laser est injecté dans l’appareil via la fenêtre située à côté de la source et passe par des ouvertures de 1 mm située un mètre avant le piège, ce qui génère de la diffraction. La densité de photons est donc a priori moins importante dans l’entonnoir à ions que dans la cellule de collision.

De plus, il existe une différence de pression et de densité d’ions entre l’entonnoir à ion et la cellule de collision. En effet, lorsque les ions sont piégés dans l’entonnoir à ions, le faisceau d’ions est plus ou moins diffus à l’intérieur du piège, selon les paramètres appliqués sur l’entonnoir. La focalisation des ions dans l’axe de l’appareil, et donc la densité d’ions est plus importante dans la cellule de collision, et un plus grand nombre d’ions peuvent être excités par le laser.

Par ailleurs, les ions irradiés dans la cellule de collision sont ensuite directement transmis vers le ToF. Cela permet d’éviter les problèmes de transmission dans l’appareil, puisque les ions parents et les fragments ne sont pas optimisés par les mêmes paramètres instrumentaux appliqués sur les optiques ioniques. Ainsi ; si l’appareil est optimisé pour la détection de l’ion parent, les paramètres appliqués ne sont pas adéquats pour la transmission des fragments. Or pour les mesures de FRET, il est nécessaire de mesurer la masse des fragments spécifiques, on ne peut pas travailler avec uniquement la mesure de la déplétion de l’ion parent, qui inclut d’autres phénomènes.

L’efficacité du FRET est mesurée par le taux de fragmentation du QSY 7 à la longueur d’onde d’excitation de la rhodamine, selon la formule suivante :

$$Taux\ de\ fragmentation = \frac{\sum I^{fragments} - \sum I_0^{fragments}}{I_0^{parent}} \quad \text{Eq. III 1}$$

Avec I et I_0 les intensités du signal sur le spectre de masse des fragments de QY 7 ou de l’ion parents (peptide greffé) respectivement avec et sans laser.

IV. Mesures de FRET d'action sur un conformère sélectionné

A. Caractérisation des chromophores

Dans un premier temps, la faisabilité des expériences de FRET d'action sur l'appareil laser-IMS est testée avec le laser pico-seconde et le laser continu. Les propriétés optiques des chromophores sont étudiées. Pour cela, une solution de QSY 7 à 25 μM dans un mélange eau : méthanol (1 : 1) est injectée dans l'appareil. Les fragments spécifiques du QSY 7 par dissociation induite par laser (LID) sont attendus à m/z 465 et 531 [14]. Ces fragments sont représentés sur l'encart de la figure 5. Le spectre donné en figure 5 représente la soustraction du spectre du QSY 7 laser ON par le spectre laser OFF, obtenus avec le laser pico-seconde à 540 nm. Ainsi, les pics positifs permettent de repérer les fragments du QSY 7 générés par LID. On retrouve sur ce spectre les fragments spécifiques du FRET à m/z 465 et 531 (surlignés). Ces fragments sont uniquement observés après une excitation électronique du chromophore accepteur, les autres fragments détectés ne sont pas spécifiques de la LID.

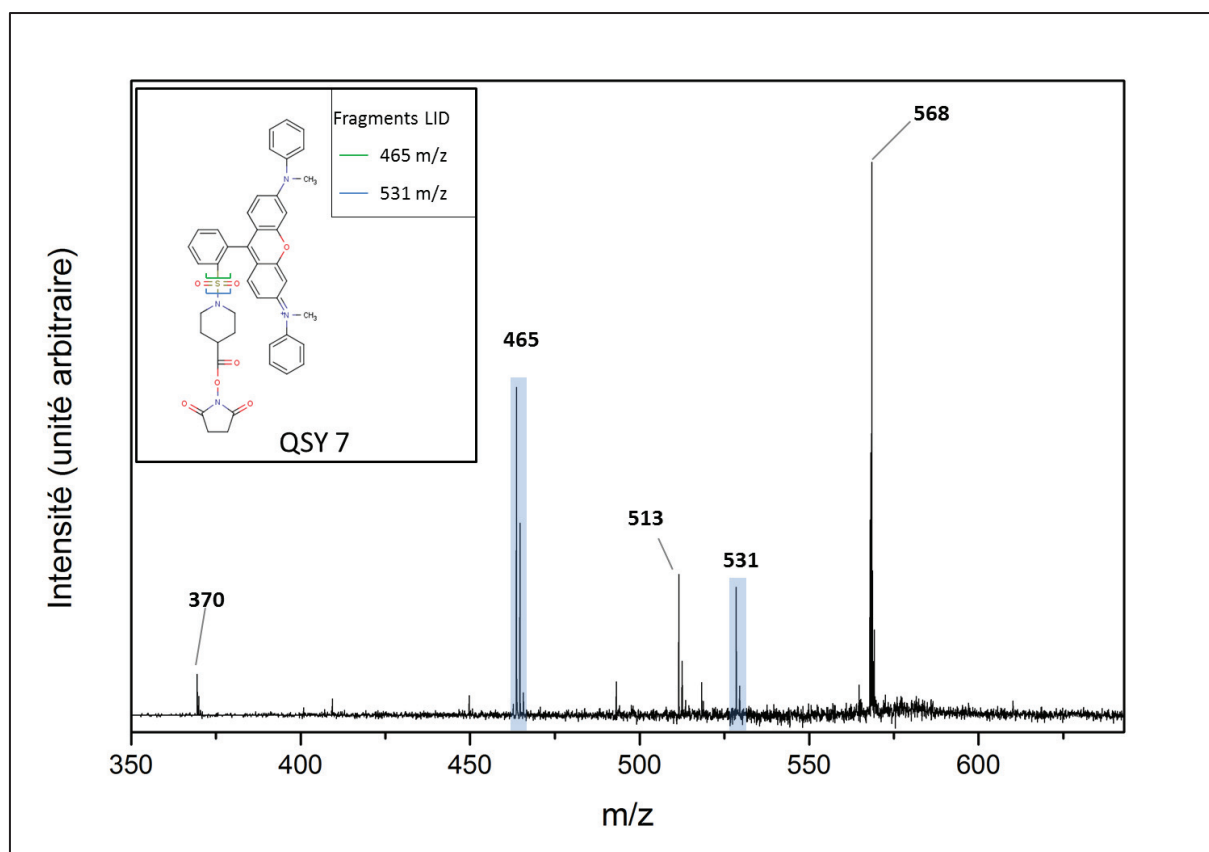


Figure 5. Spectre laser ON-OFF du QSY 7 obtenu avec le laser OPO pico-seconde.

Le spectre de fragmentation du QSY 7 mesuré avec le laser pico-seconde, est obtenu en sélectionnant le QSY 7 au quadropôle, puis en irradiant avec le laser aligné dans la cellule de collision. Ce spectre d'action, donné en figure 6.b, est comparé à celui obtenu par sélection du QSY 7 sur

l'appareil LTQ (figure 6.a). Le spectre obtenu sur l'appareil laser-IMS est décalé vers le bleu et beaucoup plus large que celui obtenu sur le LTQ. On y observe une fragmentation du QSY 7 dans la zone d'absorption de la rhodamine, ce qui empêchera les mesures de FRET d'action par excitation sélective de la rhodamine. Pour les mesures de FRET d'action, les échantillons sont irradiés à 505 nm, ce qui correspond à l'excitation de la rhodamine. Dans le cas présent, les QSY 7 absorbe également dans cette gamme de longueur d'onde et il sera impossible de discerner sur le spectre de masse la part des fragments générés par FRET de celle générée par excitation directe du QSY 7. Afin de comprendre si cette différence entre les deux spectres d'action vient de l'utilisation de lasers différents ou des conditions de piégeage et de fragmentation différentes dans les deux appareils LTQ et laser-IMS, nous installons le laser pico-seconde sur l'appareil LTQ. Le spectre d'action mesuré est donné en figure 6.c. Sur ce spectre, la gamme de longueur d'onde d'absorption du QSY 7 est plus restreinte que sur l'appareil laser-IMS, mais reste plus large qu'avec le laser nano-seconde. En particulier, il y a un épaulement dans le pic d'absorption entre 490 et 505 nm, soit exactement à la longueur d'onde utilisée pour l'excitation de la rhodamine en vue de mesures de FRET. Cela tend à montrer que le laser pico-seconde n'est pas adéquat pour les mesures de FRET avec ce couple de chromophores.

En effet, en raison de la différence de durée d'impulsion entre le laser pico-seconde et le laser nano-seconde, il est plus probable de voir apparaître des processus d'absorption de deux photons lorsque le laser pico-seconde est utilisé. Ceci représente une hypothèse permettant d'expliquer la différence entre les spectres optiques du QSY 7 obtenus avec chacun des deux lasers (figure 6.a et figure 6.c).

La différence entre les spectres optiques du QSY 7 mesurés avec le même laser (pico-seconde) sur les appareils laser IMS (figure 6.b) et LTQ (figure 6.c) s'explique par le fait que le trajet optique du laser pour être injecté dans l'appareil LTQ est beaucoup plus grand que pour l'injection dans l'appareil laser-IMS. Ainsi, à cause de la divergence du faisceau laser, la puissance du laser dans l'appareil LTQ est plus faible que dans l'appareil laser-IMS. Or les processus d'optique non linéaire étant plus sensibles à la puissance du laser, l'intensité de la partie du spectre optique correspondante diminue grandement, relativement à la partie du spectre correspondant à une absorption d'un seul photon.

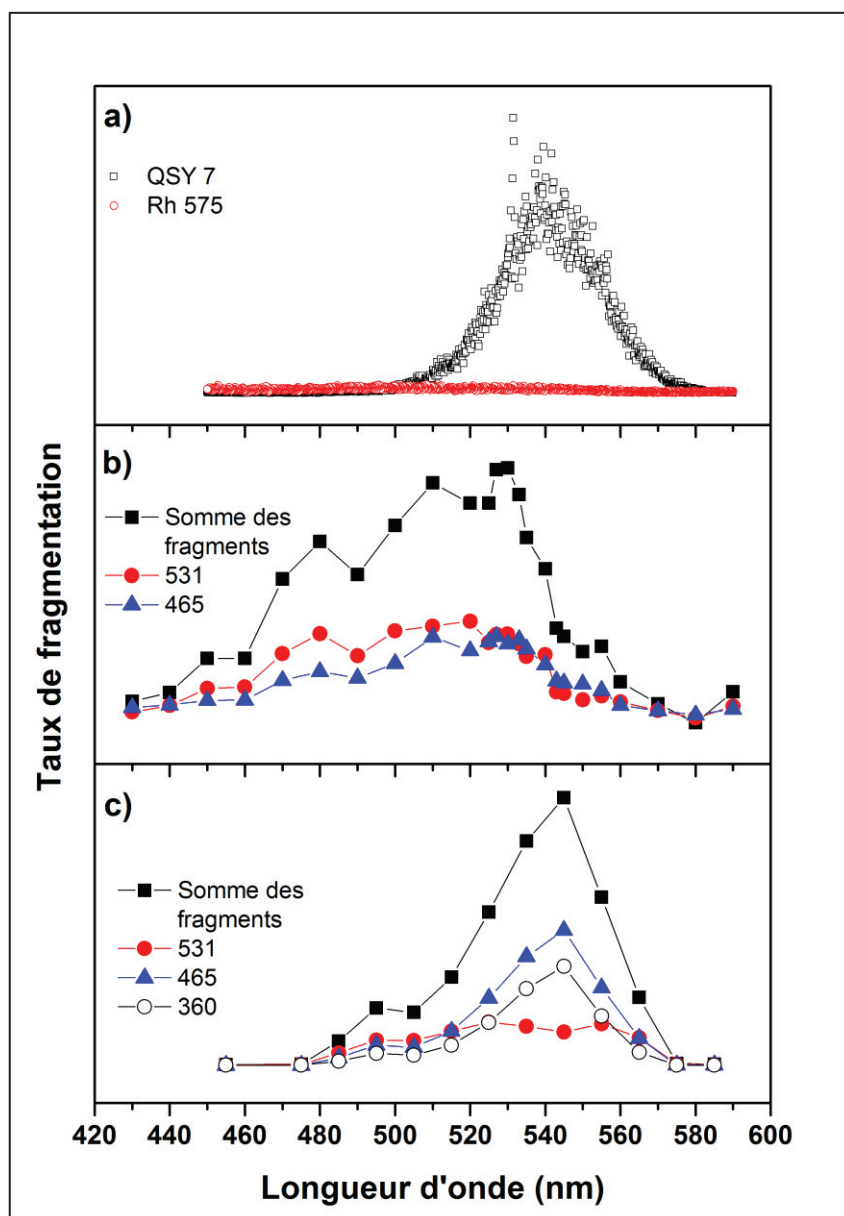


Figure 6. Spectres d'action du QSY 7 obtenus a) sur l'appareil LTQ avec le laser nano-seconde; b) sur l'appareil laser-IMS avec le laser pico-seconde et c) sur l'appareil LTQ avec le laser pico-seconde.

Comme le laser pico-seconde ne peut être utilisé pour les expériences de FRET, nous installons le laser continu (488 nm), aligné dans la cellule de collision. Pour cette longueur d'onde, on n'attend normalement pas de fragmentation du QSY 7, bien que l'on puisse en observer avec le laser pico-seconde. Le spectre de masse (laserON-laserOFF) de fragmentation du QSY 7 ainsi obtenu est donné en figure 7.a, et peut être comparé au spectre de fragmentation du QSY 7 obtenu avec le laser OPO pico-seconde à la même longueur d'onde (figre 7.b).

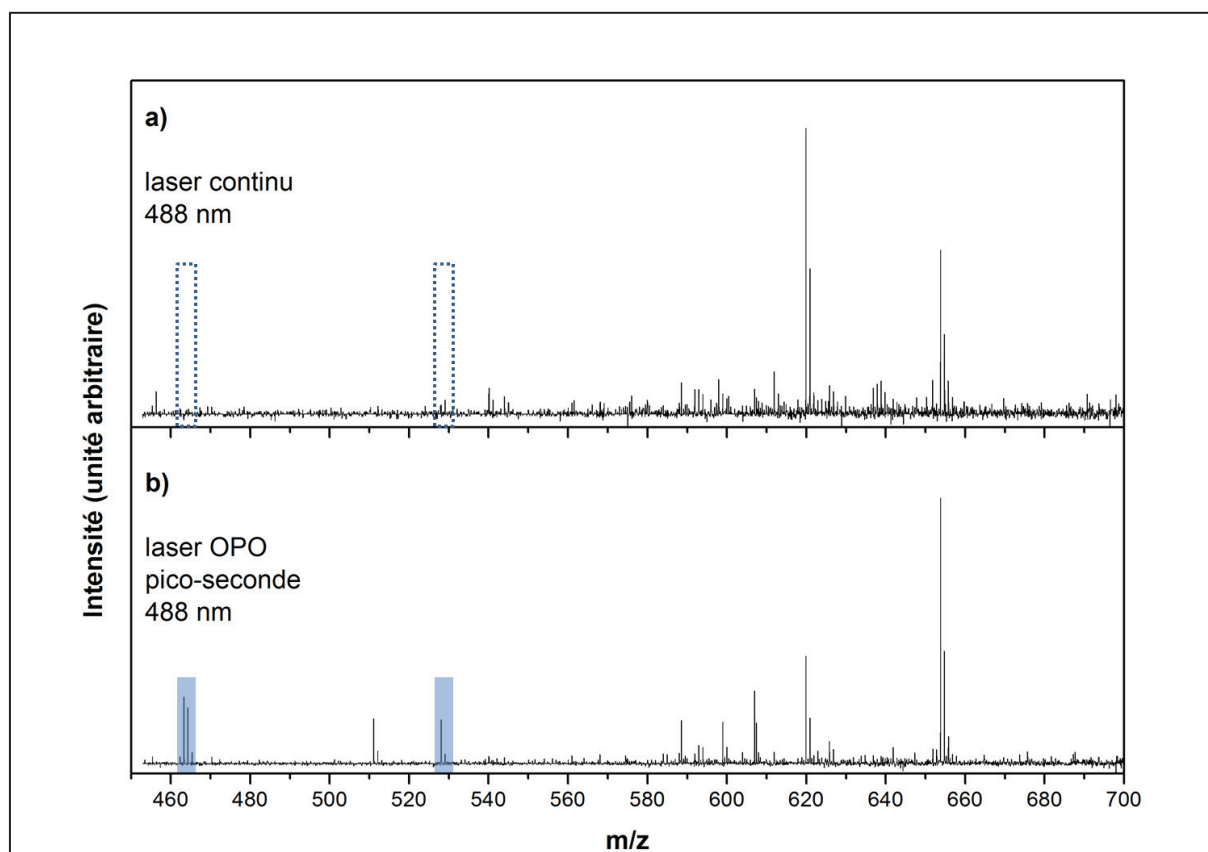


Figure 7. Spectres de masse laser ON-OFF du QSY 7 obtenu a) avec le laser continu (Cobolt) et b) avec le laser pico-seconde réglé à la même longueur d'onde (488 nm).

Sur la figure 7, les fragments caractéristiques du QSY 7 (m/z 531 et 465) sont surlignés. On remarque la présence de ces fragments lorsque le QSY 7 est irradié à 488 nm par le laser pico-seconde (figure 7.b), alors qu'aucune fragmentation spécifique de LID n'est détectée sur le spectre de masse ON-OFF lorsque le QSY 7 est irradié à 488 nm avec le laser continu. Cela tend à confirmer que l'absorption du QSY 7 dans cette gamme de longueurs d'onde est bien due aux spécificités du laser pico-seconde, et non à l'appareil laser-IMS lui-même. 488 nm étant toujours situé dans la gamme d'absorption de la rhodamine, il est envisageable d'utiliser le laser continu pour les expériences de FRET, bien que cette longueur d'onde ne soit pas située au maximum d'absorption de la rhodamine.

B. Etude de l'efficacité de FRET sur les différents états de charge du peptide greffé

La solution de peptide greffé est injectée dans l'appareil. Le spectre de masse global obtenu est donné en figure 8. Les espèces qui y sont indiquées sont les chromophores seuls, notés QSY 7 et Rh, et les peptides greffés. Ces derniers sont désignés par les chromophores qu'ils portent. Par exemple, l'espèce **R-CAAKAAC-Q**, indiscernable de **Q-CAAKAAC-R**, sera notée [RQ].

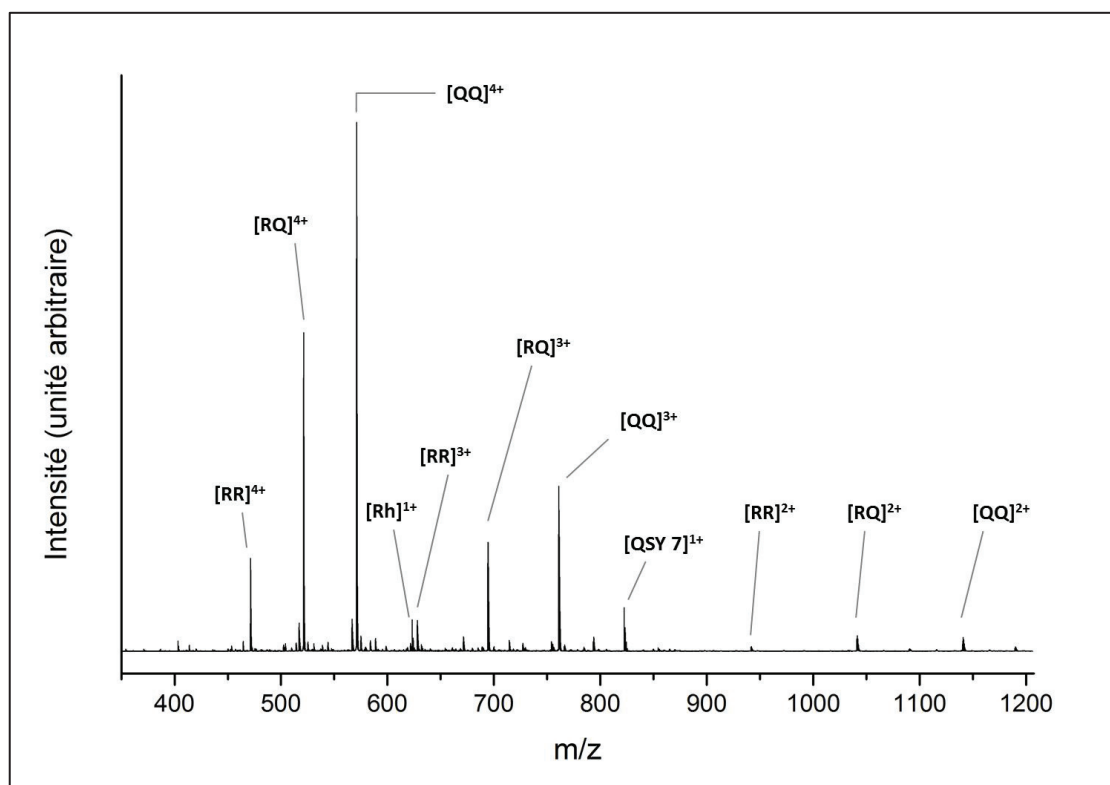


Figure 8. Spectre de masse global de la solution de peptide greffé.

On s'intéresse à présent au peptide greffé avec chacun des deux chromophores : $[RQ]^n$. On observe sur le spectre de masse trois états de charge : 2^+ , 3^+ et 4^+ . Dans une étude préalable, les spectres du taux de fragmentation spécifiques de l'accepteur ont été mesurés pour chaque état de charge sur l'appareil LTQ avec le laser nano-seconde. Les résultats sont présentés en figure 9.

Les spectres présentent tous deux pics d'absorption, marqués par des gaussiennes. Le pic vers les grandes longueurs d'onde correspond à l'absorption directe du QSY 7. Le premier pic, quant à lui, correspond à la gamme de longueur d'onde d'absorption de la rhodamine, et est donc caractéristique du FRET.

Sur les spectres présentés en figure 9, on remarque que l'intensité du pic de droite est constante quel que soit l'état de charge. Cela correspond à ce qui était attendu : l'absorption directe du QSY 7 ne varie pas avec l'état de charge du peptide. En revanche, le pic de gauche, spécifique du FRET, est d'intensité variable. L'intensité de ce pic est importante pour l'état de charge 2^+ et diminue progressivement quand l'état de charge augmente, jusqu'à être très faible pour l'état de charge 4^+ .

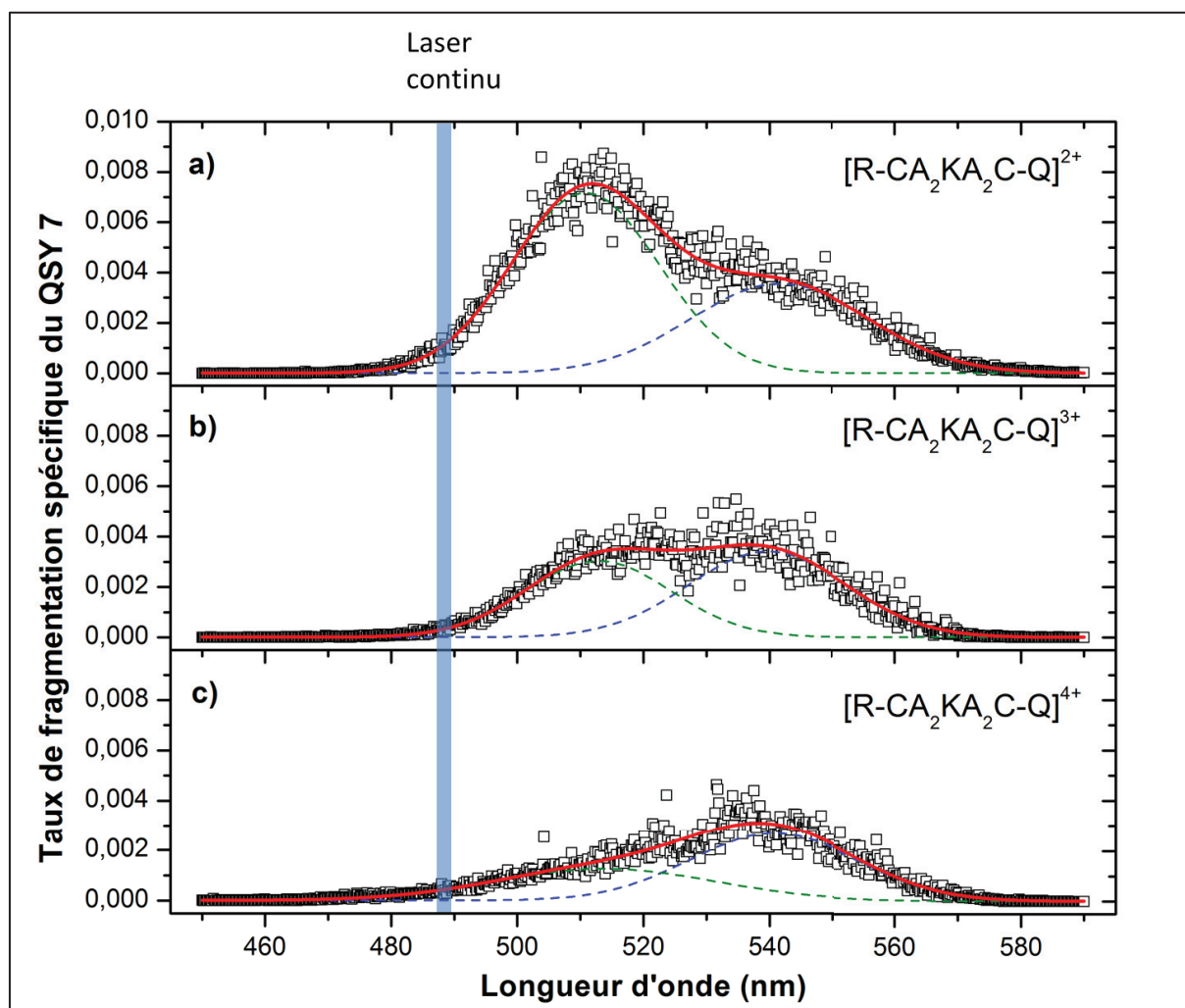


Figure 9. Spectre optique du système [RQ] pour a) l'état de charge 2^+ , b) l'état de charge 3^+ et c), l'état de charge 4^+ , mesurés sur l'appareil LTQ avec le laser nano-seconde.

Ces spectres ne sont pas reproductibles sur l'appareil laser-IMS avec le laser pico-seconde en raison de l'élargissement vers le bleu de la gamme d'absorption du QSY 7 : le pic de gauche n'est donc pas seulement représentatif du FRET. Sur l'appareil laser-IMS, les expériences de FRET sont menées avec le laser continu à 488 nm, dont la longueur d'onde est marquée en bleu sur la figure 9. On voit ainsi que les expériences de FRET présentées par la suite sont faites à une longueur d'onde située assez loin du maximum d'absorption du chromophore donneur (505 nm). On attend donc pour ces expériences une intensité de signal qui ne sera pas optimale.

Malgré cela, le taux de fragmentation de chaque état de charge est mesuré sur l'appareil laser-IMS, utilisé comme décrit précédemment. Les résultats sont donnés en figure 10. On constate que le taux de fragmentation spécifique du FRET diminue considérablement lorsque l'état de charge du système augmente, passant de 0.04827 pour le 2^+ à 0.00134 et 0.0001733 respectivement pour le 3^+ et 4^+ . Ces résultats sont en accord avec la tendance observée sur les spectres optiques du même système, mesurés sur LTQ (voir figure 9).

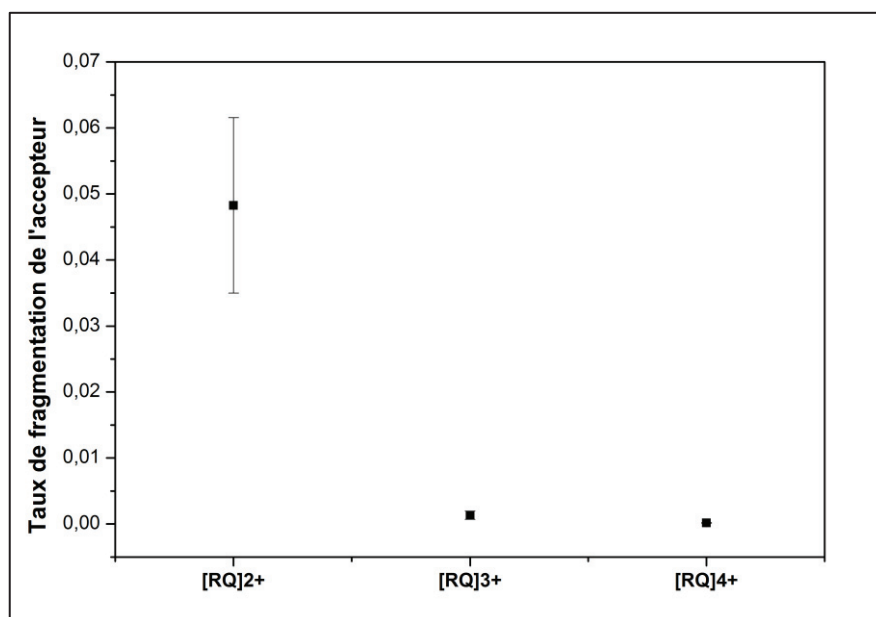


Figure 10. Taux de fragmentation spécifique du FRET pour les différents états de charge.

Afin d'interpréter ces résultats, nous nous intéressons à la répartition des charges dans le système. Ce dernier possède quatre groupements basiques principaux et deux groupements acides (voir figure 3). On considérera que chacun des chromophores possède toujours une charge positive, les autres charges positives se répartissent donc potentiellement sur le groupement N-terminal porté par la cystéine et la chaîne latérale de la lysine. Deux charges négatives peuvent être portées par le groupement C-terminal du peptide et par la rhodamine (sous sa forme zwitterion).

Ainsi, pour l'état de charge 4^+ , on attend une seule distribution de charge : deux charges positives portées par les chromophores et deux charges positives portées par le groupement N-terminal et la chaîne latérale de la lysine. Pour l'état de charge 3^+ , la distribution la plus probable, compte tenu des pKa des différents groupements, est de deux charges positives portées par les chromophores et une troisième charge portée par la lysine ou le groupement N-terminal. Une autre possibilité est que les quatre charges positives soient réparties comme pour l'état de charge 4^+ , et qu'une charge négative soit portée par le groupement C-terminal du peptide, ou alors, de manière moins probable, par la rhodamine qui peut dans ce cas se présenter sous sa forme zwitterion ou sa forme lactone. Enfin, pour l'état de charge 2^+ , la distribution la plus probable est de deux charges positives portées par les chromophores, le peptide restant neutre. Il est également possible que le peptide soit présent sous forme zwitterion, ajoutant à la distribution précédente une charge positive portée par la lysine ou le groupement N-terminal, et une charge négative portée par le groupement C-terminal. La forme zwitterion ou lactone de la rhodamine est également possible (RL).

Ces distributions de charge attendues pour chaque état de charge du système est en accord avec les résultats expérimentaux. En effet, pour l'état de charge 4^+ , les répulsions coulombiennes entre les charges portées par les chromophores et celles portées par le peptide, et en particulier par la lysine située au milieu de la chaîne peptidique, tendent à allonger le peptide et à éloigner les chromophores l'un de l'autre. L'efficacité de FRET est donc diminuée. C'est ce que l'on observe sur la

figure 9.c. Les répulsions coulombiennes deviennent moins importantes lorsque l'on passe de l'état de charge 4^+ à l'état de charge 3^+ , ce qui permet aux chromophores d'être situés plus près l'un de l'autre. Ainsi, le taux de fragmentation de QSY 7 spécifique du FRET mesuré sur la figure 9.b est plus important. Enfin, pour l'état de charge 2^+ , les seules répulsions coulombiennes en jeu sont celles entre les chromophores eux-mêmes. Le peptide peut alors être plus compact, et les chromophores plus proches : le pic d'absorption typique du FRET est alors le plus intense (figure 9.a).

C. Etude de l'état de charge 2^+ du peptide greffé

C.1. Etude des différentes familles conformationnelles par activation par collisions

La solution de peptide greffé est injectée dans l'appareil laser IMS. Dans un premier temps, le profil de mobilité de l'espèce $[RQ]^{2+}$ est obtenu par simple mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse, et est donné en figure 11.a. Sur ce profil, on distingue quatre familles conformationnelles, notées A, B, C et D, et représentées par des gaussiennes en pointillés sur la figure.

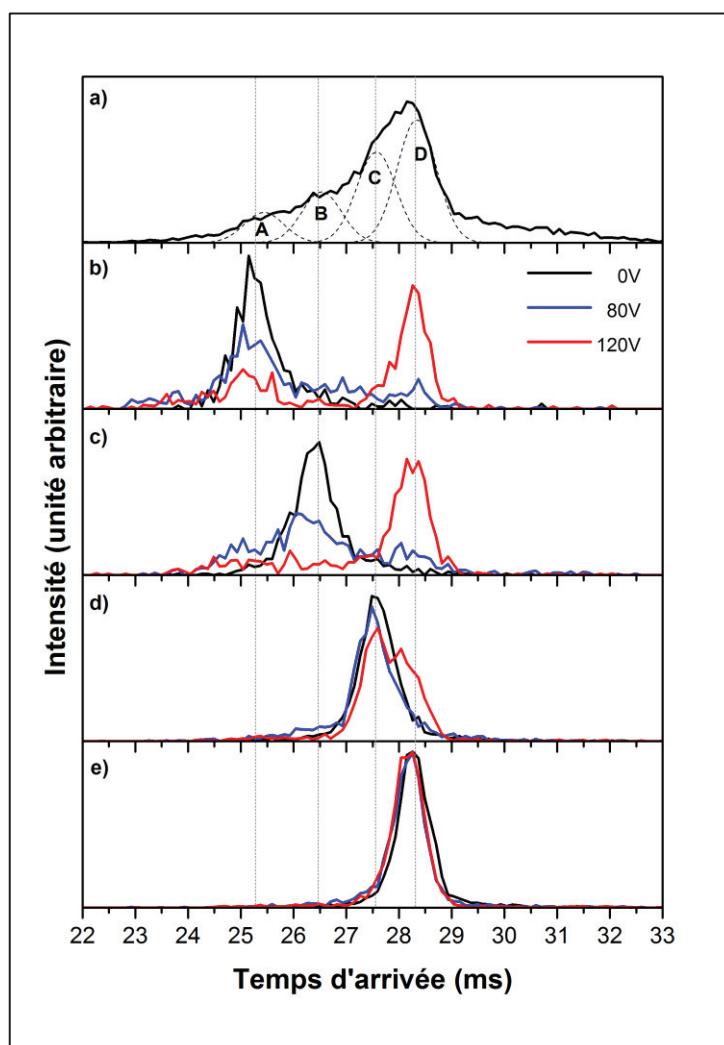


Figure 11. Profils de mobilité de l'état de charge 2^+ du peptide greffé. a) Profil global. b, c, d, e) sélection de chaque famille conformationnelle et activation par collision.

Dans un deuxième temps, nous étudions les éventuelles interconversions entre les familles conformationnelles. Pour cela, l'appareil est utilisé en mode tandem-IMS, et la fenêtre de sélection à la sortie du premier tube de dérive est réglée successivement au temps d'arrivée de chacune des familles. Les profils de mobilité des familles A à D sélectionnées sont tracés en noir sur la figure 11.b, c, d et e. On remarque que les profils de mobilité des familles C et D sont fins, alors que ceux des familles A et B sont plus élargis à la base du pic. Cela peut traduire une interconversion spontanée entre les familles A et B.

Par la suite, chacune des espèces sélectionnées en mobilité est activée dans l'entonnoir à ions situé entre les deux tubes de dérive, grâce à une différence de potentiel de 80 V puis 120 V. Les profils de mobilité résultants sont représentés sur la figure, respectivement en bleu et en rouge. Lorsque le pic A est sélectionné (figure 11.b) et activé à 80 V, celui-ci s'élargit vers les temps d'arrivée des familles C à D. Lorsque plus d'énergie est donnée au système (courbe rouge), le pic de mobilité D augmente, et le signal au temps d'arrivée des familles A et B diminue. La même expérience est ensuite réalisée en sélectionnant le pic B (figure 11.c). Pour une différence de potentiel de 80 V, le signal au temps d'arrivée des pics A et D augmente sur le profil de mobilité, puis, quand la différence de potentiel est accrue à 120 V, le pic D augmente considérablement et l'intensité des autres pics diminue. Ces résultats sur l'activation des familles A et B tendent à montrer une interconversion entre les familles A et B, puis des familles A et B vers la famille D. Lorsque le pic D est sélectionné (figure 11.e), l'activation par collision provoquée par une différence de potentiel de 80 ou 120 V ne modifie par l'allure du pic : ce dernier reste fin. On en déduit que cette famille conformationnelle est la plus stable. Enfin, lorsque le pic C est sélectionné, ce dernier est fin, ce qui indique l'absence d'interconversion spontanée avec les autres familles conformationnelles. De plus, avec une activation de 80 V, le profil de mobilité ne varie pas. Il faut une activation plus importante pour qu'une part des ions soit convertie vers le pic D. Il est possible d'interpréter ces résultats par le fait que les familles A, B et D font partie d'un même groupe de conformations au sein duquel des interconversions peuvent avoir lieu, alors qu'aucune interconversion n'a lieu entre ce groupe et la famille C. Dans cette hypothèse, l'augmentation du signal du pic D lorsque le pic C est activé par une différence de potentiel de 120 V par le fait que des intermédiaires entre les familles B et D possèdent le même temps de dérive que le pic C, et sont sélectionnés en même temps. On pense que les isomère A, B et D correspondent à un sens de greffage (Q-CAAKAAC-R) et l'isomère C à l'autre sens de greffage (R-CAAKAAC-Q).

Pour confirmer l'hypothèse des différents sites de greffage, des calculs de modélisation moléculaire sont en cours afin d'obtenir les structures possibles pour l'état de charge 2+. Des premiers calculs théoriques de section efficace de collision (voir tableau 3) ont été menés pour chacune des formes neutres et zwitterion du peptide marqué, avec la méthode des trajectoires. Ces différents isomères sont désignés dans le tableau 3 par la position des éventuelles charges positives et négatives sur le peptide (une charge positive est toujours portée par chacun des chromophores). Les calculs tendent à montrer que les différentes formes du système R-CAAKAAC-Q possèdent des CCS très similaires (entre 372 et 378 Å²) alors que les CCS des isomères de la forme Q-CAAKAAC-R sont plus espacées (entre 362 et 397 Å²). Compte tenu de ces calculs, on attend bien trois pics en

mobilité pour la forme Q-CAAKAAC-R et un seul pic en mobilité, regroupant les trois isomères, pour la forme R-CAAKAAC-Q, ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux.

	Peptide neutre CAAKAAC	Zwittérion C ⁺ AAKAAC ⁻	Zwitérion CAAK ⁺ AAC ⁻
R-CAAKAA-Q	378 Å ²	372 Å ²	375 Å ²
Q-CAAKAAC-R	362 Å ²	382 Å ²	397 Å ²

Tableau 3. Valeurs des CCS théoriques pour chaque isomère (peptide neutre ou zwitterion) de l'état de charge 2+ du système pour les deux sens de greffage des chromophores.

C.2. FRET d'action sur un conformère spécifique

L'efficacité de FRET est ensuite estimée pour chacune des conformations de l'état de charge 2+ en mesurant le taux de fragmentation de l'accepteur spécifique du FRET. Dans ces expériences, chaque famille conformationnelle est sélectionnée en mobilité. Puis, afin de se débarrasser des impuretés ayant le même temps de dérive que l'espèce étudiée, le quadrupôle est utilisé en tant que filtre de masse pour sélectionner l'espèce [RQ]²⁺. Enfin, les ions sont irradiés par le laser continu dans la cellule de collision. Les taux de fragmentation sont calculés à partir des fragments m/z 465 et 531. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 12.

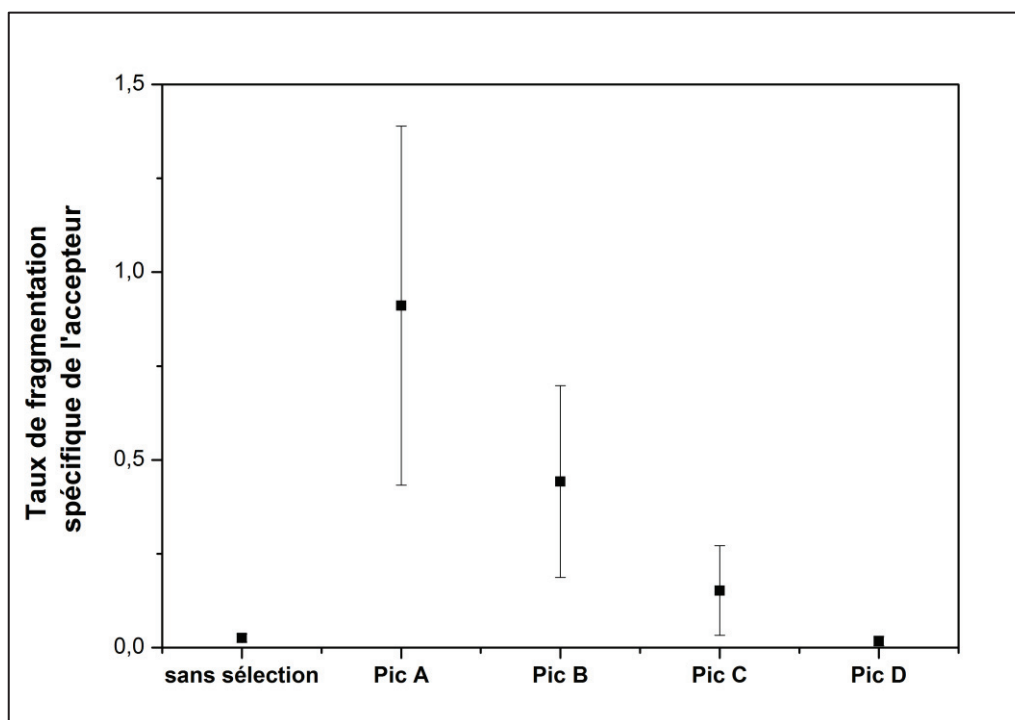


Figure 12. Taux de fragmentation spécifique de l'accepteur pour les différentes familles conformationnelles de l'espèce [RQ]²⁺.

Les résultats montrent différents taux de fragmentation de l'accepteur selon le conformère sélectionné. En effet, sans sélection d'un conformère, le taux de fragmentation global de l'état de charge 2+ est de 0.026. Ce taux augmente à 0.91 lorsque le pic A est sélectionné, puis diminue respectivement à 0.44 ; 0.15 et 0.017 lorsque les pics B, C et D sont sélectionnés. Il est à présent intéressant de vérifier que le taux de fragmentation global mesuré pour l'espèce $[RQ]^{2+}$ correspond à la moyenne des taux de fragmentation de chacun des conformères, pondérée par l'aire du pic de mobilité de chaque conformère. La moyenne ainsi calculée est de 0.23, ce qui est bien supérieur au taux de fragmentation global mesuré. Cette différence peut s'expliquer par l'importance des barres d'erreur sur les mesures de FRET, du fait de la faible intensité de signal des fragments caractéristiques, car la longueur d'onde utilisée n'est pas optimale pour l'absorption du chromophore donneur.

Les sections efficaces de collision de chacune des familles conformationnelles sont mesurées. Les valeurs déterminées pour les familles A, B, C et D sont respectivement 360 ; 372 ; 391 et 405 Å². On a donc une efficacité de FRET plus importante pour les conformères les plus compacts, et cette efficacité diminue lorsque la section efficace de collision augmente, et donc que le système se déplie.

Des calculs sur ces systèmes sont en cours. D'après ces derniers, il semble que les isomères B et D correspondent à des formes zwitterion du peptide, D étant la forme la plus stable, ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux. Toujours d'après les calculs, la forme A est la plus compacte. Pour le second sens de greffage, les calculs prévoient trois structures ayant la même section efficace de collision, ce qui est en accord avec la présence d'un seul pic C expérimental.

Par ailleurs, pour un peptide de petite taille, on attend des taux de fragmentation spécifique de l'accepteur plus importants que ceux mesurés. Le fait que les taux mesurés expérimentalement soient faibles peut s'expliquer par la présence de charges supplémentaires dans la forme zwitterion, ce qui interfère avec le transfert d'énergie électronique.

V. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre nous avons montré la possibilité d'effectuer des mesures de FRET d'action sur un conformère spécifique sélectionné à la fois en masse et en mobilité, avec l'appareil laser-IMS. Les résultats obtenus sur le peptide greffé ont permis de mettre en évidence le lien entre l'efficacité de fragmentation par FRET et la conformation du système : l'efficacité de fragmentation est plus importante pour les ions ayant des sections efficaces de collision petites que pour les ions moins compacts, ayant des sections efficaces de collisions plus grandes.

Cette corrélation entre section efficace de collision et efficacité de FRET est valable pour le système étudié car celui-ci est un peptide de petite taille. L'augmentation de la section efficace de collision correspond donc à une élongation du peptide et un éloignement des chromophores. Cependant sur un système plus gros, comme une protéine, un dépliement local, qui induirait l'éloignement des chromophores, peut être accompagné d'une compaction globale du système et donc d'une diminution de la section efficace de collision. Dans des expériences futures, il serait donc intéressant d'effectuer des mesures de FRET sur des conformères spécifiques d'un système plus grand, tel qu'une protéine. Cela permettrait également d'étudier des systèmes présentant un intérêt biologique.

Enfin, dans les résultats présentés dans ce chapitre, les mesures du taux de fragmentation spécifiques du FRET ont une grande barre d'erreur, car le laser utilisé correspond à une longueur d'onde éloignée du maximum d'absorption du chromophore donneur. Il serait intéressant de répéter ces expériences avec un laser continu à une autre longueur d'onde, proche de 505 nm, ou avec le laser OPO nano-seconde, afin d'obtenir une meilleure efficacité de fragmentation et une barre d'erreur plus faible.

1. Forster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann. Phys., 1948. **2**(1-2): p. 55-75.
2. Stryer, L. and R.P. Haugland, *Energy Transfer - A Spectroscopic Ruler*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1967. **58**(2): p. 719-8.
3. Heyduk, T. and J.C. Lee, *Application of fluorescence energy transfer and polarization to monitor Escherichia coli cAMP receptor protein and lac promoter interaction*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1990. **87**(5): p. 1744-1748.
4. Paulsen, H. and W. Wintermeyer, *tRNA topography during translocation: steady-state and kinetic fluorescence energy-transfer studies*. Biochemistry, 1986. **25**(10): p. 2749-2756.
5. Wang, S., et al., *Distribution of phospholipids around gramicidin and D-beta.-hydroxybutyrate dehydrogenase as measured by resonance energy transfer*. Biochemistry, 1988. **27**(6): p. 2033-2039.
6. Burgun, C., A. Waksman, and G. Crémel, *pH-induced reorganization of synaptic membrane as revealed by fluorescence anisotropy and energy transfer*. Arch. Biochem. Biophys., 1991. **286**(2): p. 394-401.
7. Dexter, D.L., *A Theory of Sensitized Luminescence in Solids*. The Journal of Chemical Physics, 1953. **21**(5): p. 836-850.
8. Ha, T., et al., *Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996. **93**(13): p. 6264-6268.
9. Shera, E.B., et al., *Detection of single fluorescent molecules*. Chem. Phys. Lett., 1990. **174**(6): p. 553-557.
10. Danell, A.S. and J.H. Parks, *FRET measurements of trapped oligonucleotide duplexes*. Int. J. Mass Spectrom., 2003. **229**(1-2): p. 35-45.
11. Dashtiev, M., et al., *Clear Evidence of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Gas-Phase Ions*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2005. **16**(9): p. 1481-1487.
12. Talbot, F.O., et al., *Fluorescence Resonance Energy Transfer in Gaseous, Mass-Selected Polyproline Peptides*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(45): p. 16156-16164.
13. Gabelica, V., et al., *Electron Photodetachment Dissociation of DNA Anions with Covalently or Noncovalently Bound Chromophores*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. **18**(11): p. 1990-2000.
14. Daly, S., et al., *Action-FRET: Probing the Molecular Conformation of Mass-Selected Gas-Phase Peptides with Forster Resonance Energy Transfer Detected by Acceptor-Specific Fragmentation*. Anal. Chem., 2014. **86**(17): p. 8798-8804.
15. Larraillet, V., et al., *Activated-Electron Photodetachment Dissociation for the Structural Characterization of Protein Polyanions*. Anal. Chem., 2009. **81**(20): p. 8410-8416.
16. Albrieux, F., et al., *Conformation of Polyalanine and Polyglycine Dications in the Gas Phase: Insight from Ion Mobility Spectrometry and Replica-Exchange Molecular Dynamics*. J. Phys. Chem. A, 2010. **114**(25): p. 6888-6896.
17. *Handbook of Capillary Electrophoresis*. 2nd edition, 1997: p. 216.
18. Arbeloa, I.L. and P.R. Ojeda, *Molecular forms of rhodamine B*. Chemical Physics Letters, 1981. **79**(2): p. 347-350.

Conclusion et Perspectives

Ce travail de thèse a consisté, premièrement, à développer un appareil couplant spectrométrie de mobilité ionique, spectrométrie de masse et spectroscopie laser, deuxièmement à tester et caractériser cet appareil sur des systèmes connus, déjà caractérisés sur d'autres appareils ne couplant pas ces trois techniques en une expérience, et troisièmement, à montrer les diverses possibilités offertes par ce couplage au travers d'expériences menées sur des systèmes modèles.

La première partie de ce mémoire de thèse présente le travail de développement instrumental. Une description détaillée de chaque partie de l'appareil est donnée. Les différents modes de fonctionnement sont également décrits, à savoir un simple couplage IMS-MS, un couplage tandem IMS-MS et enfin un couplage des trois techniques : laser-IMS-MS. Les principales difficultés rencontrées ainsi que les réglages effectués lors du montage sont présentés. Au travers des tout premiers résultats expérimentaux, les caractéristiques de l'appareil sont déterminées (résolution, fréquence de fonctionnement...). Il s'agit de la deuxième génération d'appareil de mobilité ionique ayant été développé dans notre groupe. Il présente l'avantage de permettre les mesures de mobilité ionique en tandem, et le signal obtenu avec ce nouvel appareil est supérieur à celui obtenu avec l'appareil précédent de trois ordres de grandeur, ce qui permet de se diriger vers un couplage laser. En effet, la faible intensité du signal obtenu sur l'appareil précédent rendait difficiles les mesures spectroscopiques. L'un des objectifs de ce nouvel appareil est donc de pouvoir réaliser des mesures de spectroscopie d'action sur des isomères sélectionnés en mobilité. Lyon est en effet reconnu pour les spectres d'action sur des peptides, et l'enjeu de ma thèse était de coupler la spectroscopie à la mobilité ionique. Dans la suite du mémoire, des résultats sur trois exemples de spectroscopie d'action ont été donnés : la photo-isomérisation, le photo-détachement d'électrons et le FRET d'action. Ces expériences de spectroscopie sont parfois complétées par de l'activation par collisions, également permise par le montage expérimental.

Ensuite, nous avons montré la possibilité d'effectuer des mesures de photo-isomérisation sur l'appareil, en étudiant l'isomérisation cis/trans d'un système constitué d'un pyrène conjugué à une pyridine via une chaîne carbonée. Dans ce chapitre nous avons pu mesurer le taux d'isomérisation trans $\rightarrow$ cis du système en irradiant sélectivement l'isomère trans, piégé après une première séparation en mobilité. Ce type de spectroscopie d'action est un peu particulier puisqu'on ne regarde pas par spectrométrie de masse les changements induits par laser, mais par variation du profil de mobilité ionique. Les informations obtenues, à savoir un changement de conformation, ne sont pas accessibles par spectrométrie de masse, et requièrent l'utilisation de la mobilité ionique en tandem. En effet, comme il n'y a ni fragmentation, ni perte d'un électron ou d'un proton, aucune différence n'apparaît sur le spectre de masse. Par observation de la variation des profils de mobilité nous avons pu obtenir des spectres d'action de photo-isomérisation (PISA). Par la suite nous avons étudié l'influence sur la photo-isomérisation de la complexation du système avec différents éthers couronne, variant par la taille de la cavité et par la présence ou non de benzène. Nous avons ainsi pu observer à la fois le décalage du spectre optique et la variation du taux maximal d'isomérisation en fonction de la complexation ou non du système avec les éthers couronne. Des simulations nous ont

ensuite permis d'interpréter ces variations des propriétés optiques en comprenant les interactions entre le système et l'éther couronne. Il serait ensuite intéressant de comparer les effets de la complexation avec ces mêmes éthers couronne sur l'isomérisation d'autres systèmes conjugués. Les complexes du MPVP avec l'éther-couronne étant non-covalents, les mesures de photo-isomérisation ne peuvent être effectuées en solution, du fait de l'équilibre entre la formation et la dissociation des complexes. L'étude du système en phase gazeuse a permis de s'affranchir de cette contrainte en sélectionnant spécifiquement un des isomères.

Ces expériences nous ont donc permis de montrer la possibilité de déclencher et de suivre de manière quasi-instantanée des réactions d'isomérisation. Cette technique peut ensuite être transférée sur d'autres systèmes, ayant plus d'intérêt biologique.

Puis, grâce à des expériences de photo-détachement d'électron, nous avons étudié la relation entre la conformation d'un système et ses propriétés optiques. Nous avons pour cela travaillé avec un peptide modèle, marqué par un chromophore absorbant dans le visible, dont le principal moyen de désexcitation est le détachement d'électron. En utilisant les possibilités offertes par l'appareil de mobilité ionique en tandem, nous avons obtenu des spectres optiques en mesurant le taux de photo-déplétion de l'ion parent. Nous avons ainsi obtenu les spectres de photo-détachement d'électron spécifiques des différents états de charge du système, ce qui peut être obtenu sur un appareil couplant spectroscopie et spectrométrie de masse. L'avantage donné par l'appareil IMS-laser-IMS est que pour un même état de charge, nous avons identifié plusieurs conformations et mesuré les spectres d'action spécifiques de chacune de ces conformations. La même expérience, menée sans la mobilité ionique, conduit à des spectres moyennés sur l'ensemble des isomères, sans aucune information structurale.

Grâce à la possibilité de l'appareil d'effectuer de l'activation par collisions, nous avons également pu provoquer un changement de conformation par transfert de proton induit par collisions. Nous avons ainsi exploité la possibilité de faire simultanément des activations par collision et par irradiation laser pour étudier les effets d'un changement de conformation sur la variation des propriétés optiques d'un système : on s'oriente ainsi vers le contrôle des propriétés optiques par activation par collision. Cela ouvre la voie à l'étude et le contrôle de systèmes optiques aux propriétés modulables et/ou photo-actives.

Enfin, nous avons mis en évidence la possibilité d'effectuer des mesures de FRET d'action sur l'appareil laser-IMS, et réalisé pour la première fois des expériences de FRET d'action en phase gazeuse sur des conformères spécifiques. Nous avons pour cela utilisé un système constitué d'un peptide marqué par deux chromophores, et mesuré le taux de fragmentation spécifique du FRET par spectrométrie de masse. Nous avons obtenu des taux de fragmentation différents pour chaque état de charge du système, reproduisant ainsi des résultats obtenus sur un montage de spectroscopie laser sur des ions piégés dans un spectromètre de masse. Puis, dans un même état de charge, nous avons, par mobilité ionique, identifié différentes familles conformationnelles et mesuré les variations du taux de fragmentation par FRET selon le conformère sélectionné en mobilité. Cela nous a permis

de montrer le lien entre la conformation d'un système et l'efficacité de fragmentation caractéristique d'un transfert d'énergie électronique, même sur un système de petite taille. Ces informations ne sont pas accessibles par simple spectrométrie de masse, du fait de l'impossibilité de différencier différentes familles conformationnelles dans un même état de charge. Ce type d'expérience n'est par ailleurs pas non plus accessible par des mesures en solution, dans lesquelles il peut y avoir des mélanges conformationnels.

Pour ces expériences, nous avons utilisé un laser continu ne permettant des mesures que pour une longueur d'onde unique, n'étant pas située au niveau du maximum d'absorption des chromophores. Nous avons par conséquent obtenu un signal d'une intensité relativement faible, générant de grandes barres d'erreur au niveau de la détermination du taux de fragmentation. Il serait intéressant de reproduire ces expériences en utilisant un autre laser, afin d'irradier le système avec une longueur d'onde plus optimale, afin de réduire l'imprécision des mesures.

Les résultats expérimentaux présentés dans ce mémoire de thèse sont à considérer comme des preuves de la possibilité d'effectuer diverses formes de spectroscopie d'action sur l'appareil laser-IMS que nous avons développé. C'est pourquoi les systèmes étudiés sont des peptides ou des molécules « modèles », ne présentant pas d'intérêt biologique particulier. A travers ces résultats, nous avons montré que l'utilisation de la mobilité ionique en tandem et du couplage de la mobilité ionique avec la spectroscopie laser permettent un niveau de description des systèmes bien plus détaillé que chaque technique séparément, et nous avons montré le lien entre la conformation de systèmes peptidiques et leur propriétés optiques. Même sur de petits systèmes il est possible d'observer des phénomènes qu'on ne verrait pas sans cela. Il serait par la suite intéressant de transférer ces mêmes types d'expériences sur d'autres systèmes, de plus grande taille et présentant plus d'intérêt biologique, tels que des protéines entières et des complexes protéiques. A travers l'analyse de complexes protéiques, il serait possible de mener des études sur l'agrégation des protéines, et en particulier sur celles impliquées dans les maladies de type Alzheimer ou Parkinson. On sait qu'il y a coexistence de complexes de tailles différentes et de formes différentes, ce qui rend une étude précise impossible en solution. Comme l'a montré Bowers [1, 2], la mobilité ionique peut apporter des informations sur ce type de système.

En associant à la mobilité ionique le FRET, qui en solution est particulièrement adapté à l'étude des complexes, on espère pouvoir recouper des informations de biologie structurale à différents niveaux de descriptions. En effet, les expériences de FRET nous ont permis d'établir que l'efficacité de fragmentation par FRET et les mesures de CCS par spectrométrie de mobilité ionique vont bien dans le même sens, c'est-à-dire que la fragmentation par FRET diminue quand la CCS augmente, ce qui est attendu pour des systèmes de petite taille où la distance entre les chromophores est directement liée au dépliement du peptide. En revanche, pour des systèmes de plus grande taille, tels que des protéines, on n'attend pas nécessairement une diminution de l'efficacité de fragmentation par FRET avec l'augmentation de la CCS. Le couplage du FRET d'action avec la spectrométrie de mobilité ionique permettra alors de réellement recouper des informations locales,

obtenues par spectroscopie, avec les informations structurales globales, obtenues par mobilité ionique.

Par ailleurs, l'appareil laser-IMS possède une fonction supplémentaire qui n'a pas été exploitée pour les résultats présentés : il est également possible de réguler la température du tube de mobilité par un système de circulation de fluide dans l'épaisseur de l'enveloppe du tube. Des études de dynamique et de thermodynamique des changements de conformation dans des systèmes moléculaires peuvent donc être envisagées sur ce montage. Cela permettrait, entre autre, d'étudier les changements de conformation des protéines. Au-delà des travaux menés par Clemmer [3-5], le fait de contrôler la température permettra d'avoir accès aux enthalpies et entropies associées aux changements de conformation et à la dissociation des complexes. Enfin, le couplage de la mobilité ionique en tandem avec la spectroscopie optique permettrait non seulement des études résolues en conformation, mais aussi des mesures de dynamique menées avec une sonde optique : l'idée serait de déclencher des changements de conformations par irradiation laser. L'appareil laser-IMS permet donc, en plus de l'analyse structurale, de sonder la dynamique des systèmes, ce qui ouvre la voie à des expériences de modulation de réactions, en contrôlant le déclenchement de réactions photo-activables.

1. Bernstein, S.L., et al., *Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease*. Nat. Chem., 2009. **1**(4): p. 326-331.
2. von Helden, G., et al., *Carbon cluster cations with up to 84 atoms: structures, formation mechanism, and reactivity*. J. Phys. Chem., 1993. **97**(31): p. 8182-8192.
3. Kurulugama, R.T., et al., *Development of a high-throughput IMS-IMS-MS approach for analyzing mixtures of biomolecules*. J. Proteomics, 2008. **71**(3): p. 318-331.
4. Shi, H.L., et al., *Solution Dependence of the Collisional Activation of Ubiquitin M+7H (7+) Ions*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2014. **25**(12): p. 2000-2008.
5. Koeniger, S.L., et al., *An IMS-IMS Analogue of MS-MS*. Anal. Chem., 2006. **78**(12): p. 4161-4174.

Annexe 1 :

Action-FRET : Probing the Molecular Conformation of Mass-Selected Gas-Phase Peptides with Förster Resonance Energy Transfer Detected by Acceptor-Specific Fragmentation

Action-FRET: Probing the molecular conformation of mass-selected gas phase peptides with FRET detected by acceptor specific fragmentation.

Steven Daly,^{a,b} Frédéric Poussigue,^{a,c} Anne-Laure Simon,^{a,b} Luke MacAleese,^{a,b} Franck Bertorelle,^{a,b} Fabien Chiot,^{a,c} Rodolphe Antoine,^{a,b} Philippe Dugourd.^{a,b}

^a Université de Lyon, F-69622, Lyon, France

^b CNRS et Université Lyon 1, UMR5306, Institut Lumière Matière

^c CNRS et Université Lyon 1 UMR 5280, Institut des Sciences Analytiques

FRET, Mass spectrometry, Ion mobility, gas phase biomolecules, action spectroscopy

ABSTRACT: The use of Förster resonance energy transfer (FRET) as a probe of the structure of biological molecules through fluorescence measurements in solution is well attested. The transposition of this technique to the gas phase is appealing since it opens the perspective of combining the structural accuracy of FRET with the specificity and selectivity of mass spectrometry (MS). Here, we report FRET results on gas phase poly-alanine ions obtained by measuring FRET efficiency through specific photo-fragmentation rather than fluorescence. The structural sensitivity of the method was tested using commercially-available chromophores (QSY 7 and carboxyrhodamine 575) grafted on a series of small, alanine based peptides of differing sizes. The photo-fragmentation of these systems was investigated through action-spectroscopy, and their conformations were probed using ion mobility spectrometry (IMS) and Monte Carlo-minimization (MCM) simulations. We show that specific excitation of the donor chromophore results in the observation of fragments that are specific to the electronic excitation of the acceptor chromophore. This shows that energy transfer took place between the two chromophores and hence that the action-FRET technique can be used as a new and sensitive probe of the structure of gas phase biomolecules, which opens perspectives as a new tool in structural biology.

Introduction

Förster resonance energy transfer (FRET) is a widely used probe of molecular structure in solution.¹⁻⁴ It requires a photon source to electronically excite the so-called ‘donor chromophore’, and a light harvesting setup to detect either the ‘donor’ or ‘acceptor’ chromophore fluorescence. The occurrence of FRET is then usually evidenced through a decrease in the fluorescence of the donor chromophore (quenching), with the concurrent onset of the fluorescence of the acceptor chromophore or by changes in fluorescence decay times. The interpretation of FRET results relies on the known distance dependence of the effect, and on the possibility to graft specific chromophores at relatively well-defined sites on a molecule. FRET is then used to characterize the distance between the chromophores and hence separation between the grafting sites, although extracting exact distances is difficult due to the uncertainty of the exact orientation of the transition dipole moments of the chromophores. This allows the use of FRET to probe intra- or inter-molecular distances, especially the change in distance, depending on whether the chromophores are attached to the same or to different molecules.

The versatility of FRET makes it a powerful tool to assess the conformation and/or association of molecules. It has been shown that the overall structure of complex molecular edifices can be preserved in the gas-phase using soft ionization

techniques.^{5,6} Therefore the development of techniques capable of probing FRET in the gas phase is of high interest, and could be integrated into a global approach for structure determination of proteins and protein complexes.⁷⁻⁹

There are few techniques that allow structural investigation of large systems in vacuo.¹⁰⁻¹² One of the only techniques that can be successfully applied to large molecular edifices is ion mobility spectrometry (IMS), which provides global information on the overall shape of the system.¹³⁻¹⁵ Associated with fluorescence spectroscopy, a few examples of gas-phase FRET have been recorded that very nicely demonstrate the possibility to observe and use FRET in the gas-phase.¹⁶⁻²³

However, fluorescence detectors are difficult to implement efficiently in mass spectrometers and their use has been limited to a small number of systems. Such ‘out-coupling’ of light is difficult due to restriction of the solid angle of light detection imposed by the geometry of the mass spectrometer. By contrast, ‘in-coupling’ of light – that is the coupling of a mass spectrometer with a light source such as a laser – is simpler and has already been implemented by many groups.²⁴⁻²⁷ The relative ease of ‘in-coupling’ lends itself to an alternative methodology for monitoring the absorption of photons by ions in a mass spectrometer – namely action spectroscopy. Action spectroscopy monitors the ion photodissociation as a function of the photon energy and this photodissociation is assumed to be correlated to the absorption

cross-section of the ion. Action spectroscopy has been widely used to record the photodissociation spectra for a broad range of molecular ions and complexes across a large range of photon energies.²⁸⁻³⁶ Due to the fact that detection of fragment ions is more sensitive than single photon counting methods, such an action spectroscopy methodology for the measurement of FRET will provide a more sensitive probe of molecular structure of gas phase biomolecules, simultaneously with usual MS (including multistage) measurements.

In the following, we show that the high sensitivity of action-spectroscopy can be used as a straightforward tool to detect FRET in the gas phase. A detection scheme will be presented that enables the measurement of FRET by fragment ion detection only.³⁷ Chromophores possessing a large overlap of the fluorescence spectrum of the 'donor' with the absorption spectrum of the 'acceptor', and with fragmentation of the 'acceptor' specific to photo-dissociation were chosen and characterized. Results on a series of alanine based peptides of increasing size demonstrate the feasibility and sensitivity of the action-FRET methodology as a tool for the study of the structure of biomolecules in the gas-phase.

Experimental and theoretical Section

Peptides and Chromophores. The choice of the peptides and chromophores will be discussed in greater detail in the following section. The acceptor chromophore is QSY7 N-succinimidyl ester (Life technologies), a dark quencher absorbing at 560 nm in solution and known to fragment efficiently at 532 nm in the gas phase.³⁸ The donor chromophore is 5-carboxyrhodamine 575 N-succinimidyl ester (rh575) (Life Technologies), absorbing at 550 nm and fluorescing at 575 nm in solution. Rh575 was also used as the donor chromophore by Talbot *et al.*¹⁸ and both the fluorescence excitation and emission spectra along with photo-fragmentation mass spectra have been previously studied in detail.³⁹ Both chromophores are designed to be functionalized onto primary amines, and thus peptides containing two primary amine groups only were chosen. For the initial study, the simple tri-peptide N-alanine-alanine-lysine-OH (AAK) was chosen to ensure that the chromophores remain spatially close to each other in the doubly grafted species. To study the distance dependence of the measured energy transfer, a series of poly-alanine based peptides varying in size from 7 to 19 residues were chosen with a lysine residue at both C- and N-terminus, the N-terminus being capped with an acetyl moiety to meet the condition of only 2 primary amines per molecule. Additionally, to aid the aqueous solubility histidine (H) was inserted at regular intervals along the chain. Thus, the following three peptides were chosen: KA₂HA₂K, KA₅HA₅K, and KA₅HA₅HA₅K.

The chromophores were grafted both individually and simultaneously onto the peptides. The two chromophores were dissolved in DMSO and the peptides in water, where the concentrations were approximately 10 mM in each case. N-succinimidyl esters are reactive with water, and the hydrolysis is competitive with the amide reaction required for grafting. Thus, it was necessary to use 500 μ l DMSO as the reactive medium for the grafting reactions. For the grafting of either donor or acceptor chromophore to the peptide (resulting in both singly and doubly grafted species) 10 μ l of the chromophore and peptide solutions were added to the reaction medium. For the double grafting reaction with both

chromophores, the volumes were adjusted to 14 μ l, 4 μ l and 12 μ l for rh575, QSY7 and peptide solutions respectively, in order to optimize the grafting ratios. The reaction solutions were placed in an oven at 60 °C and left for at least 12 hours, after which the solutions were tested to ensure the reaction was complete. It is important to note that it is possible for each chromophore to graft to the N-terminus or C-terminus primary amine, and thus there will be two doubly grafted species present; (rh575-peptide-QSY7) and (QSY7-peptide-rh575). Examination of the CID mass spectra shows that both species are present in approximately equal amounts (see figure S5). Separation of the two species is not possible; hence all results on the doubly grafted species presented in this work are for this mixture of these two forms. For simplicity we will refer in the text to the doubly grafted species as (rh575-peptide-QSY7). For use in the electrospray ionization source, 20 μ l of the reaction solution was diluted in 3 ml of 1:1 water/methanol with 3 μ l acetic acid.

Mass spectrometry and optical spectroscopy. The experimental setup used to perform the experiments presented in this paper has been described in detail previously.⁴⁰ Briefly, a linear quadrupole ion trap mass spectrometer (LTQ, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) was used for ion preparation, ion selection and trapping, fragmentation (collision induced dissociation (CID) and photodissociation) and subsequent mass analysis. The back panel of the vacuum manifold was modified by drilling a hole and fitting a quartz window (30 mm diameter and 5 mm thickness). This window was positioned in front of the linear ion trap such as to allow the direct irradiation of trapped ions via a central hole in the trap exit electrode.

The light source used is a Panther EX OPO pumped by the third harmonic (355 nm) of a Surelite II Nd:YAG laser (Continuum, Santa Clara, CA). A repetition rate of 10 Hz and pulse-widths of the order of 5 ns were used. The visible portion of the spectrum was used directly via the signal beam of the OPO (410 – 700 nm), which is collimated and refocused with a long focal distance lens of 500mm. Pulse energies were kept between 0.9 to 1.1 mJ/pulse to avoid saturation. A mechanical shutter, synchronized with the mass spectrometer, is used to stop the beam at all times except the 'ion activation window' – that is the time after ion accumulation and before the mass analysis. A single laser pulse was used for the irradiation of the trapped ions. When irradiating ions the normalized collision energy is kept at zero. Laser power is monitored continuously using the reflection portion of the beam upon passing through an 85:15 beam splitter placed at 45° with respect to the beam. The power is monitored using a power meter (Ophir-Spiricon GmbH, Ahrensburg, Germany). The value of the power used for normalization is taken as the average value over the duration of a measurement, of the order of 5 minutes per wavelength.

Ion mobility mass spectrometry. Ion mobility (IMS) measurements were performed using a custom-built ion mobility spectrometer already described elsewhere.⁴¹ Briefly, a 1 m long drift tube is inserted between an electrospray ionization source and a time-of-flight (ToF) mass spectrometer. Helium at a pressure of 15 Torr is maintained in the drift tube, and the temperature of the whole setup is kept at 300 K. Ions are periodically injected in the drift tube from an hourglass funnel ion trap. Their mass-to-charge ratio and drift

time through the tube are simultaneously measured using the ToF. Ion mobilities and collision cross section (CCS) are finally calculated from the evolution of the ion arrival time distribution as a function of the inverse drift voltage.

Monte Carlo simulations. Structures for the doubly grafted peptides were generated using a Monte Carlo minimization (MCM) approach using the Tinker⁴² suite of programs. The choice of force field is constrained by the requirement that the entire system be modelled, and as such the MMFF94 force field⁴³ was chosen as the most suitable to account for all the necessary parameters. Initial geometries were chosen with all peptide dihedral angles in the trans configuration. For the higher charge states, protons were placed on both the histidine and carboxy moieties. For the lower charge state, one of the additional protons was removed from either the C- terminus or Rh575 carboxy moiety, or from histidine.

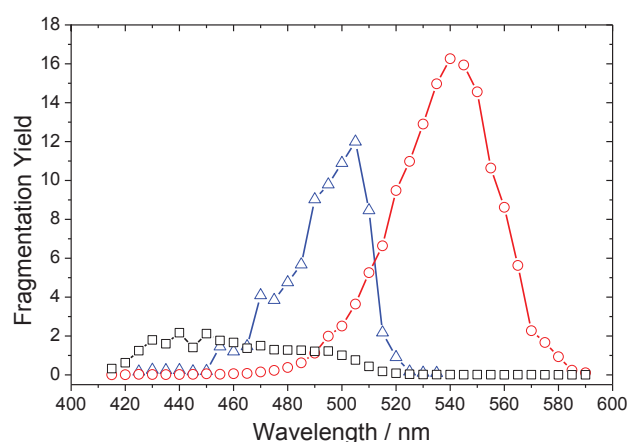


Figure 1. Action spectra of mass-selected (QSY7)⁺ (red circles), (rh575)⁺ (black squares) and (rh575-AAK-rh575)²⁺ (blue triangles). Fragmentation yields are calculated from data

measured in comparable experimental conditions and normalized with respect to the laser power.

Additionally, the two possible doubly grafted species discussed above (donor or acceptor grafted at the N-terminus) were considered. Two observables were extracted from these calculated structures in order to compare to the experimental measurements. The CCSs for simulated structures were calculated in the Mobcal suite of programs using the trajectory method with standard parameters.⁴⁴ The inter-chromophore distance was also extracted calculated as the minimum distance between any two atoms (excluding hydrogen) in the optically active portion of the chromophores (defined as the xanthene moiety plus the side chains).

Results and Discussion

Various processes are involved in action-FRET: the resonant energy transfer itself, as well as the competing radiative and non-radiative relaxation mechanism of both acceptor and donor chromophore. Thus, FRET relies on the choice of a suitable chromophore pair. In order to observe FRET in solution, the chromophores must have clearly resolved absorption bands and there must be a significant overlap of the donor fluorescence spectrum and acceptor absorption spectrum.

Moreover, the resonant energy transfer must happen on a shorter time-scale than the relaxation of the donor chromophore. Similar constraints exist for action-FRET in the gas phase, with the additional constraints that the acceptor chromophore must have a fragmentation pattern that is specific to electronic excitation and that is different from statistical fragmentation that occurs after heating (for example by CID or IRMPD). Therefore acceptor fragmentation must happen on a shorter time-scale than fluorescence and the statistical redistribution of the energy over the entire molecule. Thus, in the doubly grafted species, by monitoring the laser-induced

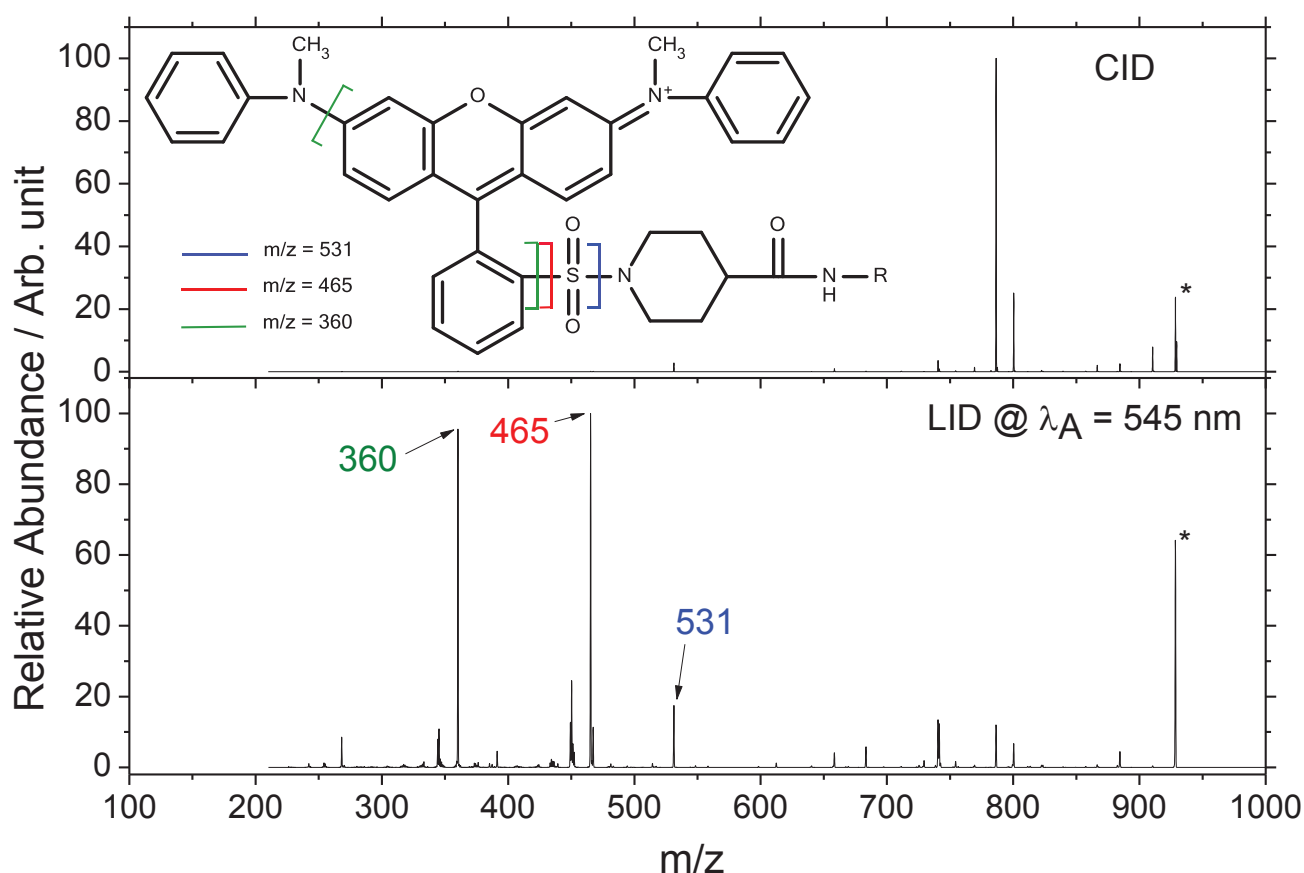


Figure 2. Mass spectra of mass-selected (QSY7-AAK)⁺ ions following CID (top panel) and LID at $\lambda_A = 545$ nm (bottom panel). The asterisk denotes the precursor ion. The top panel shows the structure of the (QSY7)⁺ ion, the R group representing the grafting location onto the peptide. The solid lines indicate the bonds broken to give rise to the major fragments observed in the LID mass spectrum.

dissociation (LID), we conclude that the observation of two absorption bands is due to FRET. It is also important to show that the strength of the observed action-FRET depends on the distance between the two chromophores.

Figure 1 shows the action spectra for mass-selected (rh575)⁺ (black squares) and (QSY7)⁺ (red circles), measured as total fragmentation yield. There is an obvious difference in the amplitude of the fragmentation yield of the two chromophores. Since rh575 has a high quantum yield (0.83 in ethanol) the primary relaxation mechanism can be expected to be fluorescence at the maximum of absorption, which has been shown to be $\lambda = 495$ nm in the gas phase.^{39,45} Hence the action spectrum in this case is weak due to fragmentation being a relatively minor relaxation mechanism, and thus the expected absorption maximum is not observed. As QSY7 is a dark quencher, fluorescence is not available as a relaxation mechanism and hence it fragments efficiently. In both cases, the fragmentation yield was measured as a function of power, and showed a quadratic dependence indicating that the fragmentation is a two photon process. This is consistent with previous study of the photo-fragmentation of rhodamines, which shows the same quadratic dependence at low power.³⁹ For measurement of all spectra presented here, the average power at each wavelength is kept between to 0.9 – 1.1 mW.

The blue triangles in figure 1 show the action spectrum of mass-selected (rh575-AAK-rh575)²⁺. It is a well-known

property of rhodamines that there is a large reduction in the fluorescence quantum yield upon the formation of clusters of rhodamine molecules.⁴⁶ Hence there is a decrease in the importance of fluorescence as a relaxation mechanism, and a concurrent increase in the fragmentation yield is observed for (rh575-AAK-rh575)²⁺. This confirms the interpretation that the non-observance of the expected absorption maximum in the fragmentation yield of (rh575)⁺ is explained by the competition of fluorescence and fragmentation. It also suggests that the action spectrum of (rh575-AAK-rh575)²⁺ can be used as a proxy for the absorption spectrum of (rh575)⁺. Indeed, the position of the peak of $\lambda = 505$ nm for (rh575-AAK-rh575)²⁺ compares favorably with the value of $\lambda = 495$ nm found in previous *in vacuo* measurements.^{18,39} As a conclusion of the action spectroscopy studies, rh575 and QSY7 satisfy the first condition required for FRET; that the absorption bands are clearly distinguished, with absorption maxima of $\lambda_D = 505$ nm and $\lambda_A = 545$ nm respectively.

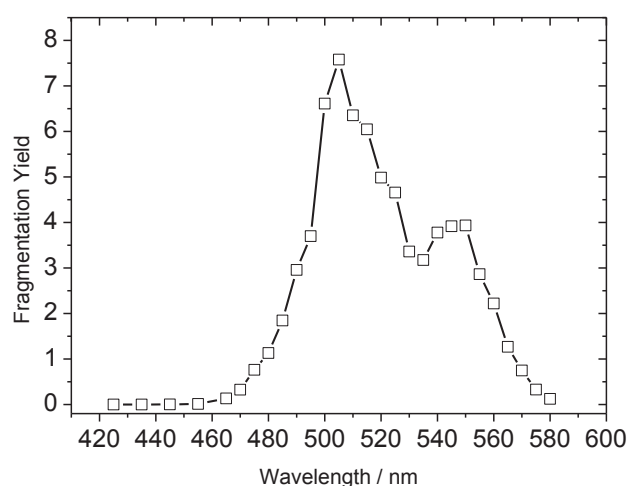


Figure 3. The action spectrum of mass-selected (rh575-AAK-QSY7)²⁺. The fragmentation yield here has been determined using only the LID-specific fragments as shown in figure 2.

Additionally, donor (rh575) emission as observed in the gas phase³⁹ and acceptor (QSY7) absorption spectra show a large overlap. Thus these two chromophores are well suited for FRET in the gas phase.

It must still be established that the fragmentation observed for the acceptor chromophore is LID-specific, so that one can discriminate the origin of the excitation. Figure 2 shows the mass spectra of mass-selected (AAK-QSY7)⁺ following CID (top) and LID at $\lambda_A = 545$ nm (bottom) respectively. There is clearly a large difference in the fragmentation pattern observed due to either heating or electronic excitation. The fragments observed in CID correspond to fragmentation of the peptide backbone. Conversely, the LID mass spectrum is dominated by two fragments at m/z 465 and 360, which correspond to the breaking of the S – C bond alone and combined breaking of the C – N bond between the xanthene and N-methylaniline moiety, see the inset of figure 2. These two latter fragments are not observed in CID and their observation is thus a clear signature that QSY7 has been electronically excited. It is therefore possible to follow FRET by measuring the relative intensity of these fragments as a function of wavelength for the doubly grafted peptides.

Figure 3 shows the result of this procedure for mass selected (rh575-AAK-QSY7)²⁺, giving an action spectrum where only the LID-specific acceptor fragments noted above are monitored. If there were no energy transfer, the same action spectrum as the one shown in figure 1 for QSY7 would be

expected. However, there are clearly two bands present in the spectrum; one at 545 nm corresponding to absorption of the acceptor chromophore, and one at 505 nm which is in the region where the donor chromophore was found to absorb. Observation of the donor chromophore absorption band via measurement of fragments specific to electronic excitation of the acceptor chromophore is direct evidence for electronic energy transfer having occurred.

Considering the data presented in figures 1-3, it is possible to make some general comments about the relative time-scales of the processes occurring following photo-excitation. Firstly, the action spectrum of (rh575)⁺ ions indicates that fluorescence from the excited state occurs on a shorter time-scale than either photo-fragmentation or internal vibrational redistribution (IVR), which is in full agreement with the high fluorescence quantum yield and a fluorescence lifetime of 5.65 ± 0.04 ns in vacuo.⁴⁷ Secondly, the high fragmentation yields observed in (AAK-QSY7)⁺ and the large difference in the observed fragmentation following CID and LID indicates that photo-fragmentation of (QSY7)⁺ occurs on a shorter time-scale than IVR. Finally, the observation of FRET in (rh575-AAK-QSY7)²⁺ indicates that FRET must occur on a shorter time-scale than fluorescence of (rh575)⁺, and again that the subsequent photo-fragmentation of (QSY7)⁺ must occur on a shorter time-scale than IVR. These results are completely consistent with previous fluorescence lifetime measurements of donor-peptide-acceptor systems.¹⁸ An additional important point to note is that the rate of IVR will increase as the length of the peptide is increased. As system size increases there, competition between IVR and direct photo-fragmentation of the acceptor chromophore may arise. As a consequence of this competition, the overall LID-specific fragmentation intensity can be expected to decrease relative to the intensity of the statistical fragments. This competition between IVR and photo-fragmentation will exist as soon as the energy is localized on the acceptor chromophore regardless of the origin of this energy: photo-fragmentation following FRET or following direct absorption will be equally affected. Therefore, if the FRET-mediated photo-fragmentation of the acceptor chromophore is normalized by the direct photo-fragmentation, an IVR independent quantification of action-FRET can be effected.

This discussion lends itself to the following definition of the action-FRET efficiency. The absorption due to the acceptor chromophore is independent of the system in terms of peak position and shape, with a spectrum resembling that shown in figure 1 being recorded when the acceptor chromophore is individually grafted onto each of the peptides used.

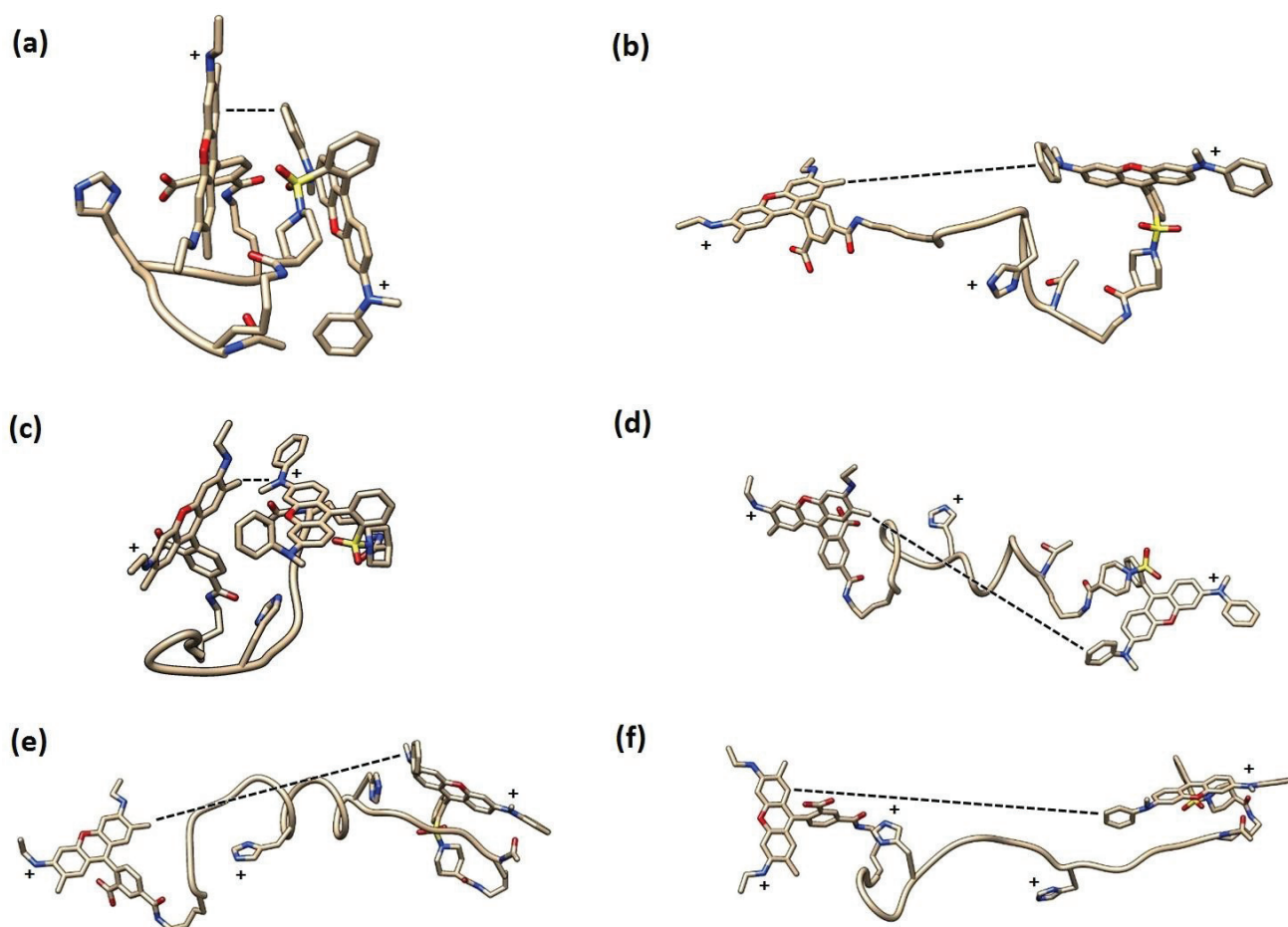


Figure 4. Lowest energy MCM structures for (a) $(\text{Rh575-KA}_2\text{HA}_2\text{K-QSY7})^{2+}$, (b) $(\text{Rh575-KA}_2\text{HA}_2\text{K-QSY7})^{3+}$, (c) $(\text{Rh575-KA}_5\text{HA}_5\text{K-QSY7})^{2+}$, (d) $(\text{Rh575-KA}_5\text{HA}_5\text{K-QSY7})^{3+}$, (e) $(\text{Rh575-KA}_5\text{HA}_5\text{HA}_5\text{K-QSY7})^{3+}$ and (f) $(\text{Rh575-KA}_5\text{HA}_5\text{HA}_5\text{K-QSY7})^{4+}$. The positions of the positive charges for each species are indicated on the figure. The dashed line shows the minimum separation of the chromophores and corresponds to the minimum distance between any two heavy atoms on the optically active region of the chromophore.

Thus, it is possible to take the ratio of the area of the peaks due to the donor and acceptor absorptions as a relative measure of the FRET efficiency. When this procedure is performed on the data for $(\text{rh575-AAK-QSY7})^{2+}$ (see figure S8) a value of 1.75 ± 0.34 is obtained, where the error is determined from the error in the fit. Measurements of the action spectra and an identical fitting procedure were performed on doubly grafted $\text{KA}_2\text{HA}_2\text{K}$, $\text{KA}_5\text{HA}_5\text{K}$, and $\text{KA}_5\text{HA}_5\text{HA}_5\text{K}$ (see figures S9 – S14). Two charge states were observed in each case; $2+$ and $3+$ for $(\text{rh575-KA}_2\text{HA}_2\text{K-QSY7})$ and $(\text{rh575-KA}_5\text{HA}_5\text{K-QSY7})$ and $3+$ and $4+$ for $(\text{rh575-KA}_5\text{HA}_5\text{HA}_5\text{K-QSY7})$. Values of the FRET efficiency between $0.40 - 2.25$ were measured for these species.

To investigate the relationship between the FRET efficiency and the chromophore separation – and hence the structure of the peptides – an independent determination of the structure of the doubly grafted peptides was obtained by measurement of the collision cross sections (CCS) using ion mobility spectrometry (IMS) and use of Monte Carlo-minimization (MCM) simulations for each charge state of the doubly grafted peptides, see table 1 and figure 4. It was not possible to measure experimentally the CCS values for the largest peptide $\text{KA}_5\text{HA}_5\text{HA}_5\text{K}$ due to a low total ion signal. Examination of

the IMS profiles suggests a single conformational family is present for each of the systems studied, which is consistent with the observation of a single low energy conformational family in the MCM data. These conformational families possess the same peptide backbone structure, but differ in the orientation of the chromophores. To account for these conformational families, average values for the cross section and minimum chromophore separation - weighted by the relative energy of each conformer - were used. It is also important to note that the calculations for both doubly grafted species $(\text{rh575-peptide-QSY7})$ and $(\text{QSY7-peptide-rh575})$ were performed, and in each case the peptide backbone structure of the lowest energy

Table 1. Experimental and calculated collision cross sections and FRET efficiency of doubly grafted peptides.

peptide	charge	MCM CCS $\text{\AA}^2$	Exp. CCS $\text{\AA}^2$	FRET efficiency
AAK	2+	337 ± 4	324	1.75 ± 0.12
$\text{KA}_2\text{HA}_2\text{K}$	3+	445 ± 3	508	1.02 ± 0.25
	2+	374 ± 3	377	1.72 ± 0.44

KA ₅ HA ₅ K	3+	518 ± 7	557	0.85 ± 0.21
	2+	452 ± 4	467	2.25 ± 0.45
KA ₅ HA ₅ HA ₅ K	4+	624 ± 5		0.40 ± 0.10
	3+	635 ± 4		0.61 ± 0.11

conformational family was identical. Examination of table 1 shows that there is in general a good agreement between the calculated and experimental CCS values for each species. It should be noted that there is an underestimation of the CCS for the 3+ charge state of the peptides, suggesting that the calculated structures are too compact which will lead to an underestimation of the minimum chromophore separation. Nonetheless, it is clear that each doubly grafted peptide becomes more extended as the charge state is increased from 2+ to 3+. This is consistent with the intuitive expectation that Coulomb repulsion would cause unfolding at higher charge states, causing a concurrent increase in the chromophore separation. Indeed, in the 2+ charge state of the doubly grafted peptides, it is the two chromophores that carry the positive charges. In the 3+ charge state, the proton is added to the histidine side chain and the additional Coulomb repulsion forces the chromophores apart (see figure 4 (a) – (d)). In the case of doubly grafted KA₅HA₅HA₅K the 3+ and 4+ charge states are observed, corresponding to protonation of one and two histidine side chains respectively (figure 4 (e) and (f)). Both charge states are calculated to have an extended structure with the main difference being the uncoiling of the helical motif of the 5 alanine residues situated between the two histidine residues. It can be concluded from the comparison of experimental and calculated CCS that the calculated structures are representative of the doubly grafted peptides, and thus we can examine the dependence of the FRET efficiency on the minimum chromophore separation – as defined above.

Figure 5 shows the FRET efficiency against minimum chromophore separation for all doubly grafted species examined (see table 1 for the numerical values). It is clear that there is a monotonic decrease in the FRET efficiency as the separation of the chromophores is increased. The FRET efficiency of the higher charge state is consistently less than that of the lower charge state, for each peptide size, which is consistent with the CCS data presented above.

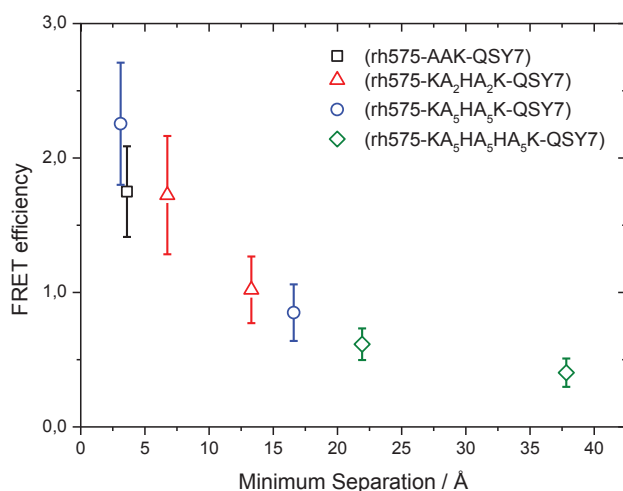


Figure 5. FRET efficiency versus average value of the minimum chromophore separation for the different charge states of doubly

grafted AAK (squares), KA₂HA₂K (triangles), KA₅HA₅K (circles) and KA₅HA₅HA₅K (diamonds).

In particular the large change in structure - from globular to extended - that is observed with the addition of a proton for doubly grafted KA₂HA₂K and KA₅HA₅K leads to an equally large change in the FRET efficiency; from 1.72 ± 0.44 to 1.02 ± 0.25 in KA₂HA₂K and from 2.25 ± 0.45 to 0.85 ± 0.21 in KA₅HA₅K.

The situation for doubly grafted KA₅HA₅HA₅K is interesting as the MCM calculations suggest that there is not a large change in the global shape as the charge state is increased from 3+ to 4+. This is reflected in the small change calculated values of the CCS from 624 Å² to 635 Å². However, there is a proportionally greater change in the value of the FRET efficiency; 0.61 ± 0.11 for the 3+ and 0.40 ± 0.10 for the 4+ charge state respectively. This suggests that the action-FRET is more sensitive to such local changes in structure – in this case the uncoiling of the central five alanine residues – than is IMS, and therefore the two techniques are able to provide complementary information. Overall, these data are in agreement with previous results on the structure of gas phase multi-charged poly-alanines, showing that chromophores have limited influence on the structure of the peptides.^{48,49}

A final point to note is that it is possible to measure the action FRET by performing measurement of the LID spectrum at only 2 wavelengths; λ_D and λ_A . In such a case, the FRET efficiency would be defined as the ratio of the fragmentation yield of acceptor fragments measured at λ_D and λ_A . If this procedure is performed on the data presented in this paper, identical trends are observed.

Conclusion.

We have proposed a scheme for the measurement of FRET in the gas phase using a method based only on fragment ion detection. The principal features that would have to be identified for such an action-FRET scheme were discussed and subsequently shown experimentally. A dark-quenching chromophore, QSY7, was identified and its fragmentation characterized to show that there were fragments specific to electronic excitation. A suitable fluorescent donor chromophore, rh575, was identified and characterized. Measurement of the action spectrum of the two chromophores both grafted onto the simple tripeptide AAK showed that the absorption maximum of rh575 is observed via measurement of the fragments specific to the electronic excitation of QSY7. Thus, it was possible to conclude that the energy had been transferred from the donor to acceptor chromophore. It was also possible to conclude that the FRET observed must occur on a shorter time-scale than both the fluorescence of the donor, and the internal vibrational redistribution of energy across the entire molecule. It was also possible to define an IVR-independent quantification of the FRET efficiency considering the photo-fragmentation efficiency following FRET and direct absorption of the acceptor chromophore.

This definition of the FRET efficiency – taken as the ratio of the area of the peaks in the action spectrum due to absorption of the donor and acceptor chromophores – was used in conjunction with measurements of the collision cross section via IMS and MCM simulations on a series of poly-alanine based peptides containing between 7 and 19 amino acids. It was shown that there is a clear dependence on the

magnitude of the FRET efficiency observed with the separation of the chromophores in each the system studied. Comparison with MCM simulations showed that the FRET efficiency is well correlated with an increase in the separation of donor and acceptor chromophores. Hence the action-FRET methodology set out in the paper is suitable for gas-phase studies of the structure of biomolecules and provides orthogonal information to IMS measurements as it is sensitive to a distance between two defined parts of the molecular ion, while IMS is sensitive to the global shape. The action-FRET methodology provides a significant advance in the study of the conformation and structure of gas-phase molecular ions. This method therefore has a strong potential in native MS as part of a global approach in structural biology.

ASSOCIATED CONTENT

CID and LID mass spectra of singly and doubly grafted AAK; identification of the internal chromophore fragments; fitted raw action spectra for all doubly grafted species; MCM structures of doubly grafted 3 and 7 residue peptides; plot of FRET efficiency versus chromophore separation; tabulated form of the data shown in figure 5. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

ACKNOWLEDGMENT

The research leading to these results has received funding from the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013 Grant agreement N°320659).

REFERENCES

- (1) Weiss, S. *Science* **1999**, 283, 1676.
- (2) Selvin, P. R. *Nat. Struct. Bio.* **2000**, 7, 730.
- (3) Schuler, B.; Lipman, E. A.; Eaton, W. A. *Nature* **2002**, 419, 743.
- (4) Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y. *Science* **2006**, 312, 217.
- (5) Ruotolo, B. T.; Robinson, C. V. *Curr. Opin. in Chem. Biol.* **2006**, 10, 402.
- (6) van den Heuvel, R. H.; Heck, A. J. R. *Curr. Opin. in Chem. Biol.* **2004**, 8, 519.
- (7) Miranker, A.; Robinson, C. V.; Radford, S. E.; Aplin, R. T.; Dobson, C. M. *Science* **1993**, 262, 896.
- (8) Heck, A. J. R. *Nat. Methods* **2008**, 5, 927.
- (9) Vonhelden, G.; Wytenbach, T.; Bowers, M. T. *Science* **1995**, 267, 1483.
- (10) Sinz, A. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, 25, 663.
- (11) Konermann, L.; Pan, J. X.; Liu, Y. H. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1224.
- (12) Breuker, K.; Oh, H. B.; Horn, D. M.; Cerda, B. A.; McLafferty, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6407.
- (13) Bleiholder, C.; Dupuis, N. F.; Wytenbach, T.; Bowers, M. T. *Nat. Chem.* **2011**, 3, 172.
- (14) Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 9557.
- (15) Uetrecht, C.; Rose, R. J.; van Duijn, E.; Lorenzen, K.; Heck, A. J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1633.
- (16) Danell, A. S.; Parks, J. H. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 229, 35.
- (17) Dashtiev, M.; Azov, V.; Frankevich, V.; Scharfenberg, L.; Zenobi, R. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2005**, 16, 1481.
- (18) Talbot, F. O.; Rullo, A.; Yao, H.; Jockusch, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 16156.
- (19) Frankevich, V.; Guan, X. W.; Dashtiev, M.; Zenobi, R. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2005**, 11, 475.
- (20) Iavarone, A. T.; Meinen, J.; Schulze, S.; Parks, J. H. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, 253, 172.
- (21) Iavarone, A. T.; Patriksson, A.; van der Spoel, D.; Parks, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6726.
- (22) Shi, X. G.; Duft, D.; Parks, J. H. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 12801.
- (23) Frankevich, V.; Chagovets, V.; Widjaja, F.; Barylyuk, K.; Yang, Z. Y.; Zenobi, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16, 8911.
- (24) Bowers, W. D.; Delbert, S. S.; Hunter, R. L.; McIver, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7288.
- (25) Vanderhart, W. J. *Mass Spectrom. Rev.* **1989**, 8, 237.
- (26) Dunbar, R. C. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, 200, 571.
- (27) Brodbelt, J. S. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 2757.
- (28) MacAleese, L.; Maitre, P. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, 26, 583.
- (29) Drayss, M. K.; Blunk, D.; Oomens, J.; Polfer, N.; Schmuck, C.; Gao, B.; Wytenbach, T.; Bowers, M. T.; Schafer, M. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 281, 97.
- (30) Case, A. S.; Heid, C. G.; Western, C. M.; Crim, F. F. *J. Chem. Phys.* **2012**, 136, 8.
- (31) Crampton, K. T.; Rathur, A. I.; Nei, Y. W.; Berden, G.; Oomens, J.; Rodgers, M. T. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2012**, 23, 1469.
- (32) Wyr, J. A.; Jensen, C. S.; Nielsen, S. B. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, 308, 126.
- (33) Yao, H.; Jockusch, R. A. *J. of Phys. Chem. A* **2013**, 117, 1351.
- (34) Klaerke, B.; Holm, A. I. S.; Andersen, L. H. *Astron. Astrophys.* **2011**, 532, 5.
- (35) Hansen, C. S.; Kirk, B. B.; Blanksby, S. J.; O'Hair, R. A. J.; Trevitt, A. J. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2013**, 24, 932.
- (36) Kirk, B. B.; Trevitt, A. J.; Blanksby, S. J.; Tao, Y. Q.; Moore, B. N.; Julian, R. R. *J. Phys. Chem. A* **2013**, 117, 1228.
- (37) Macaleese, L.; Chirot, F.; Bazus, L.; Bertorelle, F.; Antione, R.; Lemoine, J.; Dugourd, P. In *ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. Vancouver, 2012.
- (38) Enjalbert, Q.; Girod, M.; Simon, R.; Jeudy, J.; Chirot, F.; Salvador, A.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Lemoine, J. *J. Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 2321.
- (39) Forbes, M. W.; Jockusch, R. A. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2011**, 22, 93.
- (40) Larraillet, V.; Antoine, R.; Dugourd, P.; Lemoine, J. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 8410.
- (41) Albrieux, F.; Calvo, F.; Chirot, F.; Vorobyev, A.; Tsybin, Y. O.; Lepere, V.; Antoine, R.; Lemoine, J.; Dugourd, P. *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, 6888.
- (42) See the website at <http://dasher.wustl.edu/tinker>.
- (43) Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, 490.
- (44) Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 16082.
- (45) Arbeloa, F. L.; Arbeloa, T. L.; Lage, E. G.; Arbeloa, I. L.; Deschryver, F. C. *J. Photoch. Photobio. A* **1991**, 56, 313.
- (46) McRae, E. G.; Kasha, M. *J. Chem. Phys.* **1958**, 28, 721.
- (47) Nagy, A. M.; Talbot, F. O.; Czar, M. F.; Jockusch, R. A. *J. Photoch. Photobio. A* **2012**, 244, 47.
- (48) Hudgins, R. R.; Jarrold, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3494.
- (49) Counterman, A. E.; Clemmer, D. E. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 2111.

Annexe 2 :

**Conformational changes in
amyloid-beta (12-28)
alloforms studied using
action-FRET, IMS and
molecular dynamics
simulations**

Conformational changes in Amyloid-Beta (12-28) alloforms studied using action-FRET, IMS and molecular dynamics simulations.

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Steven Daly^{a,b}, Alexander Kulesza^{a,b}, Frederic Poussiguet^{a,c}, Anne-Laure Simon^{a,b}, Chang Min Choi^{a,b}, Geoffrey Knight^{a,b}, Fabien Chiro^{a,c}, Luke MacAleese^{a,b}, Rodolphe Antoine^{a,b}, Philippe Dugourd^{a,b*}.

Small oligomers of the amyloid beta protein (A β) have been implicated as the neurotoxic agent leading to Alzheimer's disease, and in particular mutations in the hydrophobic core region comprising amino acids L17 to A21 have a large influence on the propensity for aggregate formation. It has been shown that the F19P alloform of A β forms small aggregates, but does not proceed to form large fibrils and plaques. In order to understand the origin of this behavior, the gas phase conformations for the different charge states of the wild-type 12-28 fragment of the amyloid beta and its F19P alloform were studied by a combination of action-FRET, ion-mobility spectrometry (IMS) and molecular dynamics simulations. Comparison of the experimental and theoretical action-FRET efficiencies and collision cross sections allowed the determination of the lowest energy conformational family for each alloform and charge state. For both alloforms, it was found that there is a change from globular to helical structure between the 3+ and 4+ charge states. Additional protonation to give 5+ and 6+ charge states caused unfolding of this helical motif, with the wild alloform showing β -turn like motifs and the F19P alloform random coil motifs. The presence of the helical to β -turn structural transition in the wild, but not the F19P, alloform may help to elucidate the origin of the large difference in aggregation behavior of the two alloforms.

1 Introduction

The amyloid β -protein (A β) is strongly implicated as the main neuropathic agent in Alzheimer's disease; it has been known for over three decades that plaques formed of A β are found in the brain tissue of patients suffering from the disease.¹ The observation of pervasive plaques led to the suggestion that they were the causative agent of the disease. However, recent developments have shown that small soluble A β oligomers retain their neurotoxicity even in the absence of large aggregates and plaques.^{2, 3} Even more surprising, it was found that it was not necessary to have the full 40-42 amino acid protein in order to form aggregates or to observe neurotoxic effects, with many protein fragments also exhibiting these features.^{4, 5} In particular, the region known as the "hydrophobic core" – from L17 to A21 – is found to be essential for the formation of large aggregates and fibrils in the full A β protein.⁶ It is also found that mutations in or close to the hydrophobic core region have a large influence on the propensity for aggregate formation.⁷⁻¹⁰ An example of this is the mutation Phe19 $\rightarrow$ Pro19, which prevents the formation of fibrils.^{11, 12} Indeed, Wood *et al.* found that the substitution of any of the residues within the hydrophobic core with proline completely inhibits the formation of fibrils.¹¹

The 12-28 fragment of the A β protein (A β ₁₂₋₂₈, VHH QKLVF FAEDV GSNK) has attracted attention since it exhibits

essentially identical neurotoxic behavior and fibril formation as the full A β protein.¹³ As such, the conformational characteristics have been studied extensively. Graslund *et al.* found via NMR and CD measurements that A β ₁₂₋₂₈ shows an extended polyproline II (PII) conformation at low temperature and a random coil structure at high temperature.^{14, 15} Several molecular dynamics studies have been performed, which have also shown there exists a transition from extended to folded structure as a function of the solvent polarity and temperature.¹⁶⁻¹⁸ There is also a strong pH dependence of the structure and nature of aggregation, in particular a strong dependence between the formation of random coil or helical motifs, and an equally strong dependence on the aggregation properties, which are found to preferentially form between pH 4 – 7, and thus when a high protonation state is favoured.¹⁹⁻²¹ There also exists a gas phase study of A β ₁₂₋₂₈ using a combination of IR spectroscopy, ECD and IMS to elucidate the difference between different protonation states, with a transition from compact to extended forms seen when adding a proton from 2+ to 3+ charge states.²²

The gas phase provides an ideal setting in which to study the conformational changes brought about by the protonation state of a peptide or protein due to the ability to effectively isolate and study a single charge state. It is now well established that is possible to preserve intact molecular edifices in the gas phase through soft ionization techniques such as electrospray ionization, and indeed there exist several gas phase studies in the properties of A β monomers and their aggregates using ion-mobility mass-spectrometry (IMS).^{12, 22-27} IMS gives access to information on the global structure and is particularly sensitive to changes in the overall structural motif of a system. A complimentary technique that has been recently developed – action-FRET – provides information on the separation of two specific regions of a protein by measurement of the FRET

^a Université de Lyon, F-69622, Lyon, France.

^b CNRS et Université Lyon 1, UMR5306, Institut Lumière Matière.

^c CNRS et Université Lyon 1 UMR 5280, Institut des Sciences Analytiques

Electronic Supplementary Information (ESI) available: The structure of the donor and acceptor chromophores, representative structures and Ramachandran plots for the N-terminal donor doubly-grafted species complementary to figures 2 and 3, and numerical values of the CCS and action-FRET data in figure 1. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

efficiency as reported by specific photo-fragmentation of the acceptor chromophore following specific excitation of a donor chromophore.²⁸ Although action-FRET is sensitive to global changes in structural motifs, it is also able to detect much smaller changes within the same structural motif due to the $1/R^6$ dependence of FRET efficiency on chromophore separation. In addition to these experimental techniques, molecular dynamics (MD) simulations of biomolecules have been shown to produce a biologically relevant picture of folding and aggregation in amyloid- β .²⁹ The combination of the three techniques thus has the potential to glean additional information that either technique alone is unable to access.

In this paper, results of IMS and action-FRET measurements on two alloforms of $A\beta_{12-28}$ cations in different protonation states are presented; wild-type (WT) $A\beta_{12-28}$ and its F19P alloform. Comparison of FRET efficiency and collision cross section (CCS) for the charge states of these two alloforms with theoretical models allows the identification of the dominant structural families for the charge states of each alloform. These structural families are compared for the two alloforms with the view of gaining insight on their different aggregation behavior based upon the changes in structural motifs with protonation state the monomer.

2 Method

2.1 Peptides and Chromophores

Carboxyrhodamine 575 C₅-maleimide (Setareh Biotech) (R575) and QSY 7 C₅-maleimide (Life Technologies) (QSY7) – the structures of which are shown in figure S1 – were used as donor and acceptor chromophores for action-FRET measurements respectively. Both have been previously characterized in the gas phase; R575 absorbing at 505 nm and QSY7 absorbing at 545 nm.^{28, 30} The chromophores are designed to be grafted onto thiols, and thus the target peptide must contain 2 cysteine residues.

WT $A\beta_{12-28}$ with capped N- and C-terminal cysteine residues (Ace-CV¹²HHQKLVF¹⁹FAEDVGSNK²⁸C-NH₂) and the F19P alloform (Ace-CV¹²HHQKLVP¹⁹FAEDVGSNK²⁸C-NH₂) were purchased from Genecust (Luxembourg) and each dissolved in a 1:1 mixture of H₂O:acetonitrile to a concentration of ~500 μ M. Stock solutions of each dye were made by dissolving to concentrations of ~10 mM concentration in DMSO and 10 μ l of each these solutions were added to the peptide solution. This solution was left at room temperature for one hour to allow the reaction to run until completion. For use in the electrospray source, the reaction solutions were further diluted to concentrations of ~50 μ M. In order to produce the 6+ charge state, 0.1% acetic acid was added to the electrospray solution.

2.2 Mass Spectrometry and Optical Spectroscopy

A linear quadrupole ion trap mass spectrometer (LTQ Velos, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) was used to generate, mass select and trap ions in a first, high pressure ion trap for a controlled duration. During ion trapping, ions can be activated and fragmented by collisions (CID) or photons (LID). Fragment ions are transmitted to a second ion trap, with a low pressure,

where they are mass analyzed. A fused silica window (3 mm thick, 1 inch diameter) is positioned at the back end of the instrument and allows for the introduction of the lasers in the UV-Visible range along the ion traps axis. 1-2 mm diameter circular openings in trapping-electrodes enable the interaction of the trapped ions with an on axis laser beam. In order to optimize laser transmission, the central hole of the electrode closest to the fused silica window was enlarged to 5 mm in diameter.

The light source used is a Panther EX OPO pumped by the third harmonic (355 nm) of a Surelite II Nd:YAG laser (Continuum, Santa Clara, CA). A repetition rate of 10 Hz and pulse-widths of the order of 5 ns were used. The visible portion of the spectrum was used directly via the signal beam of the OPO (410 – 700 nm), which is collimated and refocused with a long focal distance lens of 500 mm. Pulse energies were kept between 1.0 to 4.5 mJ/pulse to avoid saturation. A mechanical shutter, synchronized with the mass spectrometer, is used to stop the beam at all times except the ‘ion activation window’ – that is the time after ion accumulation and before the mass analysis. A single laser pulse was used for the irradiation of the trapped ions. When irradiating ions the normalized collision energy is kept at zero.

For action-FRET measurements, mass spectra were accumulated for 2 minutes, and the measurement repeated 5 times to give a total irradiation time of 10 minutes for each charge state and wavelength. Measurements were taken at wavelengths of 505 nm and 545 nm, corresponding to the absorption maxima of the donor and acceptor chromophores respectively. The position of the beam was monitored throughout the measurements using the Guidestar II auto-alignment system. This system uses two 90:10 beam splitters to direct a fraction of the beam onto two CCD cameras, allowing real-time monitoring of the beam position, and to ensure the alignment could be easily reproduced for the two different wavelengths. The power was measured immediately before and after each measurement using a power meter (Ophir-Spiricon GmbH, Ahrensburg, Germany) for the duration of 1 minute and an average value for the power during the measurement determined by taking the average of the power measured immediately before and immediately after accumulation of a mass spectrum.

Action-FRET measurements were performed using the methodology described previously.²⁸ This technique relies upon the measurement of the relative intensities of photo-fragments that are specific to the acceptor chromophore at wavelengths of 545 nm and 505 nm, corresponding to the absorption maximum of QSY7 and R575 respectively. The fragmentation at 545 nm is used as a reference. As QSY7 absorbs only weakly at 505 nm, the intensity of acceptor specific photo-fragments at this wavelength can be correlated to the efficiency of the energy transfer between the two chromophores, and thus to their separation. To extract the action-FRET efficiencies, the fragmentation yield was normalized to the photon flux for each measurement. The action-FRET efficiency is then calculated as ratio of the averaged fragmentation yield at 505 nm to the averaged fragmentation yield at 545 nm. Finally, to account for

the influence of direct absorption and fragmentation of the acceptor at 505 nm a correction of -0.25 (corresponding to the ratio of the fragmentation efficiency of the acceptor chromophore at 505 and 545 nm) was applied to all FRET efficiencies.

2.3 Ion Mobility Mass Spectrometry.

Ion mobility (IMS) measurements were performed using a custom-built ion mobility spectrometer already described elsewhere.^{31, 32} Briefly, a 1 m long drift tube is inserted between an electrospray ionization source and a time-of-flight (ToF) mass spectrometer. Helium at a pressure of 15 Torr is maintained in the drift tube, and the temperature of the whole setup is kept at 300 K. Ions are periodically injected in the drift tube from an hourglass funnel ion trap. Their mass-to-charge ratio and drift time through the tube are simultaneously measured using the ToF. Ion mobilities and collision cross section (CCS) are finally calculated from the evolution of the ion arrival time distribution as a function of the inverse drift voltage.

2.4 Computational.

Replica-Exchange molecular dynamics (REMD) was performed based on the AMBER99 force field completed with the generalized Amber Force Field (GAFF) to describe the non-standard chromophore grafted cysteine residues.³³⁻³⁵ Structural sampling was started from extended conformations of chromophore-grafted WT and F19P mutant sequences. Replica-exchange molecular dynamics as implemented in Gromacs 4.6.5 was used for this task using the Velocity-Verlet algorithm with a time-step of 1 fs and without any cut-offs for the evaluation of interactions.³⁶⁻³⁸ The simulation was conducted with 20 trajectories in parallel which were assigned the temperatures 220, 236, 254, 272, 292, 314, 337, 362, 389, 417, 448, 481, 517, 555, 596, 640, 687, 737, 792 and 850 K in frame of the velocity-rescaling algorithm.³⁹ Exchange attempts between adjacent replicas were performed every 200 steps. This temperature range ensured suitable exchange probabilities throughout the REMD. After local optimization and a short 100 ps equilibration at each temperature, a 10 ns REMD was started and every 1000th structure of the 220 K and 292 K ensembles were taken as samples.

The lowest-energy optimized structure of the 220 K ensemble was taken as new starting point and the procedure was repeated until the potential energy distribution and the energy of the optimized lowest-energy structure had converged. The calculation of FRET-efficiency exploited Förster Theory as detailed in references.^{40, 41} The distance distribution between the optically active units of the chromophores is calculated by evaluation of the geometrical centre of all atoms in the xanthene moiety and the N-linked side chains. The FRET-efficiency distribution is then calculated from the chromophore distance and orientation distributions, and the ensemble-averaged value determined for comparison with the experimental data. The CCS for the comparison with ion-mobility data were obtained by invoking the exact hard-spheres

scattering method originally proposed by Shvartsburg *et al.* and is implemented locally.⁴²

3 Results and Discussion

A β_{12-28} contains four basic amino acids; H13, H14, K16 and K28, and in addition both chromophores possess a single positive charge. Four different charge states are observed after electro-spraying solutions containing doubly grafted A β ; 3+, 4+, 5+, and 6+ corresponding to there being 1, 2, 3, or 4 protons on the peptide respectively, and with the 4+ and 5+ charge states being the most abundant species. This is consistent with previous gas phase measurements of A β_{12-28} in which predominantly 2+ and 3+ species were observed.²² This indicates that the presence of the charged chromophores is not greatly perturbing the charge state distribution of the un-grafted A β_{12-28} peptide.

The CCS and FRET efficiency for each charge state of the two doubly grafted A β_{12-28} alloforms were determined via IMS and action-FRET measurements respectively and are shown as the black squares in figure 1. Here, the cross section is plotted as a function of the FRET efficiency for each charge state of the wild-type (left) and F19P (right) alloforms, and the data is summarized in table S1. The red circles on figure 1 represent the results of the calculated CCS and FRET-efficiencies as described above. It was not possible to obtain an experimental CCS value for the 3+ charge state since the ion count was extremely low under all electrospray conditions and thus it is the calculated CCS value that is plotted in lieu of an experimental value for both alloforms. There is a close agreement between the experimental and theoretical data points, particularly in the case of the 4+ and 5+ charge states of both alloforms. For the 3+ FRET efficiencies, since the calculated chromophore separation is typically < 15 Å, it is impossible to eliminate a contribution from Dexter energy transfer or a breakdown in the Förster relation.⁴¹

From figure 1 it is possible to gain an overview into how the addition of protons changes the peptide structure. There is a large change in the FRET efficiency when the charge state is

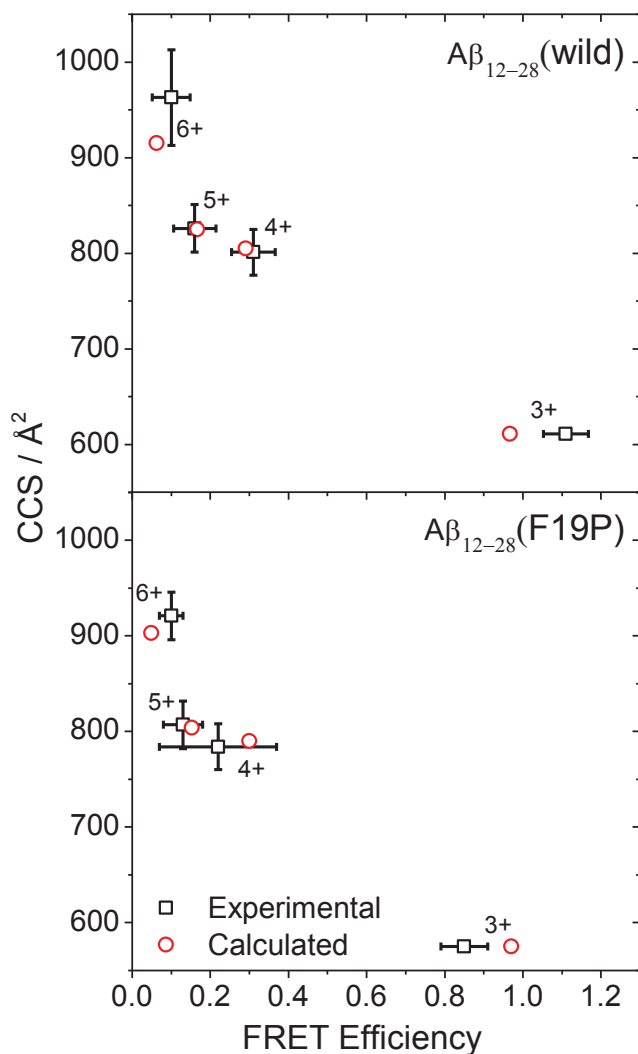


Figure 1. CCS versus FRET-efficiency for the 4 charge states of the WT (top) and F19P (bottom) alloforms of A β_{12-28} . The black squares show the experimental data points, whilst the red circles show the average values of the conformational ensemble calculated by REMD.

changed from 3+ to 4+. A large change in the calculated CCS is also observed, and although there is no experimental data for the 3+ charge state, the close agreement between theory and experiment for the other data points strengthens the case for this increase being real. Hence it can be intuited that there must be a correspondingly large change in the secondary structure in these two charge states. Contrastingly, only a small change in the CCS is observed for the 4+ and 5+ charge states, which suggests that the global structural motif of the peptide remains essentially unaltered. However, there is a larger relative decrease in the FRET efficiency between these two charge states. This is suggestive of an overall increase in the extension of the peptide, although for the F19P alloform the change in FRET efficiency from 4+ to 5+ is encompassed in the error bars for the 4+ FRET efficiency. This variance in the FRET-efficiency was measured consistently and appears to be a genuine uncertainty, perhaps indicating a greater flexibility for the relative position of the chromophores. Finally, there is a further large change in the CCS when comparing the 5+ and 6+

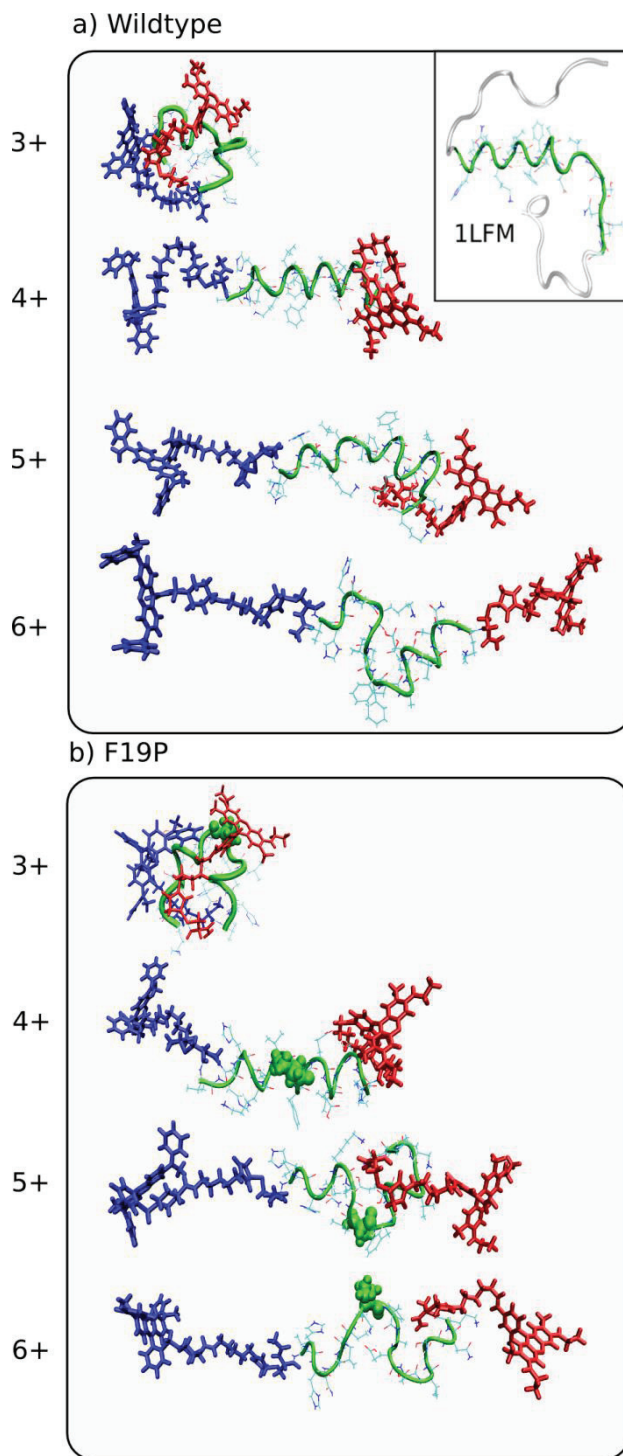


Figure 2. Representative structures simulated at 292 K of the dominant conformational family of the different charge states of the wild (top) and F19P (bottom) alloforms of A β_{12-28} . Here, the donor chromophore (grafted to the C-terminal residue) is shown in red, the acceptor chromophore in blue, and the peptide backbone in green. The inset on the top panel shows the NMR structure (pdb database file 1LFM) for the full amyloid beta protein, with the 12-28 region highlighted in green. The corresponding figure of the ensembles with the alternative chromophore grafting location is shown in figure S2.

charge states, and a smaller decrease in the FRET efficiency. This suggests a further change in global structure, but one that would appear to leave the overall chromophore separation

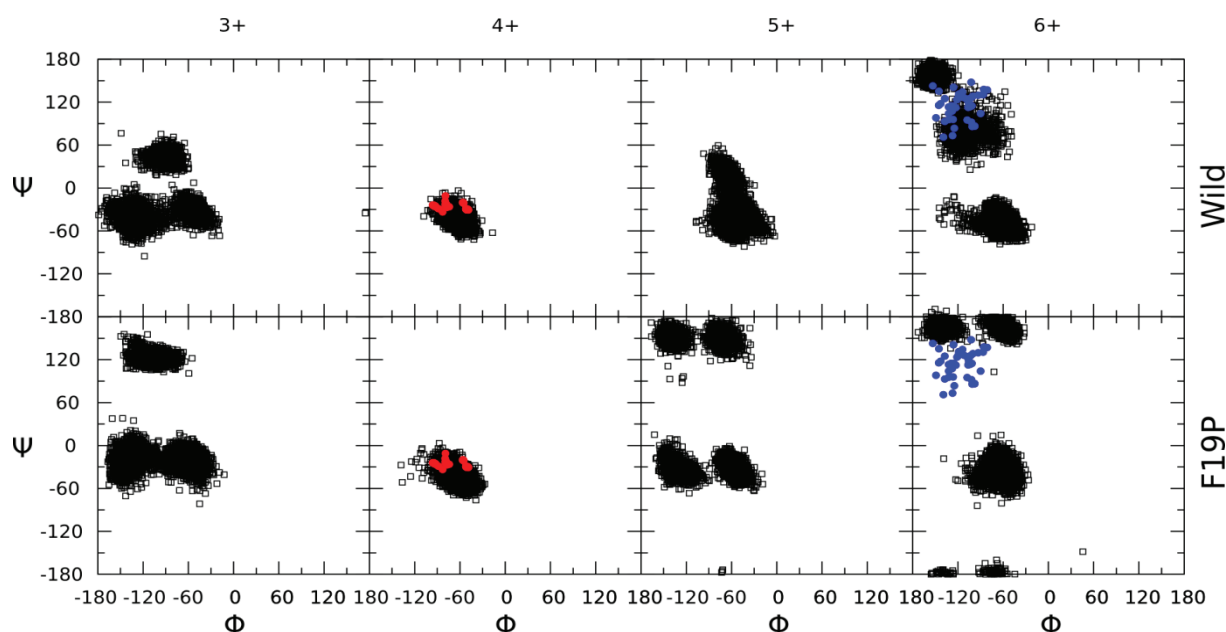


Figure 3. Ramachandran plots for the hydrophobic core region (residues 17-21) of the different charge states of the wild (top) and F19P (bottom) alloforms of A β ₁₂₋₂₈ (donor chromophore is grafted to the C-terminal residue). Black squares correspond to the 5 dihedral angle (Φ , Ψ) pairs of residues 17 – 21 for all the structures computed at 292 K. Red dots indicate the corresponding dihedral angles of the partially folded solution structure from the pdb file 1LFM. Blue dots indicate the dihedral angles of the A-chains in the pdb file 2BEG. The corresponding figure of the ensembles with the alternative chromophore grafting location is given in figure S3.

unaltered. However, it must be noted that as a FRET efficiency of 0 is approached, a relatively small change in FRET efficiency can correspond to a large change in the chromophore separation.

Since the theoretical and experimental data is in excellent agreement, it is possible to examine representative structures for the charge states of each alloforms, shown in figure 2, to confirm that such trends as described in the previous paragraph are observed. Although such a visual comparison of representative structures can be illustrative, a more objective measure of structural differences is obtained by monitoring the changes in the dihedral angles of the peptide backbone – for amino acids in the hydrophobic core – in a Ramachandran plot, which is shown in figure 3 for the C-terminal donor chromophore and figure S3 for the N-terminal donor chromophore.

The first point that must be established is whether the presence of the chromophores is greatly perturbing the peptide secondary structure as compared to the un-grafted system. The molecular dynamics simulations reveal that – for a given alloform and charge state – the chromophores are very flexible due to the long C₅ linker chain, whilst the peptide undergoes only small relative changes once a low energy structure is adopted. Additionally, the same trends in structural motif as a function of charge state are observed for both N- and C-terminally grafted QSY7, with only a greater degree of random-coil like nature for the C-terminally grafted F19P species observed. From this, the structural influence of the chromophores reduces to the existence of two positive charges at the N- and C-terminus.

A previous gas phase study of the structure of doubly and triply protonated A β ₁₂₋₂₈ found that there was a transition from

globular to helical conformation with addition of a third proton to go from 2+ to 3+ charge state.²² A similar change in secondary structure is observed in the doubly grafted species in figure 2, although for singly (3+) and doubly (4+) protonated peptide. It thus appears that although similar structural trends are observed in these two systems, the presence of the N- and C-terminal charges of the chromophores is inducing the transition from coil-like to helical to occur at a lower peptide protonation state.

In order to recognize any commonalities between the physiologically relevant solution phase structure of the A β ₁₋₄₂ and the gas phase structure of the doubly grafted A β ₁₂₋₂₈ studied here, a visualization of the NMR structure of A β ₁₋₄₂ (pdb code 1LFM) is included as an inset to figure 2 with the 12-28 region highlighted in green. There is a clear helical motif for the 12-28 region, which is also observed for the 4+ charge state in both wild and F19P alloforms. That the 4+ charge state possesses a similar structural motif to the solution structure may be due to there being the same net charge on the peptide in both cases; the peptide being doubly protonated in doubly grafted A β ₁₂₋₂₈ and the 4 basic and 2 acidic amino acids in the 12-28 fragment, giving the net charge of 2+. To explore this similarity further, the backbone dihedral angles in the hydrophobic core region of A β ₁₋₄₂ are shown as red circles on 4+ Ramachandran plots of figure 3 (and figure S3). An almost quantitative correspondence of the backbone conformation in the two systems is evident, providing striking evidence for the mimicking of native secondary structure in the doubly grafted species. The structural similarity of the 12-28 fragment may be attributed to the presence of the N- and C-terminal chromophores mimicking the presence of the missing N- and C-terminal peptide in A β ₁₂₋₂₈.

Contrastingly, the hydrophobic core region presents two alternative backbone configurations in the 3+ species which are completely absent from the solution phase structure. Indeed, the 3+ charge state presents a globular random-coil type structure in both alloforms. The large change in the structural motif – from globular random-coil to alpha-helical – is as predicted from the change in FRET efficiencies shown in figure 1.

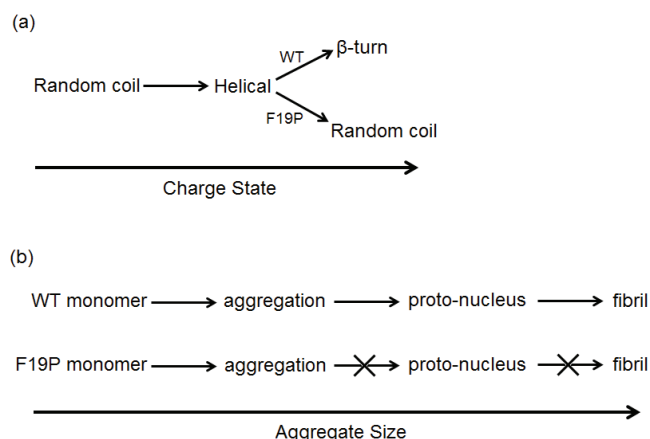
In the 4+ charge state of the WT alloform, both lysine residues K16 and K28 carry the positive charges, and this additional Coulomb repulsion causes the observed unfolding. The F19P alloform behaves in a qualitatively similar way to the wild alloform for the 3+ and 4+ charge states, as evidenced by comparison of the hydrophobic core dihedral angle data of figure 3. In both cases there is a change in structure from globular random-coil of the 3+ charge state to extended helical in the 4+ charge state.

In the 5+ charge state, the additional proton must reside on one of the histidine residues, H13 or H14, since the N-terminus is acetylated. It is found that, for both possible grafted species, it is energetically favorable for the third proton to be located on the H14 residue. This may be due to the fact that the K16 and H14 are located on opposite sides of one of the helical turns, allowing the charges to maintain a maximum separation whilst retaining the favoured helical motif. Through the absence of further major charge-solvating effects in the gas-phase peptide with overall positively charged residues, the maximization of inter-charge separation as driving force for the observed structural changes upon protonation seem highly plausible.^{43, 44} Protonation of the 4+ charge state to the 5+ charge state results in an overall elongation of both systems as evidenced by the decrease in FRET-efficiency and the small increase in CCS. There is a clear distortion of the helical motif in both alloforms, particularly in the hydrophobic core region. Figure 3 shows a clear deviation from the “all-alpha” configuration of the 4+ charge state in both alloforms, but the nature of this deviation is strikingly different. In the WT alloform the deviation results in a distortion of the helical motif rather than a complete unfolding. The F19P alloform shows a more complete unfolding of the helical motif resulting in a significant random-coil character in the dihedral angle plot of figure 3. This emerging difference could indicate that the helix-stabilizing interactions cannot compensate for the charge-induced structural strain the F19P alloform, indicating a weakening of the stability of the helix as compared to the WT.

The addition of a fourth proton to the H13 residue to give a maximally charged 6+ species results in a complete disruption of the helical motif in the N-terminal region of both alloforms. Although similar behavior is observed for both alloforms in terms of this structural transition, there is a pronounced difference in the structural motifs presented by the hydrophobic core region. For the F19P alloform, the difference between 5+ and 6+ charge states lies mainly in further loss of helical motifs and a concurrent increase in random-coil character. The WT alloform also shows significant deviation from the helical structure, but a significant β character is now displayed.

Since it is well established that large aggregates of A β are arranged as β -sheets, it has been suggested that the

conformational change from helical to β -like structures in the monomer are an important step in the aggregation process.^{45, 46} The dihedral angles for the hydrophobic core region of the



Scheme 1. Summary of monomer structural transition with charge state (a) and proposed aggregation scheme (b) for the wild and F19P alloforms.

Alzheimer's amyloid fibril (pdb structure 2BEG) are included in figure 3 for the 6+ charge states of the two alloforms as blue circles. The WT alloform possesses structures in which the same ranges of dihedral angles as present in the fibril are present, indicating that a fibril-like conformation is present in the WT. In contrast, there is no evidence of population of fibril-like monomer structures in the F19P alloform, which shows only random-coil motifs. The difference in the structural motifs as a function of charge state for the two alloforms is summarized in scheme 1(a).

Both F19P and WT alloforms of the A β_{1-42} protein has been studied in the gas phase previously by Bernstein *et al.*, who concluded although both alloforms form small aggregates it is only the wild-type in which further oligomerization takes place to form large fibril-like structures.¹² This observation lead Bernstein *et al.* to the conclusion that there is a key proto-nucleus which is vital for the formation of fibrils which are formed by aggregates of the WT – but not the F19P alloform, although the exact nature of this postulated proto-nucleus is unknown.²⁷ One such model for understanding fibril self-assembly implies that at a certain aggregate size a transition between a random-coil and β conformation is observed, with the β -sheet fibril acting as a nucleus for further oligomerization.⁴⁶ Bleiholder *et al.* found evidence for the existence of para-nuclei in the aggregation of important fragments of various naturally occurring fibril forming proteins, but not in the case of a peptide sequence which forms isotropic aggregates.⁴⁷

The data presented here allows us to postulate a tentative hypothesis for the difference in aggregation behavior of the two alloforms based on the behavior of the hydrophobic core in the monomer discussed above and summarized in scheme 1(a). The presence of the structural transition from the predominantly helical form of the 4+ and 5+ charge states to the significant proportion of β -turn-like structures in the 6+ for the WT alloform indicates that a structural transition similar to that suggested as resulting in the fibril proto-nucleus is possible,

scheme 1(b). Contrastingly, this structural transition is not observed in the F19P alloform. As such, the structural transition that is postulated to occur to form the proto-nucleus does not happen in the F19P alloform and thus the self-aggregation into extended fibril-like structures cannot occur. In this case, it could be expected that the isotropic aggregates observed by Bleiholder *et al.* observed in similar non-fibril forming species may form.

4 Conclusions and Prospects

The structure of the different charge states of the 12-28 fragment of the amyloid beta protein have been studied by a combination of ion mobility mass spectrometry, action-FRET and REMD simulations. The addition of a second experimental dimension has allowed a thorough examination of the theoretical methods used here to reproduce the experimental values. In particular, the small changes in the hydrophobic core observed between the 4+ and 5+ charges states was illuminated by the second experimental dimension and allowed extraction of more information than either method alone could have. The presence of two experimental parameters further constrained the conformational landscape than can be probed by MD simulation and hence provided a higher degree of confidence that the calculated structures reproduce the experimentally observed conformation ensemble. Although the IMS and action-FRET experiments were performed separately on the systems reported in this work, the complementarity of the two methods in terms of the structural information accessible strongly suggests that a future coupling of the two measurements is a desirable union. This will be of particular importance when it comes to consideration of larger protein systems where there are multiple conformational families co-existing for a given charge state. In this case, it will be possible to perform conformationally resolved measurements in both IMS and action-FRET dimensions of an experiment, leading to a more robust characterization of, for example, the transition between folded and unfolded states of proteins as previously investigated by IMS alone.

For the amyloid beta fragment peptides, the influence of the charge state on the structure was studied. The charge state had a large influence on the structure, with a transition between random coil and helical being observed when going from singly to doubly protonated (3+ and 4+ species). Addition of a third proton on the peptide was found to destabilize the helix in the WT alloform and cause partial unfolding in the F19P alloform. The addition of a fourth proton to the peptide, giving the maximally charged 6+ species, caused unfolding of the helix in both alloforms.

Analysis of the dihedral angles of the peptide backbone in the hydrophobic core region of the two alloforms, showed that although the two alloforms exhibit a globally similar behavior as a function of charge state, there are significant differences in the structural motifs of the hydrophobic core. Comparison to the dihedral angles of the solution phase structure of both monomer and fibrillar A β_{1-42} showed that the helical to β -turn conformational transition that takes place during aggregation

only occurs in the WT alloform, whilst the F19P alloform presents a random-coil structure. Hence, it was postulated the early propensity of the F19P alloform to undergo a helical to random-coil conformational transition prevents formation of the fibrillar proto-nucleus and thus the F19P alloform does not form extended fibrillar aggregates. The importance of such a transition in A β peptides potentially provides a glimpse into the aggregation propensity of other A β mutants. Ultimately, the possibility of a link between helix stability of the hydrophobic core and the propensity for aggregation may provide a novel target for potential drug design.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge computer time granted by the PSMN (Pôle Scientifique de Modélisation Numérique) computing center of ENS de Lyon. A. K. acknowledges the German Science Foundation DFG for funding in frame of the Research Fellowship Ku 3251/1-1.

Notes and references

- 1 D. J. Selkoe, *Physiological Reviews*, 2001, **81**, 741-766.
- 2 M. D. Kirkitadze, G. Bitan and D. B. Teplow, *Journal of Neuroscience Research*, 2002, **69**, 567-577.
- 3 W. L. Klein, W. B. Stine and D. B. Teplow, *Neurobiology of Aging*, 2004, **25**, 569-580.
- 4 D. Burdick, B. Soreghan, M. Kwon, J. Kosmoski, M. Knauer, A. Henschen, J. Yates, C. Cotman and C. Glabe, *Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**, 546-554.
- 5 C. J. Pike, A. J. Walencewiczwasserman, J. Kosmoski, D. H. Cribbs, C. G. Glabe and C. W. Cotman, *Journal of Neurochemistry*, 1995, **64**, 253-265.
- 6 C. J. Barrow, A. Yasuda, P. T. M. Kenny and M. G. Zagorski, *Journal of Molecular Biology*, 1992, **225**, 1075-1093.
- 7 G. Bitan, S. S. Vollers and D. B. Teplow, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 34882-34889.
- 8 A. Peralvarez-Marín, L. Mateos, C. Zhang, S. Singh, A. Cedazo-Minguez, N. Visa, L. Morozova-Roche, A. Graslund and A. Barth, *Biophysical Journal*, 2009, **97**, 277-285.
- 9 A. R. Lam, D. B. Teplow, H. E. Stanley and B. Urbanc, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 17413-17422.
- 10 Y. S. Lin and V. S. Pande, *Biophysical Journal*, 2012, **103**, L47-L49.
- 11 S. J. Wood, R. Wetzel, J. D. Martin and M. R. Hurle, *Biochemistry*, 1995, **34**, 724-730.
- 12 S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, A. Baumketner, J. E. Shea, G. Bitan, D. B. Teplow and M. T. Bowers, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 2075-2084.
- 13 P. E. Fraser, L. Levesque and D. R. McLachlan, *Journal of Neurochemistry*, 1994, **62**, 1227-1230.
- 14 J. Jarvet, P. Damberg, K. Bodell, L. E. G. Eriksson and A. Graslund, *Journal of the American Chemical Society*, 2000, **122**, 4261-4268.
- 15 J. Jarvet, P. Damberg, J. Danielsson, I. Johansson, L. E. G. Eriksson and A. Graslund, *Febs Letters*, 2003, **555**, 371-374.
- 16 F. Simona, G. Tiana, R. A. Broglia and G. Colombo, *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 2004, **23**, 263-273.
- 17 A. Baumketner and J. E. Shea, *Journal of Molecular Biology*, 2006, **362**, 567-579.

- 18 Z. X. Cao, L. Liu, L. L. Zhao and J. H. Wang, *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, **12**, 8259-8274.
- 19 P. E. Fraser, J. T. Nguyen, W. K. Surewicz and D. A. Kirschner, *Biophysical Journal*, 1991, **60**, 1190-1201.
- 20 Y. Su and P. T. Chang, *Brain Research*, 2001, **893**, 287-291.
- 21 P. Mandal, N. Eremina and A. Barth, *Journal of Physical Chemistry B*, 2012, **116**, 12389-12397.
- 22 T. N. Le, J. C. Pouilly, F. Lecomte, N. Nieuwjaer, B. Manil, C. Desfrancois, F. Chiro, J. Lemoine, P. Dugourd, G. van der Rest and G. Gregoire, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2013, **24**, 1937-1949.
- 23 R. H. van den Heuvel and A. J. R. Heck, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, **8**, 519-526.
- 24 B. T. Ruotolo and C. V. Robinson, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, **10**, 402-408.
- 25 X. Cheng and R. B. van Breemen, *Analytical Chemistry*, 2005, **77**, 7012-7015.
- 26 M. M. Murray, S. L. Bernstein, V. Nyugen, M. M. Condron, D. B. Teplow and M. T. Bowers, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 6316-+.
- 27 S. L. Bernstein, N. F. Dupuis, N. D. Lazo, T. Wytttenbach, M. M. Condron, G. Bitan, D. B. Teplow, J. E. Shea, B. T. Ruotolo, C. V. Robinson and M. T. Bowers, *Nature Chemistry*, 2009, **1**, 326-331.
- 28 S. Daly, F. Poussigue, A. L. Simon, L. MacAleese, F. Bertorelle, F. Chiro, R. Antoine and P. Dugourd, *Analytical Chemistry*, 2014, **86**, 8798-8804.
- 29 D. B. Teplow, N. D. Lazo, G. Bitan, S. Bernstein, T. Wytttenbach, M. T. Bowers, A. Baumketner, J. E. Shea, B. Urbanc, L. Cruz, J. Borreguero and H. E. Stanley, *Accounts of Chemical Research*, 2006, **39**, 635-645.
- 30 F. O. Talbot, A. Rullo, H. Yao and R. A. Jockusch, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 16156-16164.
- 31 F. Albrieux, F. Calvo, F. Chiro, A. Vorobyev, Y. O. Tsybin, V. Lepere, R. Antoine, J. Lemoine and P. Dugourd, *Journal of Physical Chemistry A*, 2010, **114**, 6888-6896.
- 32 F. Canon, R. Ballivian, F. Chiro, R. Antoine, P. Sarni-Manchado, J. Lemoine and P. Dugourd, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, **133**, 7847-7852.
- 33 Y. Sugita and Y. Okamoto, *Chemical Physics Letters*, 1999, **314**, 141-151.
- 34 J. M. Wang, P. Cieplak and P. A. Kollman, *Journal of Computational Chemistry*, 2000, **21**, 1049-1074.
- 35 J. M. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman and D. A. Case, *Journal of Computational Chemistry*, 2004, **25**, 1157-1174.
- 36 B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel and E. Lindahl, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2008, **4**, 435-447.
- 37 D. Van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark and H. J. C. Berendsen, *Journal of Computational Chemistry*, 2005, **26**, 1701-1718.
- 38 H. J. C. Berendsen, D. Vanderspoel and R. Vandrunen, *Computer Physics Communications*, 1995, **91**, 43-56.
- 39 G. Bussi, D. Donadio and M. Parrinello, *Journal of Chemical Physics*, 2007, **126**, 7.
- 40 T. Forster, *Annalen Der Physik*, 1948, **2**, 55-75.
- 41 G. D. Scholes, *Annual Review of Physical Chemistry*, 2003, **54**, 57-87.
- 42 A. A. Shvartsburg and M. F. Jarrold, *Chemical Physics Letters*, 1996, **261**, 86-91.
- 43 P. Dugourd, R. Antoine, G. Breaux, M. Broyer and M. F. Jarrold, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 4675-4679.
- 44 M. Kohtani, T. C. Jones, J. E. Schneider and M. F. Jarrold, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 7420-7421.
- 45 E. D. Eanes and G. G. Glenner, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1968, **16**, 673-&.
- 46 J. D. Harper and P. T. Lansbury, *Annual Review of Biochemistry*, 1997, **66**, 385-407.
- 47 C. Bleiholder, N. F. Dupuis, T. Wytttenbach and M. T. Bowers, *Nature Chemistry*, 2011, **3**, 172-177.

